

Секова Варвара Юрьевна

**ОСНОВНЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ
АДАПТАЦИИ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ У ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA***

Специальность 1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории экологической и эволюционной биохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ «Биотехнологии РАН»)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, зав. лабораторией экологической и эволюционной биохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» **Дерябина Юлия Ивановна**

Официальные оппоненты: **Васильева Светлана Васильевна**, доктор биологических наук, зав. лабораторией теоретической генетики Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, главный научный сотрудник, заслуженный деятель науки;

Аринбасарова Анна Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория адаптации микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН), обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Ведущая организация: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (МГУ).

Защита состоится «__» _____ 2023 г. в __ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Yarrowia lipolytica – полиэкстремофильные «нестандартные» дрожжи, имеющие большой потенциал использования во всех сферах современной биотехнологии: в «серой» – промышленной – биотехнологии этот организм нашел применение как продуцент органических кислот (в основном – лимонной) (Fickers, 2020); в «желтой» – пищевой – биотехнологии применяются ферменты, в больших количествах секретируемые *Y. lipolytica* во внешнюю среду, главным образом, липазы и протеазы (Carvalho, 2020; Dąbrowska, 2020). В «белой» – генноинженерной – биотехнологии перспективы применения *Y. lipolytica* крайне широки: секреция белков по ко-транскрипционному (легко контролируемому) принципу (Bae, 2020) делает данный биообъект привлекательным штаммом-хозяином для экспрессии таких гетерологичных белков, как лакказы (Darvishi, 2018) и инулиназы (Shi, 2018). Более того, система посттрансляционной модификации белков *Y. lipolytica*, исключая чрезмерное N-гликозилирование, нехарактерное для клеток млекопитающих, делает этот организм привлекательным хозяином для гетерологичной экспрессии некоторых белков человека и животных, используемых в терапевтических целях (Espejo-Mojica, 2015). В «зелёной» – сельскохозяйственной и эко-биотехнологии – *Y. lipolytica* находит перспективы применения не только как высокоэффективный компонент для биоаугментации сообществ для биоремедиации почв и водных сред (Louhasakul, 2019), способный к утилизации широкого спектра токсичных поллютантов, от *n*-алканов до тринитротолуола, но и как организм, способный к утилизации лигноцеллюлозного сырья – массового отхода растениеводства и лесной промышленности (Song, 2017). Кроме того, высокая липолитическая активность делает дрожжи *Y. lipolytica* перспективным штаммом для биоконверсии низкокачественных жиров, таких как отработанное фритюрное масло, в биодизель (Katre, 2017). Высокая галотолерантность (Zvyagilskaya, 2005) позволяет использовать *Y. lipolytica* для биоремедиации морских сред, загрязнённых нефтепродуктами.

Наконец, полностью аннотированный геном этого организма (Dujon, 2004) делает его крайне удобной моделью для изучения различных физиологических процессов в эукариотической клетке (Larroude, 2018).

Несмотря на столь широкие возможности *Y. lipolytica*, биотехнологический потенциал данного организма реализуется на практике крайне медленно: из реально функционирующих конкурентоспособных процессов с применением *Y. lipolytica* можно отметить лишь производство лимонной кислоты (Hu, 2019), применение этого организма в пищевой промышленности для повышения пищевой ценности и улучшения органолептических качеств мясных и молочных продуктов, а также для обработки гидрофобных отходов пищевых производств (Muhammad, 2020).

Такое положение дел во многом обусловлено тем, что в физиологии этого уникального микроорганизма до сих пор остаётся много неясного, особенно если речь идёт о механизмах ответа клеток *Y. lipolytica* на стресс. Как известно, стрессовые воздействия на клетку продуцента, такие как неблагоприятные значения pH среды, температуры, лимитирование в среде какого-либо компонента питания или изменение условий аэрации, зачастую являются неотъемлемым элементом биотехнологического процесса. Незнание тех или иных физиологических особенностей организма приводит к неучтению этих свойств микроорганизма на стадии проектирования биотехнологических процессов, что делает впоследствии эти процессы экономически невыгодными или вовсе невозможными.

С другой стороны, *Y. lipolytica* нашла широкое применение в качестве модели для фундаментальных исследований, в частности, в сфере изучения различных физиолого-биохимических процессов, в т. ч. в клетках человека и животных. Так, например, способность к т.н.

диморфному переходу – изменению морфологии дрожжей в направлении формирования мицелия, сделало *Y. lipolytica* относительно безопасной и репрезентативной моделью для изучения кандидозов – одной из наиболее опасных госпитальных инфекций (Zieniuk, 2018)

Рост интереса к митохондриальным патологиям привёл к необходимости поиска удобной и репрезентативной модели комплекса I дыхательной цепи митохондрий млекопитающих. В этом отношении *Y. lipolytica* также демонстрирует преимущество над другими видами дрожжей. Так, в отличие от штаммов наиболее популярного лабораторного вида дрожжей - *Saccharomyces cerevisiae*, обладающего факультативно-аэробным метаболизмом и содержащего убихинон типа Q6, этот организм обладает строго аэробным метаболизмом, а также содержит убихинон типа Q9, что позволяет проводить параллели с убихиноном Q9-Q10, обнаруженным у млекопитающих. Другое важное преимущество *Y. lipolytica* состоит в особенностях функционирования I комплекса. Также как и у млекопитающих, I комплекс дыхательной цепи митохондрий *Y. lipolytica* участвует в создании трансмембранного потенциала, который затем используется для синтеза АТФ, в то время как у *S. cerevisiae* комплекс I заменен НАДН-дегидрогеназой (Ndi1p), не способной к созданию протонного градиента. Описанные преимущества сделали *Y. lipolytica* предпочтительной и крайне распространённой моделью для изучения митохондриальных патологий, связанных с функцией I комплекса дыхательной цепи (Lasserre, 2018, Kaila, 2018).

Наконец, большое разнообразие доступных исследователям штаммов *Y. lipolytica*, обнаруженных в разных точках Земли, делает этот микроорганизм удобной моделью для изучения геномного разнообразия (Larroude, 2020). Многообразие утилизируемых субстратов, необходимых для этого ферментов и широкий спектр стресс-индуцированных адаптивных ответов против неблагоприятных факторов среды даёт возможность на модели этого организма изучать различные закономерности адаптационной эволюции (Yang, 2017) Всё изложенное выше определяет актуальность исследования адаптивного ответа дрожжей *Y. lipolytica* на различные стрессовые воздействия.

Целью исследования стало изучение основных физиолого-биохимических закономерностей и молекулярных механизмов развития адаптивного ответа экстремофильных дрожжей *Y. lipolytica* W29 на внешние стрессоры на примере изменения pH и температуры культивирования. Для достижения поставленной цели был сформулирован ряд задач.

Задачи исследования:

Разработать матрицу экспериментальных моделей, позволяющих оценивать физиолого-биохимические закономерности роста клеток *Y. lipolytica* W29 в оптимальных и экстремально щелочных условиях, в условиях теплового шока, а также при комбинировании этих стрессовых воздействий;

- Определить параметры роста, развития и энергетического состояния культур всех выбранных моделей: динамику роста, скорости накопления биомассы и потребления кислорода клеточной суспензией, вклад альтернативной оксидазы митохондрий и особенности ультраструктуры клеток;
- Определить окислительно-восстановительный статус клеток всех выбранных моделей: динамику генерации активных форм кислорода (АФК), активность антиоксидантных систем клетки и глутатионовой системы;
- Исследовать изменения липидного и углеводного состава клеток, а также изменения протеома всех выбранных моделей по отношению к контролю в оптимальных условиях;
- На основании полученных и литературных данных составить схему общей стратегии адаптации клеток *Y. lipolytica* W29 к выбранным стрессовым воздействиям, а также

определить уникальные механизмы адаптации, характерные для каждого из использованных видов стресса;

- Продемонстрировать возможность использования механизмов адаптации для экспрессии гетерологичных белков мутантным штаммом *Y. lipolytica* W29.

Научная новизна

В рамках диссертационной работы впервые получена экспериментальная модель культивирования *Y. lipolytica* W29 при комбинировании хронического теплового и щелочного стрессоров. Впервые показаны различия антиоксидантного статуса клеток *Y. lipolytica* W29 при культивировании в оптимальных и щелочных условиях, в условиях теплового стресса, а также при комбинировании теплового и щелочного стрессоров. Показано, что тепловое воздействие приводит к наиболее выраженному вовлечению антиоксидантных механизмов клеточной защиты. Впервые предложены концептуальные схемы изменений гликома и липидома клеток *Y. lipolytica* W29 при оптимальной температуре, а также при тепловом стрессовом воздействии. Впервые продемонстрировано снижение степени ненасыщенности жирных кислот мембранных кардиолипинов при щелочном стрессе за счёт возрастания в составе маргариновой кислоты. Впервые показано расходование запасных триацилглицеридов клеток *Y. lipolytica* W29 из липидных капель в условиях теплового и щелочного стрессов и при их комбинировании. Впервые проанализированы изменения протеома клеток *Y. lipolytica* W29 при тепловом и комбинированном стрессовых воздействиях. Впервые показано парадоксальное исчезновение экспрессии ряда факторов антиоксидантной защиты клеток при комбинированном стрессовом воздействии. Впервые продемонстрировано увеличение экспрессии митохондриального порина в условиях щелочного стресса, а также при комбинировании щелочного и окислительного стрессоров.

Научно-практическая значимость

Выявленные в ходе работы физиолого-биохимические закономерности адаптации *Y. lipolytica* W29 к различным видам стресса расширяют представления об адаптивном потенциале данного организма, в особенности, о способности к адаптации *Y. lipolytica* W29 к хроническому комбинированному стрессу (тепловому и щелочному). Полученное в исследованиях гликома *Y. lipolytica* W29 конститутивно высокое процентное содержание маннита в цитоплазме при оптимальных условиях позволяет рассматривать этот микроорганизм в качестве потенциального штамма-продуцента данного полиола. Индукция промотора гена митохондриального порина *VDAC* в трансформированной линии *Y. lipolytica* W29 при щелочном и комбинированном стрессовых воздействиях делает перспективным его применение в качестве индуцибельного промотора для синтеза рекомбинантных белков.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- Щелочные условия (рН 9.0), повышение температуры культивирования до 38°C, а также комбинирование щелочных условий и повышения температуры являются стрессовыми условиями для *Y. lipolytica* W29. Сочетание хронического щелочного и теплового стрессовых воздействий (рН 9.0, 38°C) приводит к развитию перекрёстной адаптации, которая выражается в повышении выживаемости клеток при комбинированном стрессовом воздействии, а также «переключении» метаболизма на адаптацию к фактору с большей повреждающей способностью – температуре;
- Основными факторами защиты *Y. lipolytica* W29 от повышенной температуры являются переключение метаболизма углеводов в направлении синтеза трегалозы и метаболизма липидов – в направлении синтеза фосфатидилхолинов и фосфатидных кислот с

одновременным расходом запасённых триацилглицеридов клетки в качестве основного источника энергии;

- Митохондриальный порин является важным компонентом адаптации *Y. lipolytica* W29 к щелочному стрессу.
- Каждый из исследованных стрессоров приводит к развитию индивидуального адаптивного ответа клеток *Y. lipolytica* W29 на уровне клеточной физиологии.

