

ОТСУТСТВИЕ ЦИКЛИНЗАВИСИМОЙ ФОСФОПРОТЕИНКИНАЗЫ Pho85p ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ НУКЛЕОИДОВ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© Е. В. Самбук,¹ А. Ю. Физикова, К. В. Захарова, А. М. Смирнов, М. В. Падкина

Биологический научно-исследовательский институт С.-Петербургского государственного университета;

¹ электронный адрес: esambuk@mail.ru

Циклинзависимые фосфопротеинкиназы (CDK) играют важную роль в регуляции клеточного цикла, метаболизма и организации цитоскелета у эукариот. CDK дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Pho85p взаимодействует с 10 циклинами и фосфорилирует различные субстраты: активаторы транскрипции Pho4p и Gcn4p, белок цитоскелета Rvs167p — гомолог амфифизина 1 млекопитающих — и мн. др. Мутации в гене *PHO85* имеют большое количество плеiotропных эффектов, в частности высокую скорость накопления дыхательно-некомпетентных клонов в процессе роста. Причины митохондриальной нестабильности у штаммов *pho85* не изучены. В настоящей работе показано, что у штаммов с дефектом гена *PHO85* происходят изменение морфологии клеток, увеличение числа актиновых «заплат» и возрастает количество почек, не содержащих митДНК. Таким образом, отсутствие киназы Pho85p влияет не на уровень мутабельности митДНК, а приводит к нарушению распределения митДНК между материнской клеткой и почкой, возможно, вследствие изменения структуры цитоскелета.

Ключевые слова: циклинзависимые фосфопротеинкиназы, цитоскелет, наследование митохондрий, тропомиозин.

Принятые сокращения: CDK — циклинзависимые фосфопротеинкиназы, КФ — кислая фосфатаза, DAPI — 4,6-диамидино-2-фенилиндол-дигидрохлорид, Φ_n — неорганический фосфат.

Циклинзависимые протеинкиназы (cyclin-dependent kinases — CDK) играют важную роль в регуляции клеточного цикла и дифференцировки у эукариот. Консервативность структуры CDK позволяет использовать модельные объекты, такие как дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, для изучения роли этих белков в клетке. К семейству CDK дрожжей принадлежат основная киназа клеточного цикла Cdc28p и киназы Ssn3p, Kin28p, Pho85p и Sak1p (Hunter, Plowman, 1997). Активность CDK, как правило, регулируется фосфорилированием, а субстратная специфичность определяется связыванием с циклином (Morgan, 1996). Особый интерес в последнее время вызывает киназа Pho85p, так как она способна образовывать комплексы с 10 циклинами (Measday et al., 1997), что обуславливает широкий спектр ее субстратов и вследствие этого участие в регуляции многих процессов. Показано, что комплекс Pho80p—Pho85p фосфорилирует активатор транскрипции генов метаболизма фосфора — Pho4p (Kaffman et al., 1994), комплекс Pcl5p—Pho85p фосфорилирует и отправляет на деградацию регулятор биосинтеза аминокислот Gcn4p (Shemer et al., 2002), а комплекс Pcl1p—Pho85p фосфорилирует белок цитоскелета Rvs167p — гомолог амфифизина 1 млекопитающих (Lee et al., 1998; Colwill et al., 1999). Таким образом, Pho85p может участвовать как в регуляции транскрипции, так и в регуляции различных клеточных процессов за счет изменения организации цитоскелета. Следует отметить, что Pho85p является функцио-

нальным гомологом киназы CDK5 млекопитающих (Huang et al., 1999; Nishizawa et al., 1999). В отличие от других CDK CDK5 не участвует в регуляции клеточного цикла, а функционирует в основном в неделящихся клетках — нейронах взрослого организма, а также регулирует процессы нейрогенеза (Smith, 2003). Киназа CDK5 фосфорилирует серины 272, 276 и 285 белка амфифизина 1 у млекопитающих (Floyd et al., 2001).

Впервые ген *PHO85* у дрожжей был идентифицирован при изучении генетического контроля транскрипции гена *PHO5*, кодирующего структуру репрессибельной кислой фосфатазы (КФ). Модель регуляции КФ дрожжей представляет собой одну из самых удобных и хорошо изученных систем регуляции (Oshima, 1997).

Дрожжи синтезируют два изоформа репрессибельных КФ — КФ2 (Pho5p) и КФ3 (Pho11p). Транскрипция генов *PHO5* и *PHO11* ингибируется при концентрации фосфата в среде 250 мг/л (Самсонова и др., 1975). В регуляции экспрессии генов *PHO5* и *PHO11*, а также многих других генов, кодирующих энзимы метаболизма Φ_n в клетке (*PHO*-регулон), принимают участие белки-активаторы Pho2p и Pho4p, а также циклин-киназный комплекс Pho80p—Pho85p и ингибитор киназы Pho81p.

На среде с фосфатом циклин-киназный комплекс активен, он фосфорилирует белок-активатор Pho4p, и фосфорилированный Pho4p не поступает в ядро, вследствие этого не происходит транскрипции генов *PHO*-регулона.

Отсутствие фосфата в среде приводит к репрессии циклин-киназного комплекса ингибитором Pho81p, Pho4p не фосфорилируется, транспортируется в ядро и активирует транскрипцию гена *PHO5* и других генов *PHO*-регулона (Lenburg, O'Shea, 1996).

Мутации в гене *PHO85* приводят к большому числу плейотропных эффектов: конститутивному синтезу КФ, изменению морфологии клеток, накоплению гликогена, нарушению дыхания (Timblin et al., 1996) и отсутствию роста на среде с пролином (Попова и др., 2000). Ранее нами было показано, что дыхательная некомпетентность мутантов *pho85* является результатом постепенного накопления мутаций [*rho*⁰] или [*rho*⁻] в процессе митотических делений (Самбук и др., 2003). Мутации [*rho*⁰] возникают при полной утрате митДНК, тогда как мутации [*rho*⁻] являются результатом делеций митДНК и в этом случае митДНК цитологически выявляется.

