

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 (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 NO для живих організмів. Проте у 90-х роках було встановлено, що NO синтезується в організмі людини НАДФ⁺-залежною NO -синтазою і виступає біорегулятором у нервовій, кровоносній, імунній системах і у шлунково-кишковому тракті та є основним ендogenousним вазодилататором [7]. NO відіграє важливу

роль у синаптичній передачі нервового імпульсу. Виникнення та розвиток цих хвороб останнім часом пов'язують із відхиленням рівня активованих форм кисню від стаціонарного (steady-state level) в організмі. Зміщення балансу між їх утворенням та знешкодженням у бік першого призводить до розвитку оксидативного стресу [12].

NO відіграє важливу роль в імунному захисті організму через свою бактерицидну дію. Молекулами-мішенями для NO є кисневі радикали. При взаємодії NO з киснем або його активними формами (супероксидним аніоном) утворюються надзвичайно токсичні сполуки: пероксинітрит (ONOO^-), оксид азоту (IV) та гідроксильний аніон, які виявляють надзвичайно сильну цитотоксичну дію [5]. NO також може пошкоджувати залізовмісні білки, зокрема, гемоглобін, ферменти мітохондрій, циклу Кребса, синтезу білка [11].

Для вивчення впливу оксиду азоту використовують різні NO -донори. Нітропрурид натрію (натрійнітрозопентаціаноферрат) є одним із його генераторів і при нейтральних значеннях рН може діяти як нітрозілюючий агент.

Регуляторний білок Yap1, що містить сульфгідрильні групи, є чутливим до окислення і регулює експресію антиоксидантних ферментів [9].

Мета роботи полягала у дослідженні ролі білка Yap1 у регуляції супероксиддисмутази та аконітази за дії нітроприсури натрію.

Матеріали й методи

Штами пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (*MATa trp1- Δ 1 his3- Δ 200 lys2-801 leu2- Δ 1 ade2-101 ura3-52*) та їх похідний YPH250-*YAP1 Δ* (*MATa trp1- Δ 1 his3- Δ 200 lys2-801 leu2- Δ 1 ade2-101 ura3-52 yap1::HIS3*) люб'язно надані доктором Йошіхара Іної (Кіото, Японія).

Реактиви: дріжджовий екстракт ("BioGene", Велика Британія); N,N,N',N' – тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД); нітропрурид натрію, кверцетин ("Reanal", Угорщина), фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ), ізоцитрат ("Sigma Chemical Co", США). Решта реактивів – вітчизняного виробництва (чистоти не нижче "чда").

Живильне середовище та умови росту. Культури клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* вирощували при 28°C на шейкері (175 об/хв) у середовищі YPD, що містило: 20 г/л глюкози, 20 г/л пептону та 10 г/л дріжджового екстракту. Вихідна концентрація клітин на початку експоненційної фази становила $0,3 \times 10^6$ клітин/мл. Після досягнення культурою дріжджів стаціонарної фази росту (72 год) клітини осаджували центрифугуванням (6500 g, 5 хв), після чого їх ресуспендували в середовищі гомогенізації (50 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,5), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду). Суспензію клітин дріжджів протягом однієї години інкубували у присутності нітроприсури натрію у таких концентраціях: 0,25; 0,5; 1; 2,5 мМ на шейк ері (225 об/хв) при температурі 28°C.

Приготування супернантків. Клітини дезінтегрували на вортекс-міксері зі скляними бусинками діаметром 450–500 мкм ("Sigma Chemical Co", США) в середовищі гомогенізації. Скляні бусинки й незруйновані рештки

клітин осаджували (15000 г, 15 хв). Отримані супернатанти використовували для подальших досліджень.

Визначення активностей ферментів. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за ступенем інгібування реакції окислення кверцетину супероксиданіоном при довжині хвилі 406 нм [6]. Для генерації супероксиданіону використовували TEMED. За одиницю активності приймали таку кількість білка, яка інгібувала швидкість реакції окислення кверцетину на 50% від максимальної. Визначення активності ферменту проводили при температурі 25°C на спектрофотометрі SPEKOL 211. Активність аконітази визначали за зростанням кількості цис-аконітату при довжині хвилі 240 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Ленінград, СРСР). За одиницю активності аконітази приймали таку кількість білка, що утворює 1 мкМ цис-аконітату за 1 хв. Для обчислення активності ферменту використовували молярний коефіцієнт екстинкції $3,701 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для цис-аконітату [1]. Реакцію починали внесенням у кювету супернатанту. Ферментативну активність виражали як зміну величини оптичного поглинання проби при відповідній довжині хвилі за 1 хв.

Концентрацію білка у пробах визначали методом М.М. Bradford [10], використовуючи як стандарт альбумін сироватки бика.

Статистична обробка. Результати обробляли статистично за допомогою програми MYNOVA, застосовуючи *t*-критерій Стьюдента [2].

