

## БІЛОК Yap1p, ЗАДІЯНИЙ В АКТИВАЦІЇ КАТАЛАЗИ В КЛІТИНАХ ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae* ЗА ДІЇ НІТРОЗИТИВНОГО СТРЕСУ

У даній роботі досліджувалася роль регуляторного білка Yap1p у регуляції активності каталази у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за дії нітрозитивного стресу. Для досліджень було вибрано штам дріжджів YPH250 та його похідний YPH250-YAP1A, дефектний за геном регуляторного білка Yap1p. Клітини дріжджів обох штамів обробляли нітропрусидом натрію, що є донором оксиду азоту (II), у концентраціях 0,25; 0,5, 1,0 і 2,5 мМ. У дріжджів дикого штаму YPH250 спостерігалось достовірне зростання активності каталази зі збільшенням концентрації нітропрусиду від 0,5 до 2,5 мМ порівняно з контролем, тоді як активність каталази клітин дефектного штаму YPH250-YAP1A залишалася незмінною і нижчою, ніж у дикого штаму. Отримані результати можуть свідчити про участь білка Yap1 у регуляції активності каталази дріжджів за умов нітрозитивного стресу. Також проводилося визначення активностей ферментів ізоцитратдегідрогенази, малатдегідрогенази, глутатіонредуктази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, але достовірних змін у їх активностях не було.

**Ключові слова:** *Saccharomyces cerevisiae*, нітропрусид натрію, оксид азоту (II), нітрозитивний стрес, антиоксидантний захист, регуляторний білок Yap1p, каталаза.

### Вступ

Нітропрусид натрію (натрійнітрозонентаціаноферат) – речовина, що розкладається з утворенням оксиду азоту (II) – NO. У живих системах оксид азоту (II) утворюється шляхом окислення одного з термінальних атомів нітрогену L-аргініну. Дана реакція каталізується NO-синтазою [3; 6]. NO є вільним радикалом і при взаємодії із супероксиданіоном ( $O_2^-$ ) утворює пероксинітрит ( $ONOO^-$ ), який, у свою чергу, може взаємодіяти із сірко- та металовмісними білками, тіоловими групами біомолекул, окислювати майже всі класи макромолекул та низькомолекулярних сполук [5; 11]. У клітинах є системи, які захищають їх від згубної дії оксидантів – так звані системи антиоксидантного захисту. Каталаза (пероксид водню: пероксид водню оксидоредуктаза, 1.11.1.6) – один із ключових ферментів антиоксидантного захисту. На сьогодні розшифровано амінокислотні послідовності 74 видів каталаз. З них 29 бактеріальних, 30 рослинних, 7 тваринних та 8 грибового походження. У клітинах дріжджів наявні дві форми каталази: перокси-сомальна каталаза А й цитозольна каталаза С, які, відповідно, кодуються генами *CTA1* та *CTT1*. Молекула ферменту складається з чотирьох субодиниць і містить гем в активному центрі. Розщеплюючи пероксид водню ( $H_2O_2$ ) до води та кисню, каталаза тим самим запобігає його можливому наступному перетворенню у небезпечний для живих клітин гідроксилрадикал ( $OH$ ). Одна молекула ферменту розкладає до 40000 молекул  $H_2O_2$  за 1 с [7; 12]. Глутатіонредуктаза є ферментом метаболізму глутатіону – важливого низькомолекулярного антиоксиданту в клітинах дріжджів, використовує як

кофермент НАДФН – продукт реакції, каталізованої глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназою [10]. Ізоцитратдегідрогеназа й малатдегідрогеназа беруть участь в енергетичних процесах, що відбуваються у клітинах і, водночас, проявляють чутливість до окислення вільними радикалами [9]. Регуляторний білок Yар1р задіяний у формуванні адаптивної відповіді на оксидативний стрес у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. [8] Відповідно він може впливати на активності ферментів антиоксидантного захисту. Тому метою нашої роботи було вивчення можливої ролі даного білка в регуляції активності каталази за умов нітрозитивного стресу, викликаного обробкою клітин дріжджів нітропрусидом.

### Матеріали й методи

У роботі були використані такі реактиви: фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), ізоцитрат, малат, глюкозо-6-фосфат, окислений глутатіон виробництва фірми “Sigma” (США); нітропрусид натрію, НАДФН, НАДФ, НАД фірми “Reanal” (Угорщина), а також дріжджовий екстракт фірми “BioGene” (Великобританія). Інші реактиви – вітчизняного виробництва чистоти не нижче “чда”.