Дрожжи *S. cerevisiae* являются факультативными анаэробами и в отсутствие функциональных митохондрий способны получать энергию за счет гликолиза. Митохондрии у дрожжей представляют собой динамичные разветвленные структуры. Характерными особенностями наследования митохондрий являются векторное движение от материнской клетки к дочерней при помощи нитей актинового цитоскелета и закрепление митохондрий в фиксированных точках в материнской клетке и почке за счет специфических белков (Yang et al., 1999). Клетки дрожжей делятся асимметрично: на поверхности клетки выбирается сайт формирования почки, относительно которого поляризованы актин и микротрубочки цитоскелета. В результате органеллы, везикулы и другие клеточные компоненты транспортируются из материнской клетки в развивающуюся почку (Boldogh et al., 2001; Bretscher, 2003). Нарушение цитоскелета приводит к нарушению распределения вакуолей и митохондрий. Такой эффект, в частности, оказывают мутации в генах, кодирующих тубулин у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (Yaffe et al., 1999), и мутации в гене *TPM1* у *S. cerevisiae*, кодирующем структуру тропомиозина. Тропомиозин стабилизирует актиновые филаменты. Мутации *tpm1* ведут к утрате актиновых тяжей (Liu, Bretscher, 1992).

Важную роль в поддержании структуры цитоскелета могут играть процессы фосфорилирования или дефосфорилирования входящих в его состав белков. Киназа Prk1p фосфорилирует белки Pan1p и Sla1p и тем самым ингибирует комплекс Pan1p—Sla1p—End3p. Этот комплекс входит в состав актиновых «заплат» и необходим для их формирования и нормальной морфологии (Zeng et al., 2001). Также показано, что мутации в гене *PTC1* — структурном гене серин-треониновой фосфатазы — приводят к задержке переноса митохондрий в дочернюю почку (Roeder et al., 1998).

Причины высокой скорости накопления клонов с нарушением дыхания, возникающих на фоне дизрупции гена *PHO85*, неизвестны. Можно выдвинуть несколько гипотез. Во-первых, отсутствие функциональной киназы Pho85p может приводить к изменению транскрипции многих генов, в том числе и тех, которые влияют на репликацию митДНК (Ogawa et al., 2000); во-вторых, мутации *pho85* могут быть слабыми мутаторами и повышать частоту точковых или делеционных мутаций в митохондриальной ДНК; в-третьих, мутации *pho85* могут влиять на распределение митохондрий между материнской и дочерней клетками или нарушать формирование и распределение митохондриального нуклеоида.

Настоящая работа посвящена выяснению природы митохондриальной нестабильности у штаммов дрожжей с дизрупцией гена *PHO85*. Для этого изучали распределение митохондриальной ДНК между материнской клеткой и почкой у мутантов и исходных штаммов, а также исследовали цитоскелет, изменения которого могут влиять на распределение митохондрий.

Материал и методика

В работе были использованы штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, генотипы и происхождение которых представлены в таблице.

В работе приняты следующие обозначения фенотипов: *Pho*⁺ и *Pho*⁻ — наличие и отсутствие активности КФ; *Eth*⁻ — отсутствие роста на среде, содержащей в качестве источника углерода этиловый спирт в концентрации 2%; [*rho*⁰], [*rho*⁻] — дыхательная некомпетентность.

Для культивирования дрожжей использовали стандартные среды (Захаров и др., 1984).

Плазмиды pDEL85-*LEU2*, pDEL85-*URA3* были получены ранее (Самбук и др., 2003) на основе плазмиды p85-WT, содержащей в составе pUC19 ген *PHO85* (1.1 т. п. о.). Плазмида p85-WT была линейаризована по сайту BglII и лигирована с BglII-фрагментом, содержащим ген *LEU2*, выделенный из плазмиды pFL36 (InforMax, Inc.), или с BglII-фрагментом, содержащим ген *URA3* плазмиды pFL38 (InforMax, Inc.). Плазмиды использовали для получения штаммов с дизрупцией гена *PHO85*.

Стандартные генетические методики, а также метод определения активности КФ на поверхности колоний дрожжей опубликованы ранее (Захаров и др., 1984). Выделение хромосомной ДНК дрожжей и ПЦР проводили по стандартным протоколам (Гловер, 1988). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью традиционных методов (Урбах, 1964).

Для получения штаммов с дизрупцией гена *PHO85* плазмиду pDEL85-*LEU2* (pDEL85-*URA3*) обрабатывали рестриктазой PvuII и трансформировали штаммы дрожжей. Возникшие клоны *Leu*⁺ или *Ura*⁺ *Pho*⁺ отбирали и выделяли из них хромосомную ДНК, которую использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами для гена *PHO85*.

В качестве позитивного праймера использовали олигонуклеотид 5'-GCCCTAGGACGCTAGACTCGTAAGCCCGTAGCTT-3' и последовательность негативного праймера 5'-TAGAGGCTGTCGTAAGATGAGACTAAAGTA-3'. ПЦР проводили по следующему протоколу: 1 мин при 94 °C, 29 циклов; 1 мин при 94 °C; 1 мин при 54 °C; 1 мин при 72 °C. Дополнительный цикл для достройки образовавшихся цепей ДНК: 10 мин при 72 °C. Фермент — Taq-полимераза (Fermentas, Литва). Продукты ПЦР анализировали в 0.7%-ном агарозном геле.

Для окраски ДНК митохондрий клетки дрожжей фиксировали в 4%-ном глутаровом альдегиде (Sigma, США) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали 3 раза дистиллированной водой. Окрашивание AT-специфичным флуорофлором DAPI (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл проводили в буферном растворе, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7.6), 0.25 М сахарозы,

1 mM ЭДТА, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.8 mM ФМСФ и 0.05 % 2-меркаптоэтанола. После окрашивания клетки ресуспендировали в среде для хранения DABCO (1,4-дiazобисциклооктан) в глицерине (Clark, 1980).