Личный вклад диссертанта

Личный вклад диссертанта заключался в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на научных конференциях, в том числе: международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пушкино, 2013); 10th International Congress On Extremophiles (Россия, г. Санкт-Петербург, 2014); международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пушкино, 2015); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015» (г. Москва – МГУ, 2015); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (г. Москва – МГУ, 2016), 41st Federation of European Biochemical Societies Congress (Турция, г. Кушадасы, 2016); V съезде Общества биохимиков России, (г. Сочи – Дагомыс, 2016); 4-м съезде микологов России, (г. Москва, 2017); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (г. Москва – МГУ, 2018); 14th Yeast Lipid Conference (Словения, г. Любляна, 2019); 44st Federation of European Biochemical Societies Congress (Польша, г. Краков, 2019).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 6 статей в российских и международных научных журналах, включённых в перечень ВАК, базы данных Web of Science, Scopus и РИНЦ. Кроме того, опубликовано 14 публикаций в материалах всероссийских и международных конференций.

Связь с государственными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 19-04-00327-а и 19-34-80012).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа содержит введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и список литературы. Работа изложена на 214 страницах, содержит 36 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 384 источника отечественной и зарубежной литературы.

Степень достоверности. Научные положения и выводы диссертации Сековой В.Ю. обоснованы, достоверны и логически вытекают из полученных экспериментальных данных.

Список сокращений.

АО – альтернативная оксидаза митохондрий; АФК – активные формы кислорода; ДАГ – диацилглицериды; ЖК – жирные кислоты; КЛ – кардиолипиды; КС – комбинированный стресс; ЛВ – липидное вкрапление, ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламины; ЛФХ – лизофосфатидилхолины; МАГ – моноацилглицериды; НФ – нитрофенид (бис(4-нитрофенил)-дисульфид); ОП – оптическая плотность; ПК – положительный контроль; СЖК – свободные жирные кислоты; СОД – супероксиддисмутаза; Ст – стеролы; СФ – сфинголипиды; ТАГ – триацилглицериды; ТМДА – тетраметилэтилендиамин; ТС – тепловой стресс; ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; ФИ – фосфатидилинозиты; ФК – фосфатидные кислоты; ФС – фосфатидилсерины; ФХ – фосфатидилхолины; ФЭ – фосфатидилэтанолламины; ЩС – щелочной стресс; ЭС – эфиры стерина;

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; С:Н – степень ненасыщенности ЖК; DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол; H₂DCF-DA – 2'7'-дихлородигидрофлуоресцина диацетат; GSH – восстановленная форма глутатиона; GSSG – окисленная форма глутатиона; PI – иодистый пропидий; U – единица ферментативной активности VDAC – митохондриальный порин (voltage dependent anion channel). Обозначения ЖК: C12:0 – лауриновая, C14:0 – миристиновая, C15:0 – пентадекановая, C16:0 – пальмитиновая, C17:0 – маргаринавая, C17:1 – гептадекановая, C18:3 – линоленовая.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В качестве объекта исследования использовали штамм *Y. lipolytica* W29 (дикий тип), полученный из коллекции CIRM-Levures collection (Франция).

Выживаемость клеток изучалась методом проточной цитометрии с окрашиванием флуоресцентным красителем PI, а также на плотной среде методом «споттинг-теста» (Kwolek-Mirek, 2014);

Активность СОД. Активность СОД измерялась спектрофотометрическим методом по ингибированию автоокисления кверцетина в щелочной среде в присутствии ТМДА (Костюк, 1990);

Активность каталазы. Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом по скорости разложения перекиси водорода (Landahl, 1953);

Общий уровень АФК и содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона измеряли флуориметрическими методами (Wang 2005; Oparka 2016);

Скорость дыхания и активность АО митохондрий изучали полярографическим методом (Deryabina et al., 2014);

Анализ липидома и гликома клеток проводили методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии (Kates, 1986; Brobst, 1971);

Протеомный анализ клеток был проведён методом фракционирования белков посредством двумерного электрофореза с последующей идентификацией с помощью MALDI-TOF;

Трансмиссионная электронная микроскопия была использована для изучения ультраструктуры клеток. Клетки последовательно фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом и OsO₄, материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812, “Sigma”. Ультратонкие срезы монтировали на опорные сеточки, контрастировали в течение 30 мин в 3% растворе уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Исследование проводили на электронном микроскопе JEM-100B и U12 (Hitachi, Япония) с увеличением в 24000× при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Визуализацию ядер и митохондрий проводили методом **флуоресцентной микроскопии**. Для этого клетки фиксировали в 70% этаноле, после чего ресуспендировали в HBSS-буфере, содержащем 1 мМ MitoTracker™ RED CMXRos («Life Technologies, США»). Для возбуждения флуоресценции использовали лазер с $\lambda=579$ нм и светофильтром для $\lambda=599$ нм. Для визуализации ядер использовался флуоресцентный краситель DAPI. Клетки фиксировали 70% этанолом, после чего высушивали на предметном стекле. Зафиксированные таким образом клетки окрашивали на стекле 50 мкг/мл раствором DAPI. Для возбуждения флуоресценции использовали лазер с $\lambda=405$ нм и светофильтром для $\lambda=488$ нм. Изображения получали с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioskop» 40 FL («Zeiss», Германия).

Для изучения **индукции промотора гена митохондриального потенциал-зависимого порина VDAC** была создана генетическая конструкция, несущая ген β -гатактозидазы *Escherichia coli* под контролем промотора этого гена (*POR1*). Индукция промотора определялась по активности β -гатактозидазы колориметрически с использованием хромогенного субстрата «X-gal» (Juretzek, 2001).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ РОСТА И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КУЛЬТУРЫ *Y. lipolytica* В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Дрожжи *Y. lipolytica* W29 оказались способны расти в широком диапазоне значений pH. Было показано, что максимальная линейная скорость роста достигалась при pH 5.5, а ниже pH 3.0 и выше pH 10.5 способность к росту исчезала (рис.1).

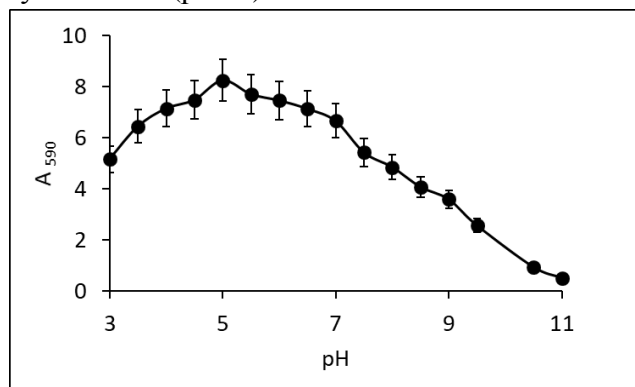


Рисунок 1. Зависимость ОП₅₉₀ культуры клеток *Y. lipolytica* W29 от различных значений pH через 24 часа культивирования при 28°C.

В качестве оптимальной температуры было выбрано значение 28-29°C, являющееся оптимальным для культивирования большинства видов дрожжей, а стрессового теплового воздействия – 38°C, на 10°C превышающее оптимальное значение. КС моделировали сочетанием условий 38°C и pH 9.0.

Для каждого варианта были построены кривые роста (рис. 2) и оценены удельные скорости роста культур (μ) (табл. 1). Максимальные значения μ достигались при pH 5.5 как при оптимальной, так и при повышенной температуре. ЩС и особенно КС приводили к заметному замедлению роста. Повышение температуры культивирования как при оптимальном, так и при щелочном pH, приводило к снижению максимальной плотности культуры в стационарной стадии роста.

Исследование выживаемости клеток проводили методом проточной цитометрии с окрашиванием PI. Результаты приведены на рис. 3. Было показано, что при оптимальных условиях культивирования выживаемость клеток стационарной стадии роста составляла >99%. При этом любое стрессовое воздействие приводило к появлению на гистограмме флуоресценции выраженного дополнительного пика, соответствующего мёртвым клеткам. ЩС понижал выживаемость до ~97%, ТС – до ~80%, в то время как КС индуцировал выживаемость до ~90%, что могло свидетельствовать о возникновении перекрёстной адаптации.

Исследование ультраструктуры клеток показало, что во всех случаях чётко визуализировались ядро, митохондрии и липидные включения. При этом клетки, выращенные в оптимальных условиях (рис. 4, а), отличались бóльшим размером (7-10 μm) по отношению к клеткам, выращенным при ЩС (рис. 4, б) и ТС (рис. 4, в). Эти клетки характеризовались большим количеством многочисленных липидных капель с низкой электронплотностью (рис. 4, а,). ЩС, ТС и КС приводили к почти 2-кратному уменьшению размера клеток. (рис.4, б-г). Включения липидов при этом уменьшались до 1-2 крупных капель, ассоциированных с ядром. При КС в клетках наблюдались комплексы липидных капель и небольших митохондрий (Рис. 3, г) с крайне плотной структурой. Размер самих клеток при этом уменьшался до 3-5 μm .

ЛВ играют ключевую роль в метаболизме липидов и поддержании энергетического гомеостаза клетки, а также в циркуляции белка. В работе (*Pascual-Ahuir, 2018*) сообщалось о стресс-индуцированном метаболическом сдвиге от ферментации к дыханию, включающем индукцию

пероксисомного β -окисления жирных кислот. Предполагается, что переход на альтернативные источники энергии (в данном случае – запасные липиды) инициирует ряд сигнальных событий, приводящих к уменьшению повреждения митохондрий во время стресса. Вероятно, в случае ЩС, ТС и КС в нашей модели этот механизм также имеет место.

На следующем этапе работы было проведено исследование ультраструктуры клеток *Y. lipolytica* методом ТЭМ (рис. 4).