Дослідження проводили на дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* дикого штаму YPH250 (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52*) та його похідного YPH250-YAP1Δ (*MATa trp1-Δ1 his3-Δ200 lys2-801 leu2-Δ1 ade2-101 ura3-52 yap1Δ::HIS3*). Спочатку нарощували нічну культуру клітин дріжджів, з якої у розрахунку 300 тисяч клітин на 1 мл вирощували культуру стаціонарної фази (72 год росту) у середовищі YPD (1% дріжджового екстракту, 2% пептону, 2% глюкози від загального об'єму середовища) при температурі 28°C на шейкері в режимі 175 об/хв. Суспензію клітин дріжджів протягом однієї години інкубували у присутності нітропрусиду таких концентрацій: 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 мМ при 28°C і режимі 225 об/хв. Також готували контроль, у який замість нітропрусиду додавали дистильовану воду. Клітини осаджували центрифугуванням при 3000 g протягом 5 хв, ресуспендували в середовищі гомогенізації (50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,5), 0,5 мМ ЕДТА), додаючи ФМСФ для інгібування протеаз, та руйнували за допомогою скляних бусинок діаметром 0,5 мм протягом 16 хв із чергуванням: 1 хв дезінтеграції – 1 хв охолодження [4]. Суспензії зруйнованих клітин відцентрифугували при 15000 g протягом 15 хв. В отриманих супернатантах визначали активності ферментів при 25°C спектрофотометричним методом шляхом реєстрації зміни оптичної густини приготованих проб у відповідних для кожного ферменту сумішах [4; 10].

Активність каталази визначали за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Росія) за реакцією розкладу пероксиду водню при 240 нм. Реакцію починали додаванням субстрату. У розрахунку активності використовували молярний коефіцієнт екстинції для  $\text{H}_2\text{O}_2$  –  $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [4]. Відновлення НАД<sup>+</sup> дегідрогеназами ізоцитрату та малату чи НАДФ<sup>+</sup> глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою та окислення НАДФН глутатіонредуктазою реєстрували на спектро-

фотометрі SPECOL. 211 (Carl Zeiss Jena, Німеччина) при довжині хвилі 340 нм. Реакцію запускали внесенням у кювету супернатанту. Коефіцієнт екстинкції для даних ферментів становить  $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [10]. Одиниці активності ферментів виражали через кількість білка супернатанту, що перетворює 1 мкмоль субстрату чи утворює 1 мкмоль продукту за 1 хв у перерахунку на міліграм білка. Концентрацію білка визначали методом Бредфорд [1], використовуючи альбумін сироватки бика як стандарт.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою t-критерію Стьюдента [2]. Результати представлено як середнє значення  $\pm$  відхилення від середнього значення ( $M \pm m$ ).

### Результати й обговорення

Для вивчення нітрозигивного стресу *in vivo* застосовують різні азотовмісні сполуки, що генерують оксид азоту (II). У даній роботі як NO-донор був використаний нітропрусид натрію [5]. При обробці клітин дріжджів нітропрусидом у концентраціях 0,5; 1; 2,5 мМ штаму YPH250 відбувалося достовірне зростання активності каталази (рис. 1).

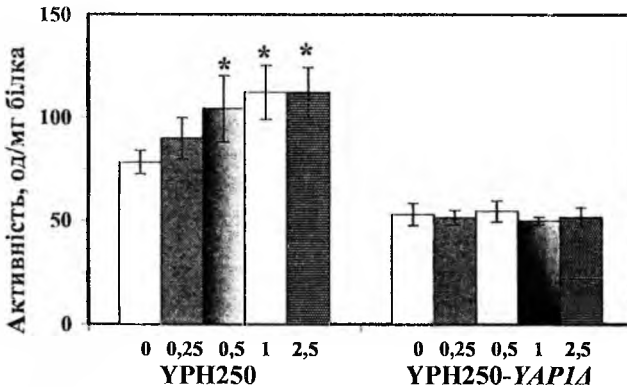


Рис. 1. Активність каталази у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штамів YPH250 та YPH250-YAPIA при обробці нітропрусидом у різних концентраціях.

\*Значення достовірно відрізняються від контролю ( $P < 0,05$ ).