Для визуализации цитоскелета использовали фаллоидин, конъюгированный с флуорохромом родамином (Sigma, США). Клетки выращивали до середины фазы логарифмического роста, осаждали центрифугированием и отмывали дистиллированной водой. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл 35 mM фосфатного буферного раствора (pH 6.8), содержащего 0.5 mM MgCl₂. Клетки фиксировали в течение 2 ч при комнатной температуре в растворе 36%-ного формальдегида. Затем клетки дважды отмывали водой и ресуспендировали в 0.4 мл фосфатного солевого буферного раствора (pH 7.3), содержащего в 1 л 8 г NaCl, 0.2 г KCl, 1.14 г NaH₂PO₄ и 0.2 г KH₂PO₄. Аликвоту 0.2 мл клеточной суспензии окрашивали родамин-фаллоидином в течение 2—3 ч при комнатной температуре, доводя раствор красителя до конечной концентрации 1.5 мкМ. После окрашивания клетки отмывали в фосфатном буфере, ресуспендировали в среде для хранения (DABCO в глицерине) (Johnson, Nogueira, 1981) и готовили препараты.

Препараты анализировали с помощью универсального флуоресцентного микроскопа DMRXA (Leica Wetzlar GmbH), оборудованного объективами FLUOTAR 40/0.70 и 100/1.30, тубусной оптикой с линзами от 1.0× до 1.6×, автоматической фотонасадкой, черно-белой CCD-камерой накопления сигнала (Cohu) и набором комбинированных фильтров для флуорохромов (DAPI и иодистый пропидий). Для получения и обработки видеоизображения использовали программное обеспечение QFISH (Leica Cambridge Ltd.).

Для выделения и очистки тропомиозина в составе фракции термостабильных белков дрожжи выращивали до середины фазы логарифмического роста в 2 л минеральной среды, осаждали центрифугированием, отмывали дистиллированной водой и ресуспендировали в равном объеме 0.3 M калий-фосфатного буферного раствора (pH 6.9), содержащего 15 mM KCl, 25 мкМ MgCl₂ и 15 мкМ ФМСФ. Клетки разрушали с помощью стеклянных шариков на дезинтеграторе (Braun, Германия) в течение 6 мин. Клеточные оболочки и неразрушенные клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 13 000 об/мин. Супернатант, содержащий лизат клеток, кипятили на водяной бане в течение 15 мин и сразу охлаждали на льду, все последующие манипуляции проводили при 0 °C. Денатурированные белки осаждали центрифугированием (20 мин при 13 000 об/мин), из супернатанта выделяли термоустойчивые белки, осаждающиеся при насыщении сульфатом аммония от 40 до 80 %, так как в этих условиях белки Trp1p и Trp2p переходили в осадок. Полученный осадок отделяли центрифугированием и растворяли в 10 мл стерильной дистиллированной воды и раствор белков диализовали против 10 mM калий-фосфатного буферного раствора, содержащего 0.2 M KCl и 1 mM дитиотреитола (Dress et al., 1995).

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях проводили по методике Лэммли (Laemmli, 1970). Гель сканировали и анализировали при помощи программы ImageJ 1.32a (National Institutes of Health, США, http://rsb.info.nih.gov/ij/java1.3.1_03).

Результаты и обсуждение

Влияние мутации в гене *PHO85* на морфологию клеток дрожжей, цитоскелет и распределение митДНК. Наследование митохондрий является сложным процессом, в котором участвуют продукты множества генов. Для того чтобы исключить влияние генетического фона на проявление мутации в гене *PHO85*, мы использовали в работе штаммы дрожжей, имеющие разное происхождение. Генотипы штаммов представлены в таблице. Штаммы YM954, 1-GRF18, 1Г-П4405 и BWG-1-7a были использованы в качестве исходных. В результате трансформации штаммов фрагментами плазмид pDEL85 :: *LEU2* или pDEL85 :: *URA3* были получены колонии *Leu*⁺ или *Ura*⁺, синтезирующие КФ конститутивно, — *Pho*⁺. ПЦР-анализ хромосомной ДНК полученных трансформантов с использованием праймеров к гену *PHO85* выявил продукты ПЦР, соответствующие гену *PHO85* и интегрированным в него генам *LEU2* или *URA3*.

Выросшие клоны рассеивали на полной среде с глюкозой в качестве источника углерода из расчета 100—120 колоний на чашку, а затем перепечатывали на среду со спиртом. Среди выросших колоний встречались как [*rho*⁺], так и [*rho*⁻]. В процессе митотических делений клоны [*rho*⁻] сохраняли этот признак, тогда как [*rho*⁺] постепенно накапливали клоны [*rho*⁻]. Частота появления дыхательно-некомпетентных клонов у разных штаммов

Штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Генотип ^a	Происхождение
YM954	<i>MATa ade2-101 ura3-52 his3-200 leu2-3, 112 lys2-801 trp1-901 gal4-542 gal80</i>	Clonotech, USA
1-GRF18	<i>MATa his3-1, 12 leu2-3, 112 pho3</i>	G. R. Fink
1Г-П4405	<i>MATa his7-1, met13-A1 ura3 leu2-1</i>	Л. Н. Миронова
BWG-1-7a	<i>MATα ade1-100 his1 leu2 ura3</i>	М. Rozenkrantz
85-YM954	<i>MATa ade2-101 ura3-52 his3-200 leu2-3, 112 lys2-801 trp1-901 gal4-542 gal80 pho85::URA3</i>	Получен в настоящей работе
85-1-GRF18	<i>MATα his3-1, 12 leu2 pho3 pho85::LEU2</i>	То же
85-1Г-П4405	<i>MATa his7-1 met13-A1 ura3 leu2-1 pho85::LEU2</i>	» »
85-BWG-1-7a	<i>MATα ade1-100 his1 leu2 ura3 pho85::LEU2</i>	» »