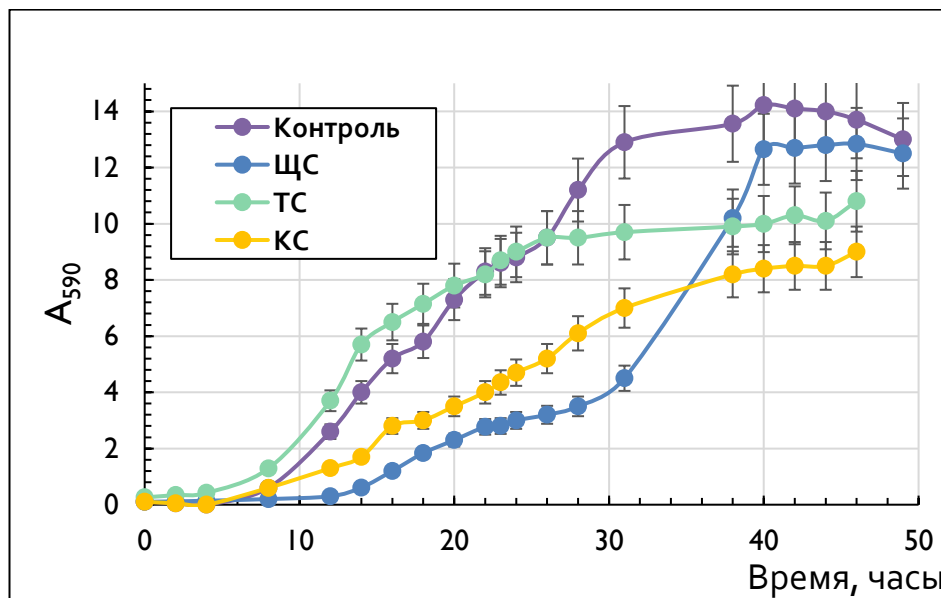


Рисунок 2. Кривые роста *Y. lipolytica* W29 в различных условиях.

Таблица 1. Удельные скорости роста культур *Y. lipolytica* W29 ($ч^{-1}$) в различных условиях культивирования.

Условия культивирования	pH 5.5	pH 9.0
29°C	0.188 ± 0.010	0.136 ± 0.019
38°C	0.183 ± 0.023	0.107 ± 0.010

Таким образом, любое стрессовое воздействие оказывает заметное влияние на параметры роста культуры: ЩС приводит к значительному замедлению роста культуры и появлению ~3% мёртвых клеток в стационарной стадии роста; ТС провоцирует снижение максимальной ОП стационарной стадии и росту доли мёртвых клеток до ~20%. КС оказывает наиболее выраженное воздействие на рост культуры – в этих условиях наблюдается минимальная скорость роста и минимальная ОП стационарной стадии, а доля мёртвых клеток доходит до 10%. При этом любое стрессовое воздействие приводит к реорганизации клеток по одинаковому сценарию: образуется комплекс из ядра и липидного включения, окруженного митохондриями, что может свидетельствовать о переключении метаболизма на β -окисления липидов с целью снижения повреждения митохондрий.

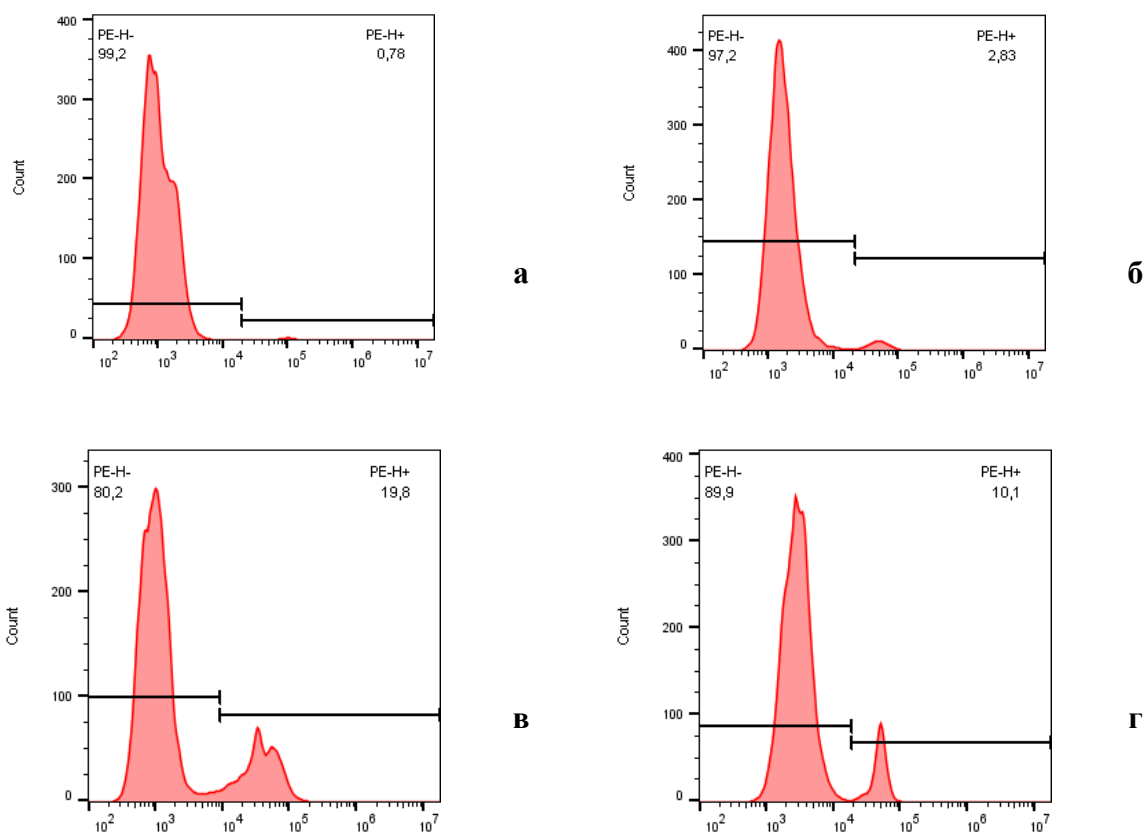


Рисунок 3. Выживаемость клеток *Y. lipolytica* в стационарной стадии роста при культивировании в различных условиях: контроль – а; ЩС – б; ТС – в; КС – г.

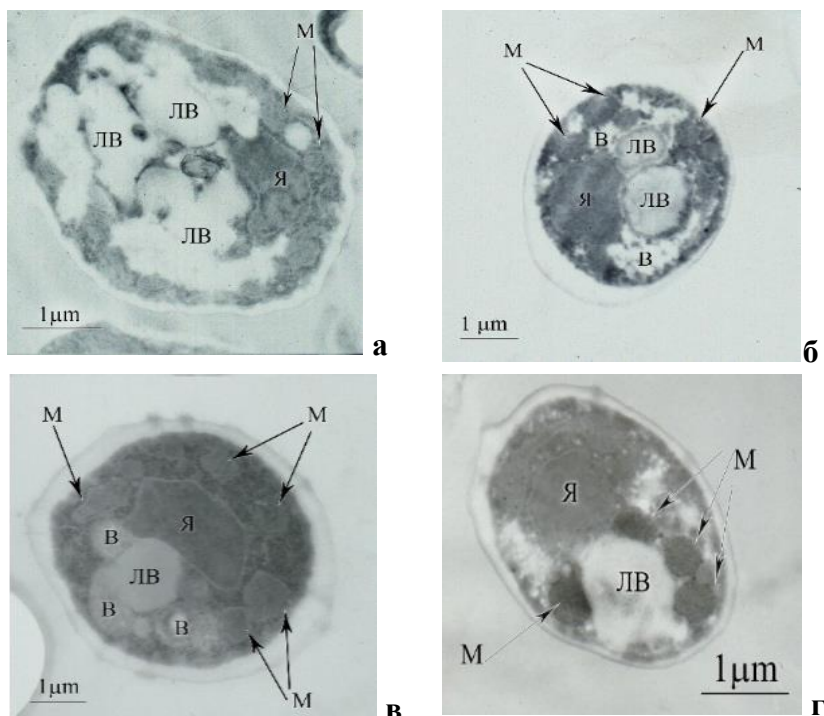


Рисунок 4. ТЭМ клеток *Y. lipolytica* W29, выращенных в различных условиях: контроль – а, ЩС – б, ТС – в, КС – г, В – вакуоль; ЛВ – липидное включение; М – митохондрия; Я – ядро.

2. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС КУЛЬТУРЫ *Y. LIPOLYTICA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Скорость потребления кислорода аэробными клетками позволяет оценить общую метаболическую активность и энергетический статус культуры дрожжей. Поэтому на следующем этапе работы были определены скорости дыхания и вклад АО в потребление кислорода клетками *Y. lipolytica*, выращенными в различных условиях (Таблица 2).

Таблица 2. Скорости дыхания и вклад АО в потребление кислорода клетками *Y. lipolytica* W29 в различных условиях.

Условия выращивания	контроль	ЩС	ТС	КС
Скорость дыхания, нг-атом \times мин ⁻¹ \times мг ⁻¹ сухой биомассы	27.0 \pm 0.5	59.3 \pm 2.4	32.10 \pm 7.8	19.75 \pm 2.7
Вклад АО в потребление O ₂ , %	25.1%	66.8%	53.2%	96.5%

Наиболее интенсивное дыхание наблюдалось при ЩС, а при ТС этот параметр мало отличался от контроля. Важно отметить, что КС обуславливал заметное снижение интенсивности дыхания. Активность АО увеличивалась более, чем в 2 раза, при любом виде стресса, причём при КС практически всё потребление кислорода приходилось на альтернативный путь (Таблица 2). В совокупности со сниженным значением μ в этих условиях, это может говорить о выраженном окислительном стрессе и пониженной метаболической активности культуры.