Зростання активності ферменту зумовлене тим, що викликаний нітропрусидом нітрозигивний стрес призводить до збільшення кількості біологічних оксидантів, у тому числі й пероксиду водню, і, відповідно, до підвищення активності антиоксидантних ферментів, у даному випадку каталази, при збільшенні концентрації нітропрусиду. У дефектного штаму активність ферменту при всіх використаних концентраціях нітропрусиду не відрізнялася від контролю і була нижчою за таку у дикого штаму (рис.1). Це можна по-

яснити відсутністю у нього активного гена *YAP1*, який кодує синтез відповідного регуляторного білка. Відомо, що білок Yap1p є фактором регуляції транскрипції родини білків AP-1, який бере участь у формуванні захисної реакції клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у відповідь на оксидативний стрес і діє як сенсор пероксиду водню [8]. Функціональна чутливість білка забезпечується наявністю вільних цистеїнових залишків. Як наслідок, активується транскрипція генів, необхідних для антиоксидантного захисту, включаючи й гени *CTA1* та *CTT1*, що кодують ізоформи каталази. Тому можна зробити припущення, що регуляція активності каталази, для якої  $H_2O_2$  є основним субстратом, може здійснюватися шляхом регуляції транскрипції генів *CTA1* та *CTT1* білком Yap1p. Відповідно при відсутності експресії гена *YAP1* зростання концентрації нітропрусиду не призводить до активації каталази у клітинах дріжджів. Такий ефект і спостерігався у дефектного штаму при всіх використаних концентраціях нітропрусиду (рис. 1).

Окрім того, білок Yap1, можливо, не лише “відчуває” появу  $H_2O_2$  в середовищі, але й реагує на нітрозопохідні, генеровані оксидом азоту у ході нітрозитивного стресу. Подібною властивістю характеризується регуляторний білок OxyR, наявний у бактерій *Escherichia coli*, який може активуватися як  $H_2O_2$ , так і S-нітрозотіолами за рахунок наявності вільного цистеїнового залишку [5].

Активності ферментів ізоцитратдегідрогенази, малатдегідрогенази, глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази достовірно не змінювалися в обох дослідних штаммах при інкубації з нітропрусидом натрію (табл.1).

**Таблиця 1.** Активності ферментів ізоцитратдегідрогенази, малатдегідрогенази, глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (од/мг білка) у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штамів YPH250 та YPH250-*YAP1A* при обробці нітропрусидом таких концентрацій: 0,25; 0,5; 1; 2,5.

Концентрація нітропрусиду натрію, мМ	0	0,25	0,5	1	2,5
<b>глутатіонредуктаза</b>					
YPH250	48,3±6,9	51,7±5,7	47,3±4,9	47,4±6,0	41,1±5,3
YAP1A	36,4±5,9	39,3±6,1	39,4±5,6	35,8±5,2	34,4±5,8
<b>глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа</b>					
YPH250	233±17	219±17	211±16	207±15	185±10
YAP1A	186±12	169±9,5	208±10	200±7	194±7
<b>ізоцитратдегідрогеназа</b>					
YPH250	133±7,2	132±11,4	122±12,3	135±15,5	124±11,3
YAP1A	148±16	198±34	187±35	192±37	166±26
<b>малатдегідрогеназа</b>					
YPH250	9,55±0,52	10,7±1,27	9,27±1,22	12,5±1,52	10,2±0,94
YAP1A	10,4±0,6	10,5±2,3	10,2±1,0	11,3±0,7	8,9±0,8

Нітропрусид у використаних нами концентраціях не впливає на активності ферментів, поданих у таблиці. Слід зауважити, що активність глутатіонредуктази у контролі дикого штаму дріжджів була вища, ніж у дефектного (табл.1). П.А. Wiatrowski та співавтори показали, що регуляторний білок Yap1 здатний активувати транскрипцію гена *GLR1*, який кодує даний фермент у клітинах дріжджів [8].

### Висновки

1. Під дією нітропрусиду натрію у концентраціях 0,5; 1; 2,5 мМ у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* відбувається зростання активності каталази.

2. Обробка клітин дріжджів нітропрусидом натрію не впливає на активності ізоцитратдегідрогенази, малатдегідрогенази, глутатіонредуктази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у штамів дріжджів YPH250 та YPH250-YAP1Δ.

3. Отримані результати дають можливість припустити, що регуляторний білок Yap1 задіяний в активації каталази у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за умов нітрозитивного стресу, викликаного дією нітропрусиду.

1. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – № 72. – P. 289-292.
2. Brooks S. P. A simple computer program with statistical tests for the analysis of enzyme kinetics // BioTechniques. – 1992. – Vol. 13. – P. 906-911.
3. Hausladen A., Gow A. J., and Stamler J. S.. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin // Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 14100-14105.
4. Lushchak V.I., Semchyshyn H.M., Mandryk S.Y., Lushchak O.V. Possible role of superoxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions // Arch. Bioch. Biophys. – 2005. – Vol. 441. – P. 35-40.
5. Marshall H. E., Merchant K., and Stamler J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression // FASEB Journal. – 2000. – Vol. 14. – P. 1889-1897.
6. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – № 12. – P. 4003-4008.
7. Ruis H., Koller F. Biochemistry, molecular biology, and cell biology of yeast and fungal catalases // In: Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1997. – P. 309-342.
8. Wiatrowski H. A. and Carlson M. Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. // Eucaryotic Cell. – 2003. – Vol. 2. – № 1. – P. 19-26.
9. Yang E.S., Richter C., Chun J.S., Huh T.L., Kang S.S., and Park J.W. Inactivation of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase by nitric oxide // Free Rad. Biol. Med. – 2002. – Vol. 33. – № 7. – P. 927-937.
10. Луцак О.В., Багнюкова Т.В., Луцак В.І. Вплив амініотриазолу на активність каталази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у тканинах двох видів жаб – *Rana ridibunda* і *Rana esculenta* // Український біохімічний журнал. – 2003. – Т. 75. – № 4. – С. 45-50.
11. Мсцилен І.Ф., Пішак В.П., Григор'єва Н.П. Біомолекули: структура та функції. – Чернівці: Медик, 2003. – 150 с.
12. Стросв Е.А. Биологическая химия: Учебник для фармац. ин-тов и фармац. фак. мед. ин-тов. – М.: Высш. школа, 1986. – 479 с.

In this work the role of regulatory protein Yap1 in activation of catalase in yeast cells during nitrosative stress was investigated. For investigation yeast strain YPH250 and its derived strain YPH250-YAP1Δ, which is defected on the gene of regulatory protein Yap1 were used. Yeast cells of both strains were treated by sodium nitroprusside, the donor of nitric (II) oxide, at concentrations of 0,25, 0,5, 1,0 and 2,5 mM. As the result, the activity of catalase was increased in yeast strain YPH250, when the concentration of nitroprusside was increased from 0,5 to 2,5 mM, unlike defective strain YPH250-YAP1Δ, where its activity was not changed and lower than in wild type. These results may witness of participation of protein Yap1p in regulation of yeast catalase activity under nitrosative stress conditions. We also measured activities of glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase, and no significant changes in activities were found.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, sodium nitroprusside, nitric (II) oxide, nitrosative stress, antioxidant defense, regulatory protein Yap1p, catalase.

УДК 577.22+577.218+577.152.199  
ББК 28.072+28.4

Микола Никорак, Олег Луццак

## ВІПЛИВ НІТРОПРУСИДУ НАТРІЮ НА КЛІТИНИ ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae* ШТАМІВ YPH250 ТА YPH250-YAP1Δ

Досліджували роль білка Yap1 у регуляції активності супероксиддисмутази та аконітази дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за дії нітросуриду натрію. Для досліджень було вибрано штамп дріжджів YPH250 та його похідний YPH250-YAP1Δ, дефектний за геном регуляторного білка Yap1. Суспензію клітин дріжджів обробляли нітросуридом натрію, що є донором оксиду азоту (II), у концентраціях 0,25; 0,5; 1; 2,5 мМ. У клітинах дріжджів дикого штаму YPH250 спостерігали достовірне зростання активності супероксиддисмутази при концентрації нітросуриду від 0,5 до 2,5 мМ, тоді як активність даного ферменту в клітинах дефектного штаму YPH250-YAP1Δ залишалася незмінною. Активність аконітази у клітинах дикого штаму дріжджів знижувалась зі зростанням концентрації нітросуриду, тоді як у дріжджів штаму YPH250-YAP1Δ активність даного ферменту не змінювалася. Отримані результати дозволяють припустити, що білок Yap1 бере участь у регуляції активності супероксиддисмутази за дії нітросуриду натрію і задіяний у регуляції активності однієї з ізоформ аконітази.

**Ключові слова:** *Saccharomyces cerevisiae*, нітросурид натрію, оксид азоту (II), антиоксидантний захист, регуляторний білок Yap1, супероксиддисмутаза, аконітаза.

### Вступ

Оксид азоту II ( $\text{NO}$ ) є активованою формою азоту й вільним радикалом, оскільки містить неспарений електрон. За різних умов він може виконувати як прооксидантну, так і антиоксидантну роль. Висока розчинність сполуки у ліпідах, а також здатність до дифузії зумовлюють високу токсичність  $\text{NO}$  для живих організмів. Проте у 90-х роках було встановлено, що  $\text{NO}$  синтезується в організмі людини НАДФ<sup>+</sup>-залежною  $\text{NO}$ -синтазою і виступає біорегулятором у нервовій, кровоносній, імунній системах і у шлунково-кишковому тракті та є основним ендogenousним вазодилататором [7].  $\text{NO}$  відіграє важливу