^a *MATa*, *a* — аллели локуса типа спаривания; *ade2-101*, *ade1-100* — мутации в неаллельных генах, приводящие к ауксотрофии по аденину и накоплению красного пигмента; *his3-200*, *his3-1*, *12*, *his7-1*, *his4-519* — мутации в неаллельных генах, приводящие к ауксотрофии по гистидину; *trp1-901* — мутация, приводящая к ауксотрофии по триптофану; *ura3-52* — мутация, приводящая к ауксотрофии по урацилу; *leu2-3*, *112* — мутации, приводящие к ауксотрофии по лейцину; *gal4-542*, *gal80* — мутации в генах регуляторах утилизации галактозы; *pho3* — мутация, блокирующая активность конститутивной КФ1; *pho85* — мутация, приводящая к конститутивному синтезу репрессибельных КФ2 и КФ3.

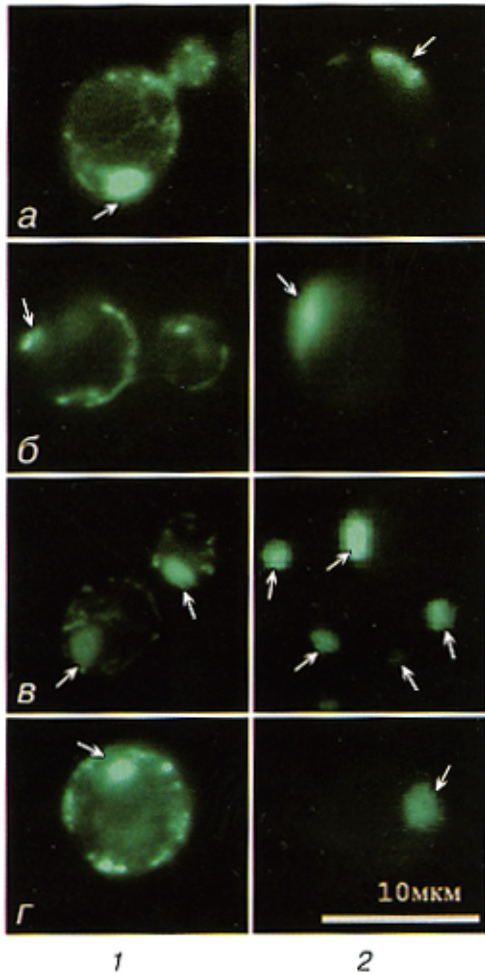


Рис. 1. Влияние дизрупции гена *PHO85* на формирование клеток без митохондриальных нуклеоидов [*rho*⁰] (окраска DAPI).

Ряд 1 — окраска клеток исходных штаммов: а — 1Г-П4405, б — 1-GRF18, в — BWG1-7a, г — YM954; ряд 2 — окраска клеток штаммов с дизрупцией гена *PHO85*, не растущих на среде со спиртом: а — 85-1Г-П4405 [*rho*⁰], б — 85-1-GRF18 [*rho*⁰], в — 85-BWG1-7a [*rho*⁰] *pho85* :: *LEU2*, г — 85-YM954 [*rho*⁰] *pho85* :: *URA3*. Стрелками указаны окрашенные ядра.

Fig. 1. Disruption of *PHO85* gene leads to the appearance of cells lacking mitochondrial nucleoids [*rho*⁰].

Line 1 — DAPI staining of original strains: а — 1Г-П4405, б — 1-GRF18, в — BWG1-7a, г — YM954; line 2 — DAPI staining of strains with disruption of *PHO85* gene and unable to grow on the ethanol medium: а — 85-1Г-П4405 [*rho*⁰], б — 85-1-GRF18 [*rho*⁰], в — 85-BWG1-7a [*rho*⁰] *pho85* :: *LEU2*, г — 85-YM954 [*rho*⁰] *pho85* :: *URA3*. Arrows — stained nuclei.

составляла от 15 до 90 %. Следует отметить, что у исходных штаммов появления клонов [*rho*⁻] не наблюдали.

Накопление дыхательно-некомпетентных клонов на фоне дизрупции *pho85* :: *LEU2* или *pho85* :: *URA3* может быть вызвано мутациями в митДНК [*rho*⁻] или нарушением распределения нуклеоидов — комплексов митДНК с белками. Гаплоидные клетки дрожжей с функциональными митохондриями содержат 10—20 нуклеоидов на клетку (Williamson, Fennell, 1979). Точковые мутации или микроделеции митохондриальной ДНК не приводят к исчезновению нуклеоидов, тогда как нарушение их распределения обусловит появление почек без митДНК [*rho*⁰].

Клоны фенотипа *Pho*⁺ *Eth*⁻ выращивали до середины логарифмической фазы роста на среде с глюкозой в каче-

стве источника углерода и выявляли митДНК окрашиванием DAPI. Результаты представлены на рис. 1. Обнаружено, что штаммы с дизрупцией гена *PHO85* не содержат митДНК и являются истинными [*rho*⁰]. Следовательно, высокая частота дыхательно-некомпетентных клонов связана с задержкой поступления митДНК в почку.

Суспензия клеток штаммов с дизрупцией гена *PHO85* содержит большое количество клеток с морфологическими изменениями, степень выраженности которых зависит от происхождения штамма. Для изучения роли киназы Pho85p в изменении морфологии клеток, структуры цитоскелета и распределении нуклеоидов выбрали штамм YM954 и его производный 85-YM954 (*pho85* :: *URA3*).