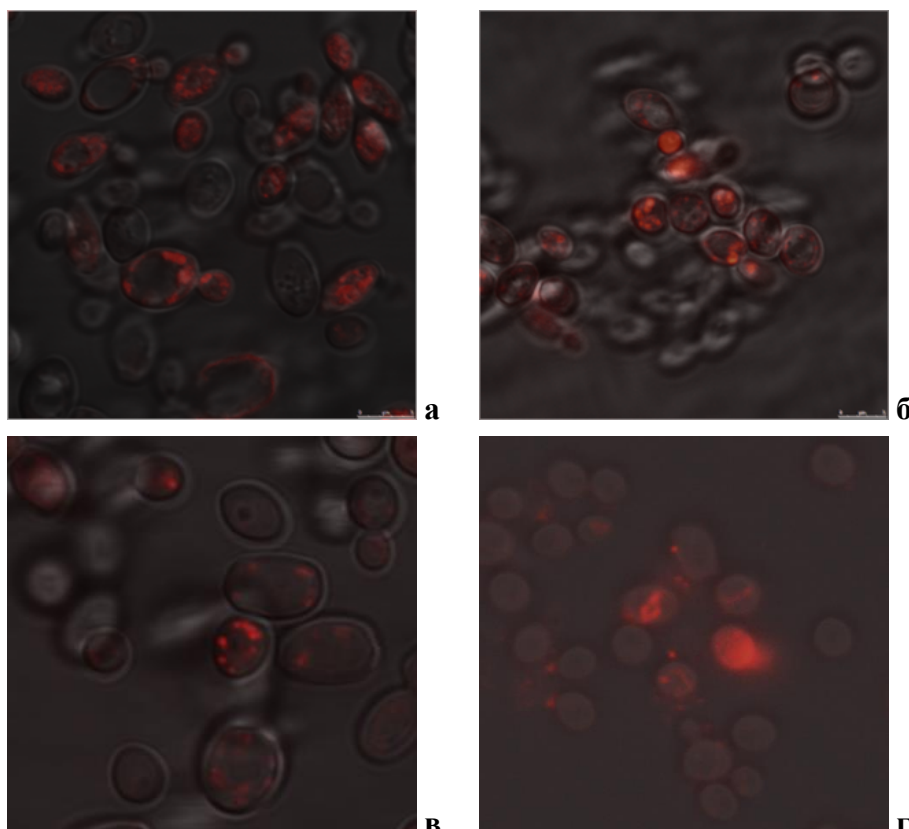


Рисунок 5. Клетки *Y. lipolytica*, выращенные в различных условиях, окрашенные MitoTracker™ Red (наложение на световую микроскопию клеток): Контроль – а, ЩС – б, ТС – в, КС – г.

Потенциометрическое окрашивание клеток красителем MitoTracker™ Red продемонстрировало высокую степень активации митохондрий дрожжей как в оптимальных (рис. 5, а), так и в стрессовых условиях, а именно при повышенной температуре (рис. 5, б) и ТС (рис. 5, в).

При КС активные митохондрии обнаруживались лишь в немногочисленных клетках, что согласуется с данными о сниженной скорости дыхания и высоком вкладе АО в данных условиях (рис.5, г).

Исходя из полученных данных можно заключить, что значительное снижение активности митохондрий происходит лишь при КС, где дыхание полностью переходит на альтернативный путь, и скорость его снижается. При ЩС и ТС высокая активность митохондрий достигается за счет высокой скорости дыхания при сравнительно высоком вкладе АО.

3. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС КУЛЬТУРЫ *Y. LIPOLYTICA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Оценка окислительно-восстановительного статуса клеток включала в себя такие параметры как активности ключевых антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы), общий уровень АФК в клетках, а также содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона. Результаты измерения этих параметров приведены в таблице 3.

Таблица 3. Параметры окислительно-восстановительного статуса клеток *Y. lipolytica* в различных условиях.

Условия	Медианный уровень пероксил-производных H ₂ DCF-DA*, ед. флуор / мг белка	Активность СОД, U / мг белка	Активность каталазы, мМН ₂ O ₂ / мин × мг белка	[GSH], μг / мг б/м	[GSSG], μг / мг б/м	[GSH]/[GSSG]
Контроль	91/197	141 ± 11	132.0 ± 21.2	15.22 ± 1.31	3.62 ± 0.25	~4.21
ЩС	121/130	831 ± 48	139.0 ± 9.2	8.68 ± 0.75	4.15 ± 0.56	~2.09
ТС	236/248	1725 ± 63	2.33×10 ⁷ ± 1.12 ×10 ⁶	54.90 ± 4.22	36.70 ± 4.01	~1.49
КС	123/128	1407 ± 55	4.59×10 ⁵ ± 2.59 ×10 ⁴	23.30 ± 3.15	11.39 ± 0.32	~2.04

*Уровень АФК оценивался по флуоресценции H₂DCF-DA, через “/” приведены значения ПК для данного образца.

Было показано, что ЩС приводил к возрастанию уровня АФК в клетках на ~30%, увеличению активности СОД более, чем на 400%, а также снижению соотношения [GSH]/[GSSG] вдвое за счёт снижения содержания GSH. ТС провоцировал возрастание активности ферментов первой линии защиты и более, чем 2-кратное снижение [GSH]/[GSSG] относительно контроля. При этом содержание как GSH, так и GSSG возрастало в 4 и 10 раз, соответственно. Аналогичные, но несколько менее выраженные эффекты наблюдались и при КС. Также было показано, что при КС активности ферментов первой линии защиты возрастали на порядки относительно контроля, однако, оставались заметно ниже, чем при ТС. Кроме того, [GSH]/[GSSG] находилось на уровне, характерном для ЩС.

Таким образом, на основании анализа окислительно-восстановительного статуса клеток *Y. lipolytica* мы можем рассматривать ЩС как умеренное стрессовое воздействие, приводящее к незначительному повышению уровня АФК и активности СОД и каталазы. Эффекты, оказываемые ЩС, приводят к выраженному росту этих параметров, необходимых для индукции устойчивости к ТС. Исходя из этого, можно говорить об эффекте перекрёстной адаптации (Brown, 2017) на уровне окислительно-восстановительного статуса клеток, который заключается в некотором «смягчении» эффектов, оказываемых температурой при комбинировании ТС и ЩС.

4. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ОТВЕТ КУЛЬТУРЫ *Y. LIPOLYTICA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

4.1. Спектр углеводов цитозоля клеток *Y. lipolytica*, выращенных в разных условиях

Углеводный спектр (гликом) клетки является важным параметром, обуславливающим защиту грибных клеток от неблагоприятных внешних воздействий благодаря осмопротекторным и антиоксидантным свойствам цитозольных углеводов. Результаты оценки состава растворимых сахаров цитозоля клеток *Y. lipolytica*, выращенных в разных условиях, приведены на рис. 6. Было показано, что при оптимальной температуре культивирования во всех случаях основным запасным углеводом являлся маннит. В минорных фракциях обнаруживались арабит, инозит и глюкоза. Повышение температуры в обоих случаях приводило к замещению маннита трегалозой, а также возрастанию доли арабита.

Для маннита были показаны различные варианты цитопротекторного действия, среди которых непосредственный антиоксидантный (Patel, 2016), либо осмопротекторный (Meena, 2015) эффекты. Стоит отметить, что взаимопревращения маннита и фруктозы могут происходить в виде циклического процесса (т.н. цикла маннита), каждый оборот которого приводит к восстановлению одной молекулы НАДФН (Gonçalves, 2019, рис. 12). Чтобы выяснить, может ли конститутивно высокое содержание маннита в клетках *Y. lipolytica* при оптимальной температуре культивирования обеспечивать устойчивость в широком диапазоне pH, был проведён ряд экспериментов с введением в среду культивирования НФ – ингибитора маннитол-1-фосфатдегидрогеназы. НФ вносили в среду культивирования до конечной концентрации 200 мкМ в логарифмической стадии роста (18 ч), после чего через 6 часов оценивали содержание маннита, соотношение восстановленного и окисленного глутатиона, а также выживаемость клеток. Результаты приведены в табл.4 и на рис. 7. Как видно, 6-часовая инкубация оказывала существенное ингибирующее действие на содержание маннита в контроле (табл. 4), что подтвердило действие НФ на синтез маннита *de novo*. Однако, необходимо заметить, что НФ не оказывал воздействия на уровень маннита при ЩС. После шести часов экспозиции с НФ выживаемость снизилась до 86% при ЩС. В контроле выживаемость клеток составила 100%. При этом соотношение [GSH]/[GSSG] в условиях ЩС заметно возросло, в то время как в контроле осталось практически неизменным (табл. 4, рис. 6).

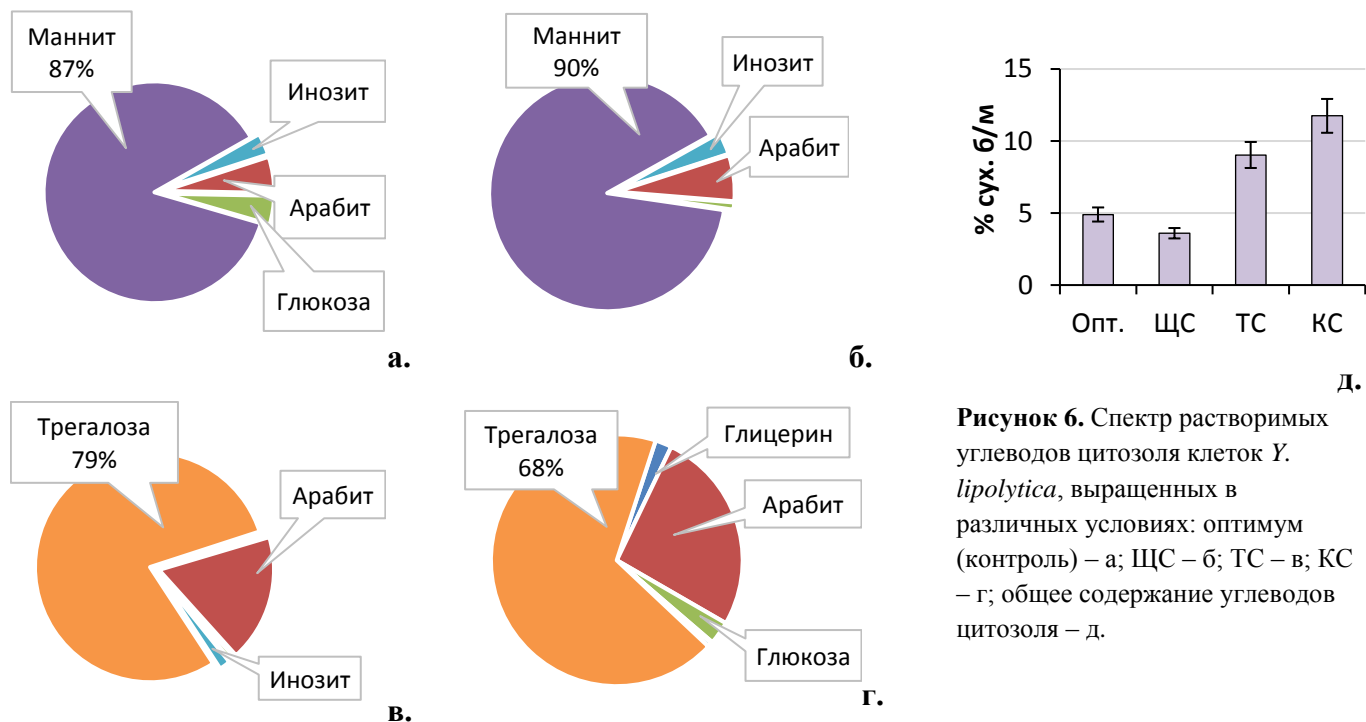


Рисунок 6. Спектр растворимых углеводов цитозоля клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях: оптимум (контроль) – а; ЩС – б; ТС – в; КС – г; общее содержание углеводов цитозоля – д.