Результати й обговорення

У попередніх роботах ми отримали активацію СОД за дії нітропрусиду натрію у клітинах дріжджів штаму YPH250 (неопубліковані дані), через що було цікаво перевірити тенденцію активності даного ферменту в штаму, дефектного

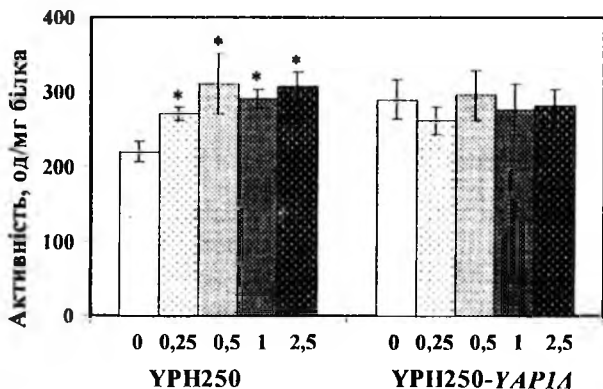


Рис. 1. Активність супероксиддисмутази у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штамів YPH250 та YPH250-YAPIA при інкубації з нітропрусидом натрію у різних концентраціях.

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

за регуляторним білком Yap1, що є одним із визначальних факторів відповіді клітин на оксидативний стрес. Обробка нітропрусидом натрію викликала зростання активності СОД у клітинах дикого штаму (рис. 1). У дріжджів, дефектних за геном *YAP1*, активації СОД не спостерігалось, тому можна припустити, що даний білок задіяний в активації цього ферменту.

Аконітаза є чутливим до окислення ферментом, оскільки до складу її активного центру входить 4Fe-4S кластер, тому вона може служити маркером оксидативного стресу [1]. Так, активність аконітази у клітинах дикого штаму дріжджів знижувалась зі зростанням концентрації нітропрусиду натрію, тоді як у дріжджів штаму *YRH250-YAP1Δ* активність даного ферменту не змінювалася (рис. 2).

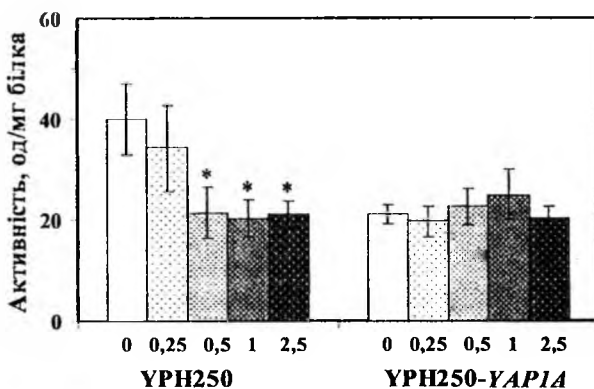


Рис. 2. Активність аконітази у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* штамів *YRH250* та *YRH250-YAP1Δ* при інкубації з нітропрусидом натрію у різних концентраціях.

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

Одними з найпоширеніших молекул-мішеней для $\cdot\text{NO}$ є залізовмісні білки: гуанілатциклаза, NO-синтаза, гемоглобін, ферменти мітохондрій, циклу Кребса, синтезу білка. $\cdot\text{NO}$ руйнує Fe- і Cu-вмісні білки з вивільненням Fe^{2+} і Cu^{2+} [11]. Як видно з рисунка 2, активність аконітази знижувалась при збільшенні концентрації використаного $\cdot\text{NO}$ -донора у клітинах штаму дикого типу. Це пояснюється тим, що в активному центрі аконітази є особлива простетична група — $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ кластер, який може зазнавати пошкодження під дією оксиду азоту. У цьому кластері тільки три атоми заліза приєднані до цистеїну білкового ланцюга. Четвертий атом (Fe α) з'єднаний тільки з атомом сірки залізо-сіркового кластеру й має вільну просторову координацію, тому він може взаємодіяти з карбоксильними та гідроксильними групами різних субстратів. Під впливом оксиду азоту даний кластер переходить в окислений стан $[3\text{Fe}-4\text{S}]^+$ [3].

Той факт, що активність даного ферменту у контрольній пробі у клітин дефектного за білком Yар1 штаму була вдвічі меншою, ніж у відповідній пробі у клітинах штаму YPH250, можна пояснити можливою роллю цього білка в регуляції активності аконітази. Активність СОД у контрольній пробі у клітинах штаму YPH250-YAP1A була вищою приблизно в 1,2 раза порівняно зі штамом дикого типу. Це може свідчити про більшу концентрацію супероксиданіону в клітинах останнього. Як відомо, ще одною мішенню для оксиду азоту можуть бути кисневі радикали: при взаємодії NO з киснем або його активними формами (супероксидним аніоном) утворюються інші токсичні сполуки: пероксинітрит (ONOO^-), оксид азоту (IV) та гідроксильний аніон, які виявляють надзвичайно сильну цитотоксичну дію [4; 8]. Зважаючи на вільнорадикальну природу O_2^- , припускаємо, що оксид азоту буде швидше реагувати з даною АФК, ніж із макромолекулою аконітази. Тобто можна говорити про досить специфічну роль сунероксиданіону як сквенджеру NO . Можливо, це і є причиною того, що при додаванні більших концентрацій нітропрусиду натрію активність аконітази достовірно не відрізнялась від проби, де нітропрусид був відсутній.