К числу наиболее характерных изменений у мутантов *pho85* можно отнести появление вздутых крупных клеток, по-видимому, задержавшихся на стадии G₂/M (рис. 2 а, 1, 1). Анализ количества клеток с нарушенным морфологии выявил достоверное различие между исходным и мутантным штаммами (YM954 — 1.3 ± 0.3 %, 85-YM954 — 13.4 ± 0.3 %) (рис. 2, в, 1). Отсутствие киназы Pho85p не сопровождается уменьшением количества почкующихся клеток (YM954 — 38.8 ± 1.0 %, 85-YM954 — 29.8 ± 0.3 %) (рис. 2, в, 2), но приводит к появлению клеток с длинными неотделившимися почками (YM954 — 2.9 ± 0.7 %, 85-YM954 — 44.1 ± 1.0 %) (рис. 2, в, 3), что свидетельствует о нарушении цитокинеза.

Известно, что распределение митохондрией связано с изменениями структур цитоскелета. У дрожжей актин участвует в формировании трех структур — кортикальных актиновых «заплат», актиновых тяжей и сократительного актомиозинового кольца (Boldogh et al., 2001). Актиновые «заплатки» связаны с инвагинацией плазматической мембраны и содержат ряд белков, вовлеченных в эндоцитоз (Schott et al., 1999). «Заплатки» являются динамичными структурами, быстро собираются и распадаются и в среднем содержат 85 филаментов (Young et al., 2004). Актиновые тяжи играют важную роль во внутриклеточном движении органелл и частиц, например транспортных экзоцитозных везикул, в растущую почку и в формировании нитей веретена в метафазе. Они служат рельсами для миозинзависимого движения «грузов» внутри клетки. Актиномиозиновое кольцо собирается в шейке почки и играет важную роль в отделении почки от материнской клетки в ходе цитокинеза. Его сокращение запускается после завершения анафазы и ведет к цитокинезу (Schott et al., 1999). Формирование различных актиновых структур контролируется внутриклеточными и внешними сигналами и координировано с клеточным циклом (Mac Alpine et al., 2000).

Для визуализации изменения структуры цитоскелета и распределения митохондриальных нуклеоидов у штаммов с дефектом гена *PHO85* использовали родамин-фаллоидин и DAPI. Результаты представлены на рис. 2, а, 2, 3, б. Как видно, у штамма с отсутствием киназы Pho85p увеличивается число актиновых «заплат» по сравнению с исходным штаммом YM954 (рис. 2, б). Ранее было показано, что у мутантов *sac6* с нарушением структуры фимбрина, стабилизирующего актиновые филаменты, размер «заплат» значительно уменьшается (Young et al., 2004).

У штаммов YM954 [*rho*⁺] и 85-YM954 [*rho*^{+/rho⁰] подсчитывали количество почек, не содержащих нуклеоидов, так как такие почки дают начало клонам [*rho*⁰]. Результаты исследования показали, что у штамма с дизрупцией гена *PHO85* почек без нуклеоидов значительно больше, чем у исходного штамма (YM954 — 9.0 ± 1.0 %, 85-YM954 — 13.4 ± 0.3 %).}

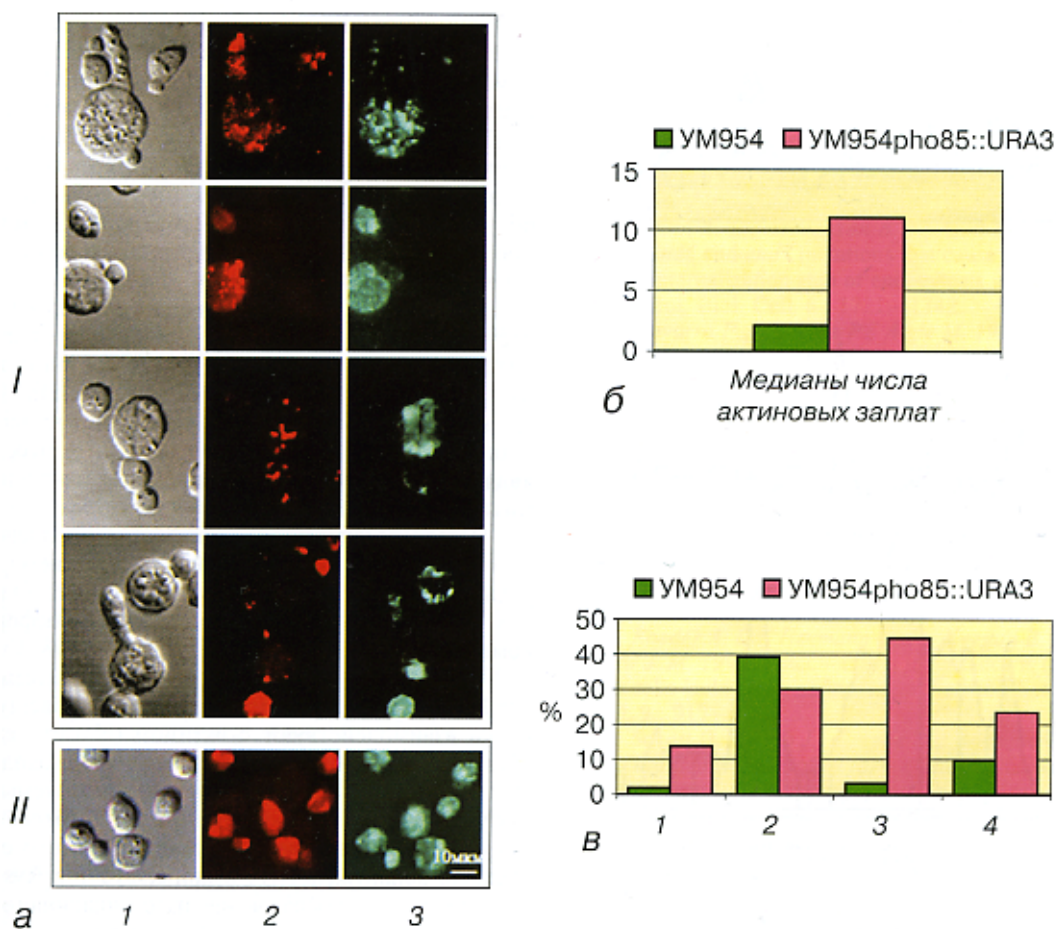


Рис. 2. Морфология клеток (поляризационный контраст), структура цитоскелета (родамин-фаллоидин) и распределение митохондриальных нуклеоидов (окраска DAPI) у штаммов YM954 [rho^+] и 85-YM954 [rho^+/rho^0].