Из этого можно заключить, что в щелочных условиях маннит оказывает косвенное цитопротекторное действие за счет восстановления резерва НАДФН в ходе его синтеза. НАДФН затем используется как восстановитель в регенерации GSSG, а ингибирование синтеза маннита *de novo* приводит к торможению работы глутатионовой системы.

Таблица 4. Параметры роста клеток при различных рН и 29°C после экспозиции с 200 мкМ НФ в течение 6 ч.

Условия выращивания	контроль	ЩС
Выживаемость, %	100	86
Содержание маннита, % от суммы *	89.95 → 81.6	89.1 → 90.7
Изменение [GSH]/[GSSG]*	4.21 → 4.52	2.09 → 16.00

* Перед знаком «→» приведены значения без обработки НФ (см. табл. 3, рис. 6), после знака – значение после 6 часов экспозиции с 200 мкМ НФ, внесенных в экспоненциальной стадии роста.

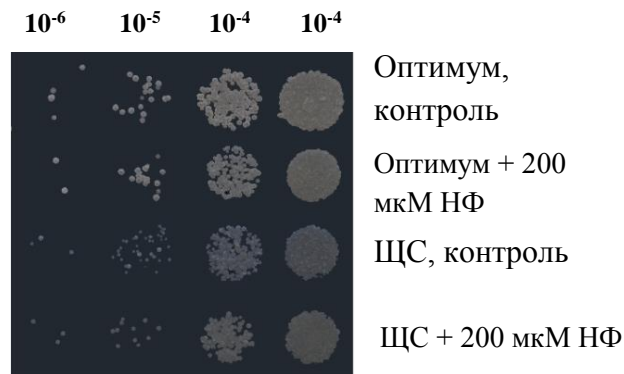


Рисунок 7. Влияние 6-часовой экспозиции с 200 мкМ НФ на жизнеспособность дрожжей *Y. lipolytica* в условиях культивирования при различных рН среды.

Адаптация к ТС и КС сопровождалась изменением качественного и количественного состава углеводов цитозоля. На фоне увеличения общего содержания растворимых углеводов основным углеводом цитозоля становилась трегалоза, значительно возрастала доля арабита и полностью исчезали маннит и глюкоза (рис. 6). При ТС в клетках *Y. lipolytica* замещение в углеводном спектре маннита трегалозой на фоне снижения содержания глюкозы позволяет предположить концепцию образования трегалозы *de novo*, либо за счет расходования маннита с целью стабилизации мембранных структур (Perfect, 2017). Известно, что трегалоза выступает протектором в условиях теплового шока, стабилизирует белки и липидные мембраны, предотвращает развитие окислительного стресса (Perfect, 2017). В геноме *Y. lipolytica* присутствуют гены, обуславливающие синтез трегалозы, однако содержание этого дисахарида независимо от используемых субстратов (глицерин, глюкоза) обычно не превышает 1 нмоль/мг сухой биомассы, что объясняется авторами высокой активностью трегалазы (Flores, 2011). Тепловой шок (40°C, 2 часа) сопровождался повышением содержания как трегалозы, так и уровня мРНК генов YITPS2 и YITPS3, (но не YITPS1), отвечающих за биосинтез этого дисахарида (Flores, 2011). Эти данные согласуются с обнаружением трегалозы в качестве основного углевода цитозоля у *Y. lipolytica* при ТС. Таким образом, кардинальное изменение состава цитозольных углеводов происходит при изменении температуры культивирования с 29°C до 38°C, причем жизнеспособность клеток сохраняется на высоком уровне как при рН 5.5, так и при рН 9.0.

В то же время предположение об универсальности трегалозы как компонента адаптации клеток к любому виду стресса в нашей работе не подтвердилось. Несмотря на то, что щелочные условия являются неблагоприятными для *Y. lipolytica*, как было показано ранее, при оптимальной температуре в этих условиях накопления трегалозы не наблюдалось.

4.2. Липидный спектр клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях

Клеточная мембрана представляет собой один из первых «рубежей» защиты клеток против неблагоприятных воздействий. Внутриклеточные мембраны, разграничивающие клеточные компартменты, обуславливают их свойства и часто являются сдерживающим фактором на пути повреждающих агентов эндогенного происхождения, во многом определяя адаптивный потенциал клеток. Не менее важную функцию выполняют запасные липиды. Содержащие их клеточные липидные капли выполняют различные цитопротекторные функции: ограничивают распространение повреждённых липидов и белков, поддерживают энергетический и окислительно-восстановительный баланс, сохраняют гомеостаз мембран и органелл (Jarc, 2019). Поэтому в следующей серии исследований нами были изучены изменения состава и содержания запасных и мембранных липидов, а также изменения спектра их жирных кислот в ответ на различные стрессовые воздействия. Результаты изменений состава запасных липидов приведены на рис. 8.

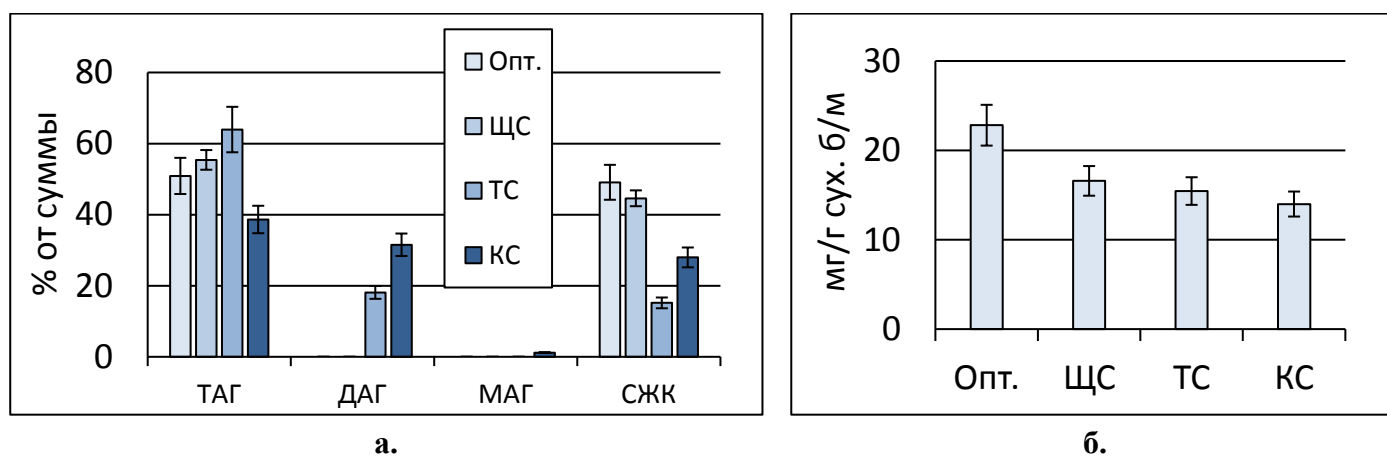


Рисунок 8. Спектр запасных липидов клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях: а – состав запасных липидов; б – общее содержание запасных липидов.

Важное значимое отличие, которое можно выделить среди культур, выращенных при 29°C – некоторое снижение содержания запасных липидов при ЩС. Повышение температуры при этом в обоих случаях приводило к: снижению общего содержания запасных липидов; появлению в их составе значительного количества ДАГ; и снижению содержания СЖК. Вместе с изменениями ультраструктуры клеток (рис. 4), данные изменения свидетельствуют о том, что ЩС, ТС и КС вызывают потребление запасных липидов для покрытия энергетических нужд клетки. Повышенная температура при этом активизирует процесс β -окисления ТАГ, для чего необходима ассоциация ЛВ с митохондриями и/или пероксисомами.

Количество мембранных липидов также уменьшалась в ходе рН-адаптации к ЩС (рис. 9, а). Компонентный состав мембранных липидов в этих условиях варьировал незначительно. Однако, при повышении температуры культивирования было отмечено снижение доли КЛ в мембранах митохондрий в 1.5 – 2 раза, соответственно. Известно, что КЛ выполняют функции «ловушек протонов» (El-Hafidi, 2020), что позволяет КЛ создавать градиент протонов как на внутренней, так и на внешней мембранах митохондрий. КЛ играют важнейшую роль в поддержании митохондриальных функций и биогенезе органелл, взаимодействуя с широким числом митохондриальных белков как за счет гидрофобных, так и в результате электростатических взаимодействий, и стабилизируя белки митохондриальной дыхательной цепи (Joshi, 2010). В 2006 г Ростовцева и Безруков (Rostovtseva, 2006) показали, что богатые КЛ участки внешней мембраны митохондрий характеризуются повышенной активностью митохондриального порина VDAC, необходимого для вывода супероксидного анион-

радикала из митохондрий. Можно предположить, что снижение содержания КЛ при КС позволяет снизить активность VDAC, что предотвращает выход АФК из митохондрий и повреждение мембранных органелл и белков цитоплазмы.