Різну активність даного ферменту в контрольних пробах у клітинах дикого та дефектного за білком Yар1 штамів можна пояснити й по-іншому. Аконітаза присутня у клітинах у двох ізоформах, активності яких регулюються експресією генів *ACO1* і *ACO2* відповідно [3]. Нижча активність ферменту в клітинах штаму YPH250-YAP1A може бути спричинена участю білка Yар1 у регуляції активності однієї з ізоформ аконітази. Тоді при відсутності експресії гена *YAP1* загальна активність ферменту не включатиме активності Yар1-залежної ізоформи аконітази.

Отже, регуляторний білок Yар1 може брати участь у регуляції активності СОД за дії нітропрусиду натрію і, можливо, здійснює регуляцію однієї з ізоформ аконітази.

Висновки

1. Активність СОД у клітинах дріжджів дикого штаму зростала при обробці нітропрусидом натрію.
2. Активність аконітази у клітинах штаму YPH250 у присутності нітропрусиду натрію знижувалась у порівнянні з контролем.
3. Оскільки у клітинах дикого штаму відбувалась активація СОД, а в клітинах дефектного штаму YPH250-YAP1A зміна активності не спостерігалась, то можна припустити, що активація даного ферменту відбувається за участю регуляторного білка Yар1.

1. Andersson U., Leighton B., Young M.E., Blomstrand E., and Newsholme E.A. Inactivation of Aconitase and Oxoglutarate Dehydrogenase in Skeletal Muscle in Vitro by Superoxide Anions and/or Nitric Oxide // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1998. - Vol. 249. - P. 512-516.
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. Castro L., Rodrigucz M., Radi R. Aconitase Is Readily Inactivated by Peroxynitrite, but Not by Its Precursor, Nitric Oxide // *The Journal Of Biological Chemistry*. - 1994. - Vol. 269. - № 47. - P. 29409-29415.
4. Chiang K.T., Switzer C.H., Akali K.O., and Fukuto J.M. The Role of Oxygen and Reduced Oxygen Species in Nitric Oxide-Mediated Cytotoxicity: Studies in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model System // *Toxicology and Applied Pharmacology*. - 2000. - Vol. 167. - P. 30-36.
5. Jour'd'heuil D., Jour'd'heuil L.F., and Kutchukian P.S., and Grisham M.B. Reaction of Superoxide and Nitric Oxide with Peroxynitrite // *The Journal Of Biological Chemistry*. - 2001. - Vol. 276. - № 31. - P. 28799-28805.
6. Lushchak V., Semchyshyn H., Mandryk S., Lushchak O. Possible Role of Superoxide in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* under Respiratory Conditions // *Archives of Biochem. and Biophys.* - 2005. - Vol. 441. - P. 35-40.
7. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2004. - Vol. 101. - № 12. - P. 4003-4008.
8. White C.R., Patel R.P., and Darley-Usmar V. Nitric Oxide Donor Generation from Reactions of Peroxynitrite // *Methods in Enzymology*. - 1999. - Vol. 301. - P. 288-298.
9. Wiatrowski I.A. and Carlson M. Yap1 Accumulates in the Nucleus in Response to Carbon Stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *Eukariotic Cell*. - 2003. - Vol. 2. - № 1. - P. 19-26.
10. Мейнел Дж., Мейнел Э. Экспериментальная микробиология (теория и практика). - М.: Мир, 1967. - 347 с.
11. Мелнишві І.Ф., Пінак В.П., Григор'єва Н.П. Біомолекули: структура та функції. - Чернівці: Медик, 2003. - 150 с.
12. Семчишин І.М., Луцак В.І. Оксидативний стрес і регуляція активності каталаз у *Escherichia coli* // *Український біохімічний журнал*. - 2004. - Т. 76. - № 2. - С. 31-42.

The role of protein Yap1 in activity regulation of superoxide dismutase and aconitase in yeast cells Saccharomyces cerevisiae during the treatment by sodium nitroprusside was investigated. For this we choose yeast strain YPH250 and its derived strain YPH250-YAP1Δ, which is defective in the gene of regulatory protein Yap1. Yeast cells of both strains were treated in the presence of sodium nitroprusside, the donor of nitric (II) oxide, in concentrations 0.25; 0.5; 1; 2.5 mM. In the yeast cells of strain YPH250 the activity of superoxide dismutase was reliably increased when the concentration of nitroprusside was increased from 0,5 to 2,5 mM, unlike defective strain YPH250-YAP1Δ, where its activity was invariable. The aconitase activity in cells of wild type strain was reduced with increment of sodium nitroprusside concentration, while in yeast cells of strain YPH250-YAP1Δ its activity didn't reliably change. These results may witness of participation of protein Yap1 in regulation of superoxidodismutase activity during the treatment with sodium nitroprusside and its possible involvement in activity modulation of one of aconitase isoforms.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, sodium nitroprusside, nitric (II) oxide, antioxidant defense, regulatory protein Yap1, superoxide dismutase, aconitase.