а — ряд 1: I — аномальные клетки штамма 85-YM954, II — клетки штамма YM954; ряд 2: I — распределение актиновых «заплат» у штамма 85-YM954, II — у штамма YM954; ряд 3: I — распределение митохондриальных нуклеоидов у штамма 85-YM954, II — у штамма YM954. б — гистограмма различия в количестве актиновых «заплат» на клетку у штаммов YM954 и 85-YM954. в — гистограммы сравнения штаммов YM954 и 85-YM954: 1 — доля клеток с морфологическими изменениями от общего числа исследованных клеток; 2 — доля почкующихся клеток; 3 — доля клеток с неотделившимися почками; 4 — доля почек, не содержащих митохондриальных нуклеоидов, которые впоследствии образуют клоны [rho^0].

Fig. 2. Cell morphology (Nomarski), cytoskeleton structure (rhodamine-phalloidin staining) and distribution of mitochondrial nucleoids (DAPI staining) of strains YM954 [rho^+] and 85-YM954 [rho^+/rho^0].

а — line 1: I — cells with abnormal morphology of 85-YM954 strain, II — normal cells of YM954 strain; line 2: I — distribution of actin patches in 85-YM954 strain, II — distribution of actin patches in YM954 strain; line 3: I — distribution of mitochondrial nucleoids in 85-YM954 strain, II — distribution of mitochondrial nucleoids in YM954 strain. б — histogram of distinction between actin patches number per cell in YM954 and 85-YM954 strains. в — histogram of comparison between YM954 and 85-YM954 strains: 1 — share of cells with abnormal morphology in the total cell number in %; 2 — budding cell share in %; 3 — budding cells with cell separation defects (long buds), in %; 4 — the share of buds lacking mitochondrial nucleoids, which form eventually [rho^0] clones, in %.

85-YM954 — 22.9 ± 0.3 %), и эта разница была достоверной (рис. 2, в, 4). Отсутствие нуклеоидов в почках особенно хорошо заметно в аномальных клетках с неотделившимися почками (рис. 2, а, 2). Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что у штаммов *pho85::URA3* нарушено распределение митохондрий, и это приводит к появлению почек без митДНК. Вероятной причиной подобных нарушений может служить изменение цитоскелета, о чем косвенно свидетельствуют изменения морфологии клеток и увеличение количества актиновых «заплат».

Влияние дизрупции гена *PHO85* на спектр термостабильных белков. Ранее было обнаружено, что для нормального распределения митохондрий между дочерней и материнской клетками необходим белок Trp1p (мол. масса 23.5 кДа). Этот белок гомологичен тропомиозину высших эукариот и локализо-

ван в клетках дикого типа вместе с актиновыми тяжями. Trp1p взаимодействует с F-актином и стабилизирует актиновые тяжи (Liu, Bretscher, 1989). Дизрупция гена *TPM1* приводит к исчезновению актиновых тяжей и накоплению актиновых «заплат». Основную форму тропомиозина кодирует *TPM1* (Drees et al., 1995). При анализе последовательности 9-й хромосомы дрожжей был идентифицирован ген *TPM2*, который имеет 64.5 % гомологии с *TPM1*. Делеция *TPM2* неletalна и не имеет видимого фенотипа, но сочетание этой мутации с делецией гена *TPM1* летально. Сверхэкспрессия *TPM2* не компенсирует делецию *TPM1*, т. е. функции продуктов этих генов не перекрываются. В то же время штаммы генотипа $\Delta pho85\Delta trp1$ нежизнеспособны, что свидетельствует об участии белков в одном и том же процессе (Huang et al., 2002).

Так как Pho85p является полифункциональной протеинкиназой, она может принимать участие как в фосфо-

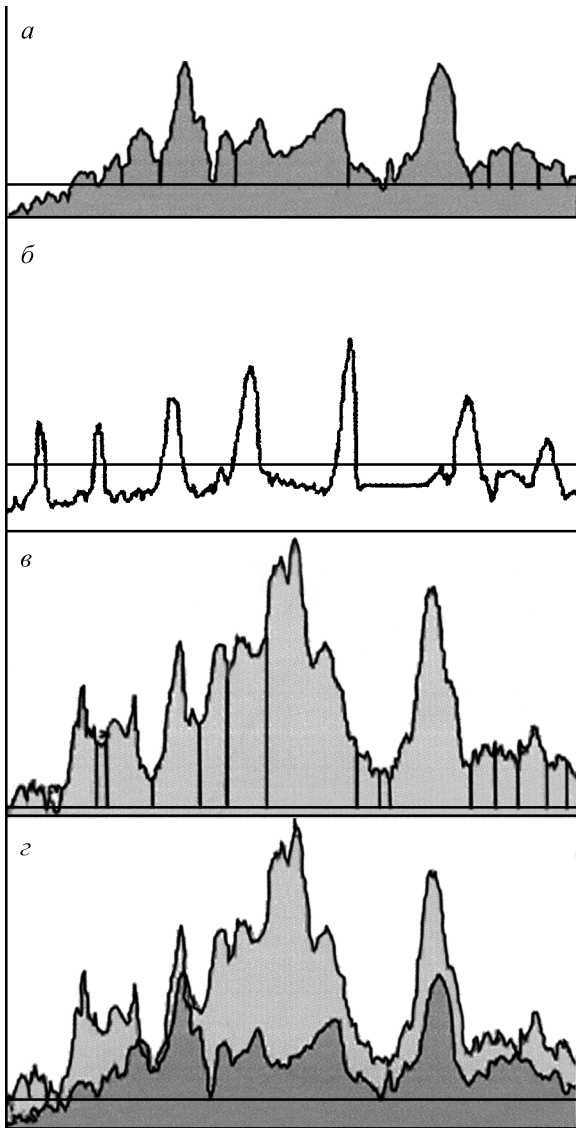


Рис. 3. Влияние дизрупции гена *PHO85* на спектр термостабильных белков.

a — белки штамма YM954; *б* — маркеры молекулярной массы (кДа): пики слева направо — 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 и 14.4; *в* — белки штамма 85-YM954; *г* — наложение спектров белков штаммов 85-YM954 и YM954.