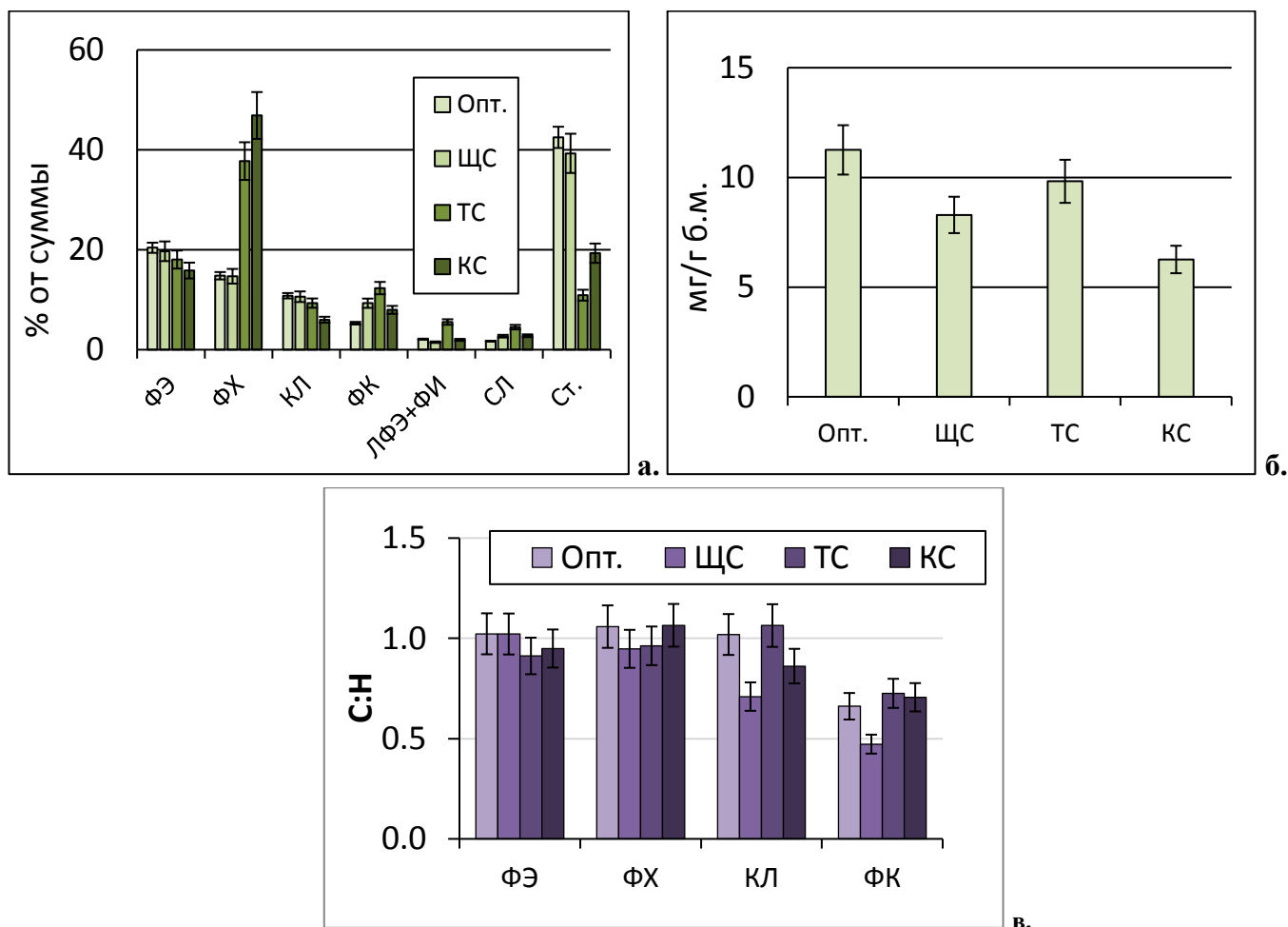


Рисунок 9. Спектр мембранных липидов клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях: а – состав мембранных липидов; б – общее содержание мембранных липидов; в – показатели ненасыщенности основных классов мембранных липидов.

Чрезвычайно важным аспектом функционирования КЛ является состав его жирных кислот (Joshi, 2010). В данной работе было показано, что как повышенные, так и пониженные значения рН вызывали некоторые изменения в жирнокислотном составе фракции КЛ мембран. Так, доля С17:0 в этой фракции при КС увеличивалась от нуля до 45%, а при ЩС - до 14% на фоне снижения доли С12:0, С14:0, С15:0 и С16:0 кислот. Заметные количества С17:0 (12.19%) и С17:1 (9.31%) жирных кислот были обнаружены при культивировании *Y. lipolytica* в ферментерах на глицерине в качестве источника углерода (Machado-Junior, 2015). Возможно, увеличение содержания насыщенной жирной кислоты в составе КЛ митохондрий в условиях стресса способствует поддержанию стабильности и жесткости клеточных мембран согласно принципам гомеовязкозной адаптации (homeoviscous adaptation), включающей перестройку липидного состава клеточной мембраны для поддержания ее адекватной текучести (Glatz, 2016).

Наиболее заметным эффектом ТС на состав мембранных липидов было значительное повышение доли ФХ на фоне снижения Ст. ФХ представляют собой фосфолипиды, синтезируемые в эндоплазматическом ретикулуме из ФЭ в метаболическом пути Кеннеди (McMaster, 2018). Важность гомеостатического равновесия между этими двумя классами соединений для поддержания функций

митохондрий и противостояния окислительному стрессу была показана для *C. albicans* в работе (Thoma, 2013). Известно, что ФХ, являясь бислойным липидом, обеспечивают стабильность структуры мембран (Януцевич, 2020). Вероятно, в нашем случае увеличение доли ФХ на фоне снижения СТ может компенсировать снижение ненасыщенности ацильных цепей липидов, входящих в состав мембран. Отчасти это предположение подтверждается тем, что при повышении температуры жирные кислоты ФХ сохраняют наибольшую степень ненасыщенности (рис. 9, в).

Среди минорных мембранных липидов мы обнаружили также увеличение доли ФК в спектре мембранных липидов при тепловом и комбинированном воздействиях. Эти данные нашли согласование с результатами Януцевич и соавт. (Януцевич, 2016), которые показали, что стрессовые воздействия различной природы (тепловой и холодной шок, окислительный и осмотический стрессы) на мицелиальный гриб *Aspergillus niger* приводили к значительному возрастанию содержания ФК в составе его мембран. Авторы предположили, что вклад ФК в адаптацию гриба к стрессовым воздействиям состоит в увеличении стабильности клеточных мембран и интенсификации везикулярного транспорта, эндо- и экзоцитоза. Вероятно, в случае адаптации *Y. lipolytica* к ТВ и щелочному стрессу имеет место подобный механизм.

Изменение СН ацильных цепей мембранных липидов в наших исследованиях носило различный характер в зависимости от типа применяемого стрессора. Общее снижение С:Н ацильных цепей мембранных липидов, имеющее место при ТС и КС, можно объяснить тем, что по мере увеличения ненасыщенности ацильной цепи температура плавления вещества снижается, а значит, клеткам становится труднее поддерживать структурную организацию и нормальное функционирование клеточных мембран (Glatz, 2016).

Интересно отметить, что в условиях КС происходили значительные изменения в качественном и количественном составе липидов, при этом еще больше снижалась доля нейтральных и мембранных липидов и уровень ТАГ (рис. 8, б; рис. 9, б), в то время как доля кислоты С18:3 в составе фосфолипидов мембран уменьшалась практически до нуля на фоне полного исчезновения кислоты С12:0. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях КС тепловой фактор является доминирующим, обуславливающим перестройку липидного метаболизма в сторону усиления жесткости мембран, в частности, за счет появления в липидном спектре насыщенных С14:0 и С17:0 кислот и увеличения доли С16:0.

Таким образом, ЩС и ТС приводили к различным адаптивным изменениям на уровне липидома. При этом изменения липидома при КС имели больше общих черт с изменениями, вызываемыми ТС, чем ЩС, из чего следует приоритетность ответа клеток на повышение температуры по сравнению с повышенным рН.

4.3. Изучение протеома клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях

Важнейшим фактором адаптации к любого вида стрессорам является метаболическая перестройка, обусловленная изменениями протеомного состава клеток. Протеом клеток *Y. lipolytica* изучался в оптимальных условиях, а также при ЩС, ТС и КС. Экстракты клеток, выращенных в этих условиях, были разделены методом двумерного электрофореза белков по О'Фареллу, а затем пятна, интенсивность которых значительно различалась в условиях эксперимента, были идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Электрофоретические карты для каждого варианта представлены на рис. 10.

Всего было выявлено 66 белковых пятен, интенсивность которых в разных условиях заметно различалось. Стоит отметить, что в некоторых случаях белковые пятна состояли из смеси нескольких белков, а также содержали короткие фрагменты известных белков. Наборы белков, характерных для различных условий культивирования, были сопоставлены между собой. При этом многие белки,

обнаруженные в виде фрагментов, были отнесены в базе данных «Matrix Science» не к *Yarrowia lipolytica*, а к таксономически близким представителям рода *Candida*. По этой причине было принято решение сопоставлять идентифицированные белки не по названиям, как это принято делать в подобных исследованиях, а по функции. Результаты сравнения этих наборов в виде диаграммы Вьенна приведены на рис. 11.

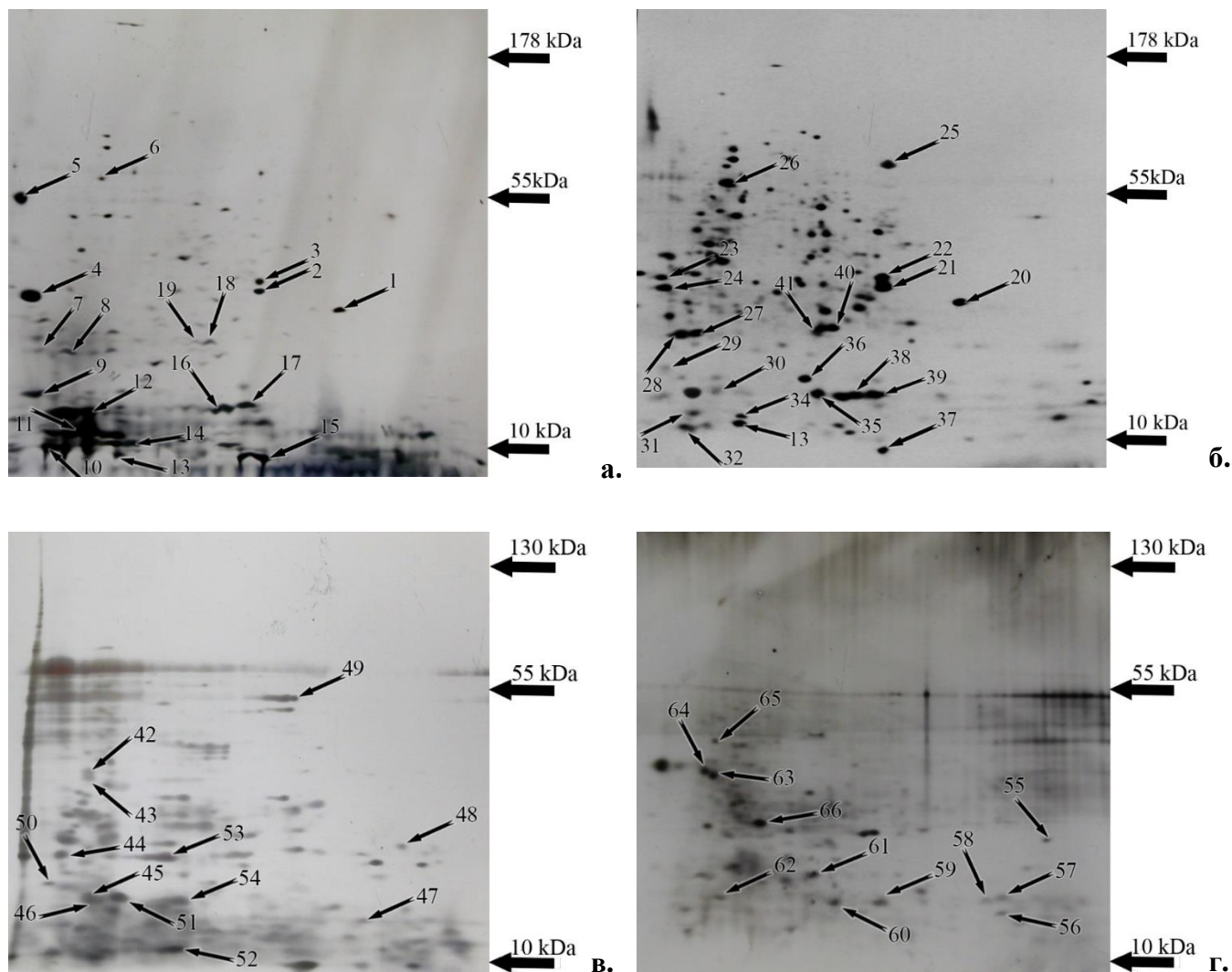


Рисунок 10. Карты двумерного электрофореза белковых экстрактов клеток *Y. lipolytica*, выращенных в разных условиях: а – оптимальные; б – ЦС, в – ТС, г – КС.

