

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-251

ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРИЯ
ПРИ НАРУШЕНИИ ВАКУОЛЯРНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ АТФАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ РОДА *OGATAEA*
СВЯЗАНА С ВХОДОМ КАТИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЬ ИЗ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ*

HYPERSENSITIVITY TO SODIUM DODECYL SULFATE IN *OGATAEA* YEASTS WITH INACTIVATED
VACUOLAR CALCIUM ATPASE IS EXERTED BY CALCIUM INFLUX INTO THE CYTOSOL FROM
ENVIRONMENT

М. В. Кулакова, М. Д. Пахомова, В. А. Бидюк, М. О. Агафонов

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

M. V. Kulakova, M. D. Pakhomova, V. A. Bidiuk, M. O. Agaphonov

Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow

✉ kulakova_masha95@mail.ru

Аннотация

В данной работе мы показали, что SDS провоцирует Cch1-независимый вход Ca^{2+} из окружающей среды, а гиперчувствительность к SDS при нарушении Pmc1 является результатом неспособности противостоять повышению концентрации кальция в цитозоле, тогда как инактивация Cch1 частично восстанавливает эту способность. Это подразумевает наличие дополнительной функции Cch1, кроме транспорта Ca^{2+} в клетку.

Abstract

Here we show that SDS provokes Cch1-independent Ca^{2+} influx into cytosol from the environment. The SDS hypersensitivity in mutants with inactivated Pmc1 results from inability to cope with the cytosolic calcium concentration increase, while Cch1 inactivation partially rescues this trait. This implies the presence of an additional Cch1 Ca^{2+} function beyond cellular Ca^{2+} transport.

У дрожжей, как и у других эукариот, катионы кальция играют роль вторичного мессенджера, позволяющего клеткам реагировать на различные внешние стимулы. Клетке необходимо поддерживать концентрацию Ca^{2+} в цитозоле ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) на низком уровне. Это осуществляется за счет перекачивания Ca^{2+} из цитозоля во внутриклеточные депо. Основным депо Ca^{2+} в дрожжах является вакуоль, куда кальций откачивается из цитоплазмы за счет функционирования специальных переносчиков, включая АТФазу Pmc1, а из внешней среды он попадает в клетку через плазматическую мембрану с помощью белков Cch1 и Mid1 [1].

У дрожжей рода *Ogataea* инактивация АТФазы Pmc1 вызывает гиперчувствительность к додецилсульфату натрия (SDS), которая не сопровождается дефектами клеточной стенки. Было показано, что такой фенотип супрессируется нарушением гена *CCH1* [2]. Это позволяло предполагать, что гиперчувствительность к SDS при нарушении Pmc1 связана с повышением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, а инактивация Cch1 снижает ее. Однако прямого подтверждения того, что нарушения генов *PMC1* и *CCH1* влияют на концентрацию кальция в цитозоле, получено не было. Для наблюдения за изменением $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ был выбран генетически кодируемый индикатор Ca^{2+} GEM-GECO. Максимум эмиссии свободной от кальция формы индикатора находится на 513 нм, а кальций-связанной формы — около 450 нм.

Ранее нами было показано, что продукция индикатора GEM-GECO в некоторых случаях влияла на рост клеток дрожжей *O. parapolymorpha*, но при этом она не вызывала их гибели [3]. Это позволило нам применять его для отслеживания изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$. Для измерения флуоресценции GEM-GECO в индивидуальных клетках был использован метод проточной цитометрии. В качестве характеристики $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ использовали соотношение значений интенсивностей флуоресценции при длине волны 450 и 525 нм (FL_{450}/FL_{525}).

Добавление минимальной ингибирующей концентрации (МИК) SDS в культуральную среду вызывало резкий скачок $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках дикого типа, после которого уровень цитозольного кальция постепенно снижался. Мы предположили, что SDS в более низких концентрациях тоже будет влиять на гомеостаз Ca^{2+} . Действительно, SDS вызывал значительное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ даже в концентрации в пять раз ниже МИК. При этом снижение концентрации SDS принципиально не меняло динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, однако снижалась амплитуда ответа.

* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проекты № 24-14-00090 и 21-74-10115).

© М. В. Кулакова, М. Д. Пахомова, В. А. Бидюк, М. О. Агафонов, 2024

Рост $[Ca^{2+}]_{цит}$ был обусловлен притоком Ca^{2+} из внешней среды, поскольку присутствие хелатирующих агентов нивелировало этот эффект. В клетках с нарушением Pmc1, в отличие от клеток дикого типа, $[Ca^{2+}]_{цит}$ не снижалась, а продолжала расти. Примечательно, что динамика колебаний $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на SDS зависела от того, анализировалась ли культура в экспоненциальной или стационарной фазе роста. Инактивация Cch1 у клеток *pmc1-Δ* в экспоненциальной фазе частично восстанавливала способность дрожжей справляться с повышением $[Ca^{2+}]_{цит}$, тогда как в стационарной культуре ее эффект был противоположным. Снижение концентрации SDS до 0,004 % (МИК для *pmc1-Δ*) позволило клеткам *pmc1-Δ* в логарифмической фазе со временем стабилизировать уровень цитозольного кальция, в то время как нарушение *CCH1* у двойного мутанта *pmc1-Δ cch1-Δ* заметно снизило амплитуду ответа клеток на добавление SDS. У клеток *pmc1-Δ cch1-Δ* в стационарной фазе наоборот амплитуда подъема $[Ca^{2+}]_{цит}$ выше, чем у *pmc1-Δ*. Однако со временем у клеток с нарушением Pmc1 $[Ca^{2+}]_{цит}$ начинает стремительнее расти, чем у клеток двойного мутанта.

Стоит отметить, что в основном нарушение Cch1 не снижало амплитуду ответа клеток на SDS. Это говорит о том, что SDS-индуцированный приток Ca^{2+} не требует канала Cch1. Вместе с тем его инактивация в некоторой степени восстанавливала способность мутанта с нарушением АТФазы Pmc1 противостоять повышению $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на воздействие SDS. Это подразумевает наличие дополнительной функции Cch1 помимо транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану.

Литература

1. Lange M., Peiter E. Calcium Transport Proteins in Fungi: The Phylogenetic Diversity of Their Relevance for Growth, Virulence, and Stress Resistance // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 10. P. 1–14.
2. Fokina A., Sokolov S. et al. Inactivation of Pmc1 vacuolar Ca^{2+} ATPase causes G_2 cell cycle delay in *Hansenula polymorpha* // *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11 (4). P. 778–784.
3. Kulakova M. V., Karginov A. V. et al. The GEM-GECO Calcium Indicator Is Useable in *Ogataea parapolymorpha* Yeast, but Aggravates Effects of Increased Cytosolic Calcium Levels // *Intern. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23 (17). P. 10004.