Fig. 3. The influence of *PHO85* gene disruption on thermostable protein spectra:

a — proteins of strain YM954; *б* — molecular weight markers (kDa): peaks from the left to the right — 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 14.4; *в* — proteins of strain 85-YM954; *г* — superposition of thermostable protein fraction of 85-YM954 and YM954 strains.

рилировании белков цитоскелета, так и в регуляции транскрипции генов, кодирующих белки цитоскелета, в частности *TPM1*. В настоящей работе мы оценивали влияние дизрупции гена *PHO85* на уровень термостабильных белков, которые получали методом, используемым для выделения тропомиозинов у дрожжей (Dress et al., 1995).

Белки, полученные из штаммов YM954 и 85-YM954 (*pho85* :: *URA3*), электрофоретически разделяли в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Анализ электрофореграмм с помощью программы ImageJ 1.32a

продемонстрировал качественные изменения спектра фракции термостабильных белков, выделявшихся с тропомиозинами. У штамма 85-YM954 (*PHO85* :: *URA3*) наблюдается существенное увеличение содержания белков в области значений мол. массы от 18.4 до 35.0 кДа (рис. 3). Важно отметить, что мол. масса белка *Trp1* составляет 23.5 кДа, однако, для того чтобы сделать вывод об увеличении содержания *Trp1p*, требуется проведение экспериментов по гибридизации с моноклональными антителами к этому белку.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что отсутствие киназы *Pho85p* сопровождается изменением спектра термостабильных белков, в состав которых входят и тропомиозины — белки цитоскелета. Изменение уровня любого белка цитоскелета может приводить к нарушению его структуры (Bretscher, 2003), что, возможно, является одной из причин неправильного распределения митохондрий.

Нельзя исключить, что нарушение распределения митохондрий может быть вызвано и отсутствием фосфорилирования белков, формирующих цитоскелет. Одним из таких белков является *Rvs167p*, который фосфорилируется комплексом *Pc11p—Pho85p* (Lee et al., 1998; Colwill et al., 1999). Белок *Rvs167p* функционирует совместно с белком *Rvs161*, их роль плохо изучена, однако известно, что эти белки взаимодействуют с актином (Navarro et al., 1997). Мутанты *rvs161* и *rvs167* чувствительны к голоданию (Crozet et al., 1991), не растут на неферментируемых источниках углерода, имеют аномальный липидный состав (Desfarges et al., 1993) и дефекты эндоцитоза (Munn et al., 1995). Недавно обнаружено, что белки *Rvs167p* и *Rvs161p* могут быть вовлечены в образование актомиозинового комплекса и его стабилизацию (Breton, Aigle, 1998).

Таким образом, протеинкиназа *Pho85p* играет важную роль в распределении митохондриальной ДНК между материнской клеткой и почкой, возможно за счет влияния на структуру цитоскелета дрожжей.

Авторы выражают благодарность сотрудникам центра коллективного пользования «Хромас» БиНИИ СПбГУ за техническую поддержку при проведении исследований и Р. П. Костюченко за ценные методические советы.

Список литературы

- Гловер Д. 1988. Клонирование ДНК. М.: Мир. 538 с.
 Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. 1984. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромитов. Л.: Наука. 143 с.
 Попова Ю. Г., Падкина М. В., Самбук Е. В. 2000. Влияние мутаций в генах *PHO85* и *PHO4* на утилизацию пролина у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Генетика. 36 (12): 1622—1628.
 Самбук Е. В., Попова Ю. Г., Физикова А. Ю., Падкина М. В. 2003. Генетический анализ плеiotропных эффектов мутаций *pho85* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Генетика. 39 (8): 1039—1045.
 Самсонова М. Г., Падкина М. В., Кожин С. А., Краснопецева Н. Г. 1975. Генетико-биохимическое изучение кислот фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. V. Генетический контроль регуляции синтеза кислот фосфатазы II. Генетика. 11 (9): 104—115.
 Урбах В. Ю. 1964. Биометрические методы. М.: Наука. 415 с.
 Boldogh I. R., Yang H.-C., Pon L. A. 2001. Mitochondrial inheritance in budding yeast. Traffic. 2: 368—374.