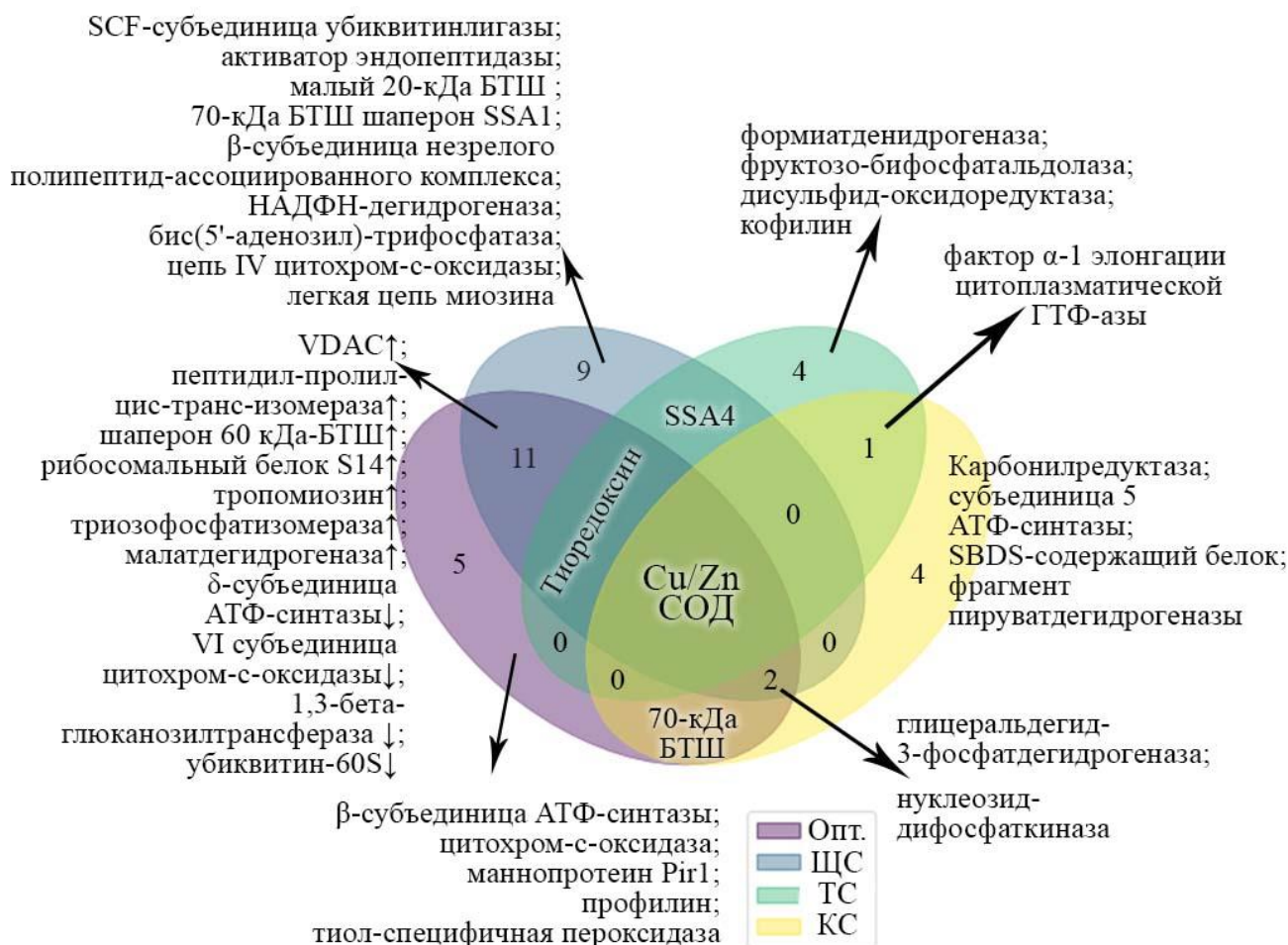


Рисунок 11. Сравнение профилей экспрессии белков клетками *Y. lipolytica* выращенными в разных условиях.

Следует отметить, что SPAR2 – белки в базе данных «MatrixScience» отнесены к виду *Candida parapsilosis*. Вероятно, в стрессовых условиях у *Y. lipolytica* синтезируются неизвестные ранее формы этих белков, более близкие к *C. parapsilosis*. Уникальными для оптимальных условий оказались 5 белков. Среди них 2 белка окислительного фосфорилирования – β-субъединица АТФ-синтазы (YALI0F03179p) и цитохром-с-оксидаза (цитохром-с-оксидаза); два структурных белка – маннопротеин клеточной стенки Pir1 (YALI0B20306p) и профилин (YALI0B07183p), а также тиол-специфичная пероксидаза (YALI0A19426p), необходимая для поддержания редокс-гомеостаза клетки. Такой набор белков может быть ассоциирован с активными процессами роста и деления клеток.

Для щелочных условий оказались уникальны 9 белков: 2 белка, связанных с процессом убиквитинирования: SCF-субъединица комплекса убиквитинлигазы E3 (YALI0A10879p) и активатор эндопептидазы (YALI0B09339), другими уникальными для ЩС белками стали представители семейства БТШ - малый 20-кДа БТШ (YALI0C03443p) и представитель 70-кДа БТШ шаперон SSA1 (YALI0C17347p), а также β-субъединица незрелого полипептид-ассоциированного комплекса (YALI0F08393p). Все эти компоненты объединены функцией контроля качества белка (Andersson, 2021), что важно для длительного поддержания жизнеспособной культуры клеток в неблагоприятных условиях. Оставшиеся 4 белка, уникальные для ЩС – это НАДФН-дегидрогеназа (YALI0B07007p), вовлеченная в метаболизм пуринов, бис(5'-аденозил)-трифосфатаза (YALI0E32736p), цепь IV цитохром-с-оксидазы (YALI0E19723p) и легкая цепь миозина (YALI0E03388p).

Среди общих для оптимальных условий и ЩС оказались 11 белков, при этом экспрессия 4 из них снижалась. Два из этих белков – белки окислительного фосфорилирования – δ -субъединица АТФ-синтазы (YALI0D22022p) и VI субъединица цитохром-с-оксидазы (YALI0E10144p). Два других белка – это вовлеченная в метаболизм углеводов 1,3-бета-глюканозилтрансфераза (YALI0B03564p) и убиквитин-60S. Для 7 белков экспрессия при ЩС увеличивалась. Среди них VDAC (YALI0F17314p), два белка фолдинга – пептидил-пролил-цис-транс-изомераза (YALI0C10230p) и шаперон 60 кДа-БТШ (YALI0F02805p). Также при ЩС увеличивалась экспрессия 40S рибосомального белка S14 (A0A1H6Q0M6), тропомиозина (YALI0F27049p), необходимого для деления клеток и клеточного транспорта, триозофосфатизомеразы (YALI0F05214p), вовлеченной в гликолиз, и фермента ЦТК малатдегидрогеназы (YALI0D16753p). Показанные изменения протеома при ЩС сводятся к двум ключевым потребностям клетки при ЩС: с одной стороны, это потребность в снижении повреждающего эффекта АФК, которая реализуется через регуляцию цитохром-с-оксидазы при помощи субъединиц IV и VI (Timón-Gómez, 2020), а также через переключение метаболизма на гликолиз и β -окисление липидов. Важную регуляторную роль в этом процессе играет VDAC (De Pinto, 2021). С другой стороны, большое значение приобретает контроль качества белка – процесс, в ходе которого *de novo* синтезируемые белки проверяются на разных уровнях структурной организации, а синтезированные с ошибками белки подлежат уничтожению. Показано, что этот процесс позволяет противостоять репликативному старению дрожжей, растущих в неблагоприятных условиях (Yoshida, 2021).

Уникальными для ТС оказались 4 белка: формиатдегидрогеназа (в виде двух разных фрагментов YALI0B22506p и полного белка SPAR2_203450), фруктозо-бифосфатальдолаза (SPAR2_401230), дисульфид-оксидоредуктаза (SPAR2_106080), и кофилин (YALI0F20856p). Формиатдегидрогеназа – это фермент, окисляющий формиат до CO_2 с восстановлением НАД^+ до НАДН. Для ряда дрожжей и растений показана значимость этого процесса в защите от окислительного стресса (McNeilly, 2018). Снижению повреждающей активности АФК также могут служить дисульфид-оксидоредуктаза и увеличение роли гликолиза. 70 к-Да БТШ имеют множество функций в ответе на стресс, но все они имеют отношение к защите белков от повреждающих воздействий (фолдинг, дезагрегация и деградация поврежденных белков).

Общими для ТС и ЩС оказались 70 к-Да БТШ семейства SSA4. Примечательно, что в случае ЩС это был белок YALI0D08184p, а в случае ТС обнаруживались фрагменты YALI0D22352p и YALI0E35046p. Кроме того при ЩС и ТС встречались неохарактеризованные белки: YALI0D00451p, YALI0F08327p и YALI0A10747p при ЩС, а также SPAR2_802980 при ТС.