- Breton A. M., Aigle M. 1998. Genetic and functional relationship between Rvsp, myosin and actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 34 : 280—286.
- Bretscher A. 2003. Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and receptors. *J. Cell Biol.* 160 : 811—816.
- Clark G. 1980. Staining procedures. London: Williams & Wilkins Baltimore. 91—92.
- Colwill K., Field D., Moore L., Friesen J., Andrews B. 1999. *In vivo* analysis of the domains of yeast Rvs167p suggests Rvs167p function is mediated through multiple protein interactions. *Genetics.* 152 : 881—893.
- Crouzet M., Urdaci M., Dulau L., Aigle M. 1991. Yeast mutant affected for viability upon nutrient starvation: characterization and cloning *RVS161* gene. *Yeast.* 7 : 727—743.
- Desfarges L., Durrens P., Juguélin H., Cassagne C., Bonneau M., Aigle M. 1993. Yeast mutants affected in viability upon starvation have a modified phospholipid composition. *Yeast.* 9 : 267—277.
- Dress B., Brown C., Barrell B. G., Bretscher A. 1995. Tropomyosin is essential in yeast, yet the *TPM1* and *TPM2* products perform distinct functions. *J. Cell Biol.* 128 : 383—392.
- Floyd S. R., Porro E. B., Slepnev V. I., Ochoa G. C., Tsai L. H., De Camilli P. 2001. Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2. *J. Biol. Chem.* 276 : 8104—8110.
- Huang D., Moffat J., Andrews B. 2002. Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. *Mol. Cell Biol.* 22 : 5076—5088.
- Huang D., Patrick G., Moffat J., Tsai L. H., Andrews B. 1999. Mammalian Cdk5 is functional homologue of the budding yeast Pho85 protein kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 14 445—14 450.
- Hunter T., Plowman G. D. 1997. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* 22 : 18—22.
- Johnson G. D., Nogueira A. G. M. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Meth.* 43 : 349—350.
- Kaffman A., Herskowitz I., Tjian R., O'Shea E. K. 1994. Phosphorylation of the transcription factor Pho4 by a cyclin-CDK complex, Pho80—Pho85. *Science.* 263 : 1153—1156.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15 : 680—685.
- Lee J., Colwill K., Aneliunas V., Tennyson C., Moore L., Ho Y., Andrews B. 1998. Interaction of yeast Rvs167 and Pho85 cyclin-dependent kinase complexes may link the cell cycle to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 8 : 1310—1321.
- Lenburg M. E., O'Shea E. K. 1996. Signalling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* 21 : 383—387.
- Liu H. P., Bretscher A. 1989. Purification of tropomyosin from *Saccharomyces cerevisiae* and identification of related proteins in *Schizosaccharomyces* and *Physarum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 90—93.
- Liu H. P., Bretscher A. 1992. Characterization of *TPM1* disrupted yeast cells indicates as involvement of tropomyosin in directed vesicular transport. *J. Cell Biol.* 118 : 285—299.
- Mac Alpine D. M., Perlman P. S., Butow R. A. 2000. The number of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO J.* 4 : 767—775.
- Measday V., Moore L., Retnakaran R., Lee J., Donoviel M., Neuman A. M., Andrews B. 1997. A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol. Cell Biol.* 17 : 1212—1223.
- Morgan D. O. 1996. The dynamics of cyclin-dependent kinase structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 : 767—772.
- Munn A. L., Stevenson B. J., Geli M. I., Piezman H. 1995. *end5*, *end6* and *end7* mutations that cause actin de-localization and block internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 6 : 1721—1742.
- Navarro P., Durrens P., Aigle M. 1997. Protein-protein interaction between the *RVS161* and *RVS167* gene products *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. biophys. acta.* 2 : 187—192.
- Nishizawa M., Kanaya Y., Toh-E. A. 1999. Mouse cyclin-dependent kinase (Cdk) 5 is a functional homologue of a yeast Cdk, Pho85 kinase. *J. Biol. Chem.* 274 : 33 859—33 862.
- Ogawa N., DeRisi J., Brown P. O. 2000. New components of system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 4309—4321.
- Oshima Y. 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* 72 : 323—334.
- Roeder A. D., Hermann G. J., Keegan B. R., Thatcher S. A., Shaw J. M. 1998. Mitochondrial inheritance is delayed in *S. cerevisiae* cells lacking the serine/threonine phosphatase Ptc1. *Mol. Cell Biol.* 9 : 917—930.
- Schott D. T., Ho J., Pruyne D., Bretscher A. 1999. The COOH-terminal domain of Myo2p a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J. Cell Biol.* 147 : 791—808.
- Shemer R., Meimoun A., Holtzman T., Kornitzer D. 2002. Regulation of the transcription factor Gen4 by Pho85 cyclin Pcl5. *Mol. Cell Biol.* 22 : 5395—5404.
- Smith D. 2003. Cdk5 in neuroskeletal dynamics. *Neurosignals.* 12 : 239—251.
- Timblin B. K., Tatchell K., Bergman L. W. 1996. Deletion of the gene encoding the cyclin-dependent protein kinase Pho85 alters glycogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 143 : 57—66.
- Williamson D. H., Fennell D. J. 1979. Visualization of yeast mitochondrial DNA with fluorescent stain «DAPI». *Methods Enzymol.* 56 : 728—733.
- Yaffe M. P. 1999. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science.* 283 : 1493—1497.
- Yang H.-C., Palazzo A., Swayne T. C., Pon L. A. 1999. A retention mechanism for distribution of mitochondria during cell division in budding yeast. *Curr. Biol.* 9 : 1111—1114.
- Young M. E., Cooper J. A., Bridgman P. C. 2004. Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *J. Cell Biol.* 166 : 629—635.
- Zeng G., Yu X., Cay M. 2001. Regulation of yeast actin cytoskeleton — regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 3759—3773.

THE LACK OF CYCLIN-DEPENDENT PHOSPHOPROTEIN KINASE Pho85p LEADS TO DEFECTS IN MITOCHONDRIAL NUCLEOID TRANSMISSION IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

E. V. Sambuk,¹ A. Yu. Fisikova, K. V. Zakharova, A. M. Smirnov, M. V. Padkina

Biological Research Institute, St. Petersburg State University; ¹ e-mail: sambuk@mail.ru

Cyclin-dependent phosphoprotein kinases (CDK) play essential role in the regulation of the progression through different phases of the cell cycle, being also involved in metabolic regulation and in actin cytoskeleton organization. The *Saccharomyces cerevisiae* CDK Pho85p is associated with 10 different cyclins and phosphorylates different substrates, among these transcription factors Pho4p and Gcn4p, and a protein involved in actin polymerization being a homologue of amphiphysin 1 of mammalian Rvs167p. It is known that mutations in the *PHO85* gene have a multiple pleiotropic effects, one of these effects being a rapid accumulation of mitochondrial [*rho*⁻] mutations observed on the background of gene *PHO85* inactivation. In this study it was shown that the appearance of [*rho*⁻] clones is a result of some defects in mitochondrial nucleoid transmission from mother to bud cells.