Уникальными для КС оказались 4 типа белков. В первую очередь это карбонилредуктазы CPR1 (фрагмент) и SPAR2_502580. Известно, что карбонилредуктазы участвуют в обезвреживании цитотоксичных продуктов перекисного окисления липидов (Rashid, 2016; Kwon, 2018). Еще тремя уникальными для КС белками стали субъединица 5 АТФ-синтазы SPAR2_503440, содержащий SBDS-домен белок SPAR2_406210, участвующий в генезе рибосом, и фрагмент пируватдегидрогеназы SPAR2_402950.

Единственным общим для ТС и КС белком стал фактор α -1 элонгации цитоплазматической ГТФ-азы. Причем при ТС это был белок Q0ZIC1_CANPA, а при КС - фрагмент белка SPAR2_207060. Общих для ЩС и КС белков не оказалось. Примечательно, что SSA4, характерный как для ТС, так и для ЩС в условиях КС не обнаруживался.

Общими для КС, ЩС и оптимальных условий стали два белка - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (YALI0C06369p при оптимуме и ЩС и SPAR2_808670 при КС), а также нуклеозид-дифосфаткиназа (YALI0F09229p при оптимуме и ЩС и фрагмент SPAR2_101390). Для оптимальных условий и КС общими также стали 70 кДа БТШ - SPAR2_700380 при КС и фрагмент YALI0F25289p в оптимальных условиях. Общим для оптимальных условий, ЩС и ТС стал

тиоредоксин (при оптимуме и ЩС - YALI0F01496p, причем при ЩС его содержание снижалось, и CPAR2_200490 при ТС).

Наконец, для всех исследованных условий оказалась характерна Cu/Zn-СОД. В случае оптимальных условий и ЩС это была YALI0E12133p, причем при ЩС ее содержание возрастало. В случае ТС и КС - CPAR2_500390, причем при КС она появлялась в виде фрагмента.

Таким образом, к наиболее универсальным цитопротекторным белкам можно отнести Cu/Zn-СОД, тиоредоксин и различные 70-кДа БТШ шапероны. Уникальными для ЩС факторами адаптации являются регуляция работы цитохром-с-оксидазы и увеличение количества VDAC. При адаптации к ТС уникальным белком является формиатдегидрогеназа, а к КС – карбонилредуктаза.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ПРОМОТОРА ГЕНА *POR1* КЛЕТКАХ *Y. LIPOLYTICA*, ВЫРАЩЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ, С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПОДХОДОВ.

На основании проведенных протеомных исследований нами было сделано предположение, что индукция митохондриального порина VDAC может быть универсальной реакцией на стресс у вида *Y. lipolytica* W29. Для подтверждения этой гипотезы был создан штамм-трансформант на основе *Y. lipolytica* W29, несущий генетическую конструкцию pUVLT2, включающую ген β-галактозидазы *E.coli* под контролем промотора гена митохондриального порина VDAC (*POR1*) (рис. 12а.)

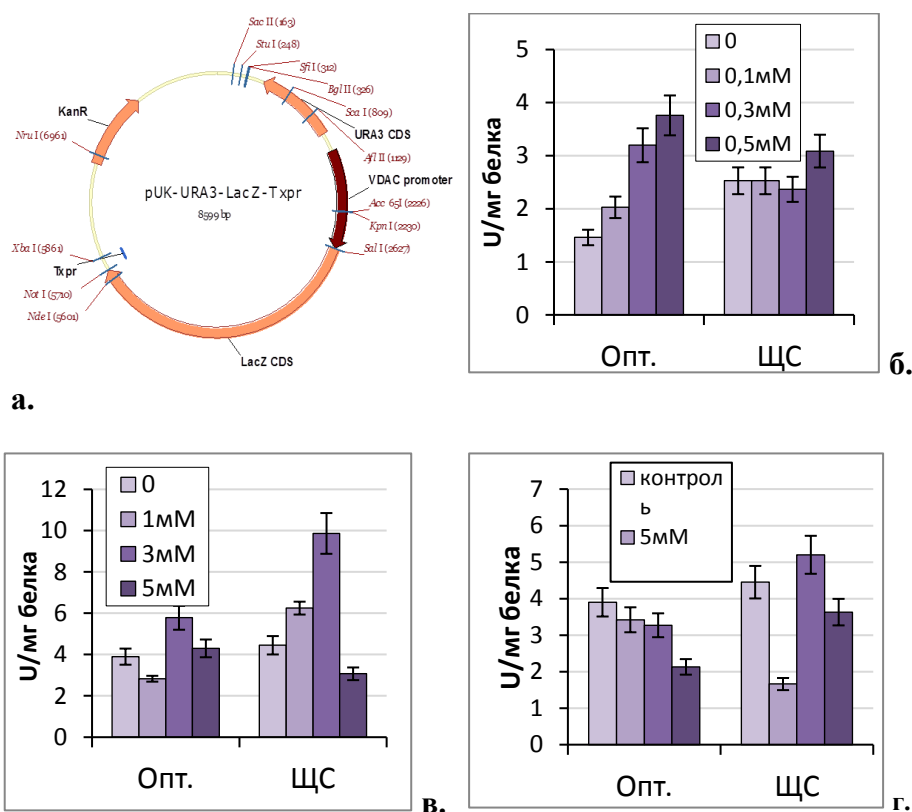


Рисунок 12. Изменения активности β-галактозидазы в клетках трансформанта *Y. lipolytica* W29, несущего генетическую конструкцию pUVLT2 (а), в зависимости от условий культивирования и концентраций различных прооксидантов: менадиона – б; метилвиологена – в; перекиси водорода – г.

Культуры трансформанта были выращены в оптимальных условиях, а также при ЩС. В качестве дополнительного экзогенного стрессового воздействия были выбраны различные концентрации прооксидантов – менадиона, метилвиологена и перекиси водорода (рис. 12 б, в, г, соответственно). Было показано, что ЩС приводил к наиболее заметной индукции промотора *POR1* в случае использования H₂O₂ и метилвиологена в качестве прооксидантных агентов. Причём эта зависимость от концентрации оксидантов имела нелинейный характер (Рис. 12). В случае использования менадиона, наибольший эффект достигался при оптимальном значении рН, причем индукция промотора *POR1* линейно зависела от концентрации оксиданта.

Таким образом, в данном блоке исследований была подтверждена закономерность, выявленная ранее для штамма *Y.lipolytica PO1f* и свидетельствующая об индукции митохондриального порина VDAC (YALI0F17314p) в условиях ЩС (Гусева, 2011). Гипотеза о вовлечении VDAC в антиоксидантную защиту клеток *Y. lipolytica* подтвердилось, однако точный механизм и роль этого белка до конца не ясны. Можно предположить, что возрастание экспрессии гена митохондриального порина *POR1* может быть универсальной реакцией *Y.lipolytica* на стресс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты наших исследований позволяют заключить, что различные виды стрессового воздействия на культуру *Y. lipolytica W29* приводят к активации уникальных адаптивных механизмов, причём различия могут быть как качественными, так и количественными. Так, ЩС можно считать выраженным стрессовым воздействием, приводящим к заметному повышению уровня АФК, для противостояния которым происходит индукция АО, рост активности СОД и каталазы на фоне заметного снижения соотношения [GSH]/[GSSG]. Из полученных данных также можно заключить, что при ЩС АФК выходят в цитоплазму через VDAC, где для их инактивации повышается содержание СОД, а повреждение белков предотвращается 20 кДа и 70кДа БТШ.

При ТС стратегия адаптации клеток меняется: с противостояния АФК фокус смещается на стабилизацию мембран и защиту белков от агрегации. При этом метаболизм углеводов смещается в сторону накопления трегалозы (рис.13). Однако, перед клеткой встаёт задача восполнения резерва НАДФН, которая при оптимальной температуре решалась в пути синтеза маннита. Эта проблема может быть решена, в том числе, при обращении метаболизма сахаров в сторону пентозофосфатного пути, побочным продуктом которого является арабит (рис. 13).

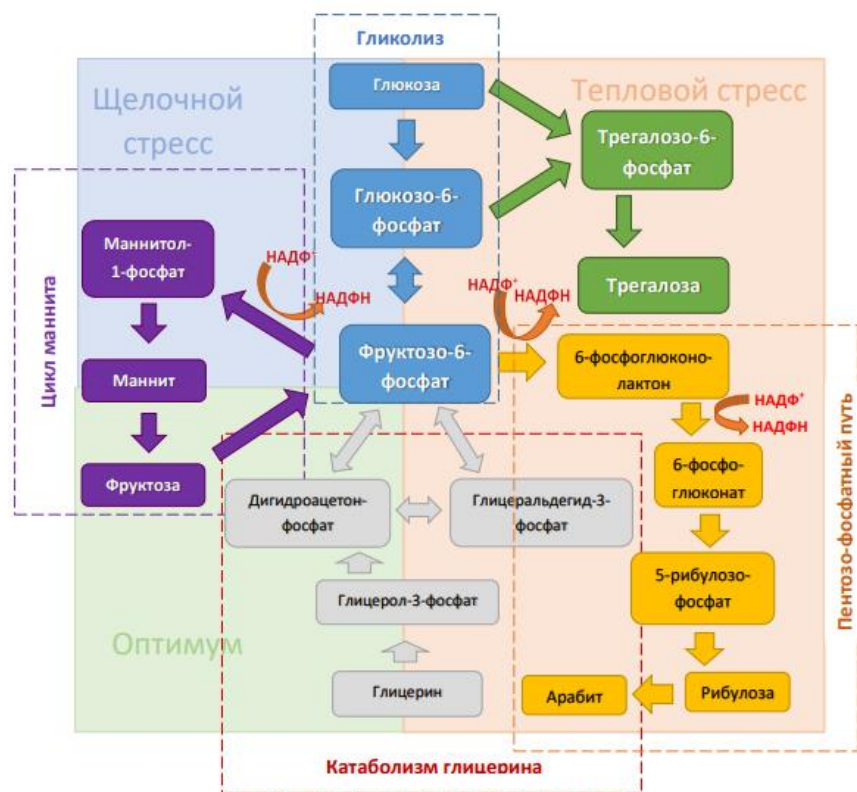


Рисунок 13. Гипотетическая схема изменений метаболизма углеводов *Y. lipolytica* при оптимальной температуре в условиях ЩС и ТС при утилизации глицерина.

Еще одним важным фактором адаптации клеток к ТС становится радикальная перестройка метаболизма липидов (рис. 14), которая включает в себя переход энергетического метаболизма на β-окисление ТАГ, замещение Ст в мембранах на ФХ и рост содержания ФК в мембранах.

Со стороны протеома ответ на ТС включает в себя повышение разнообразия БТШ, вовлечение формилдегидрогеназы в поддержание редокс-гомеостаза и активное обезвреживание поврежденных в ходе протеолиза клеточных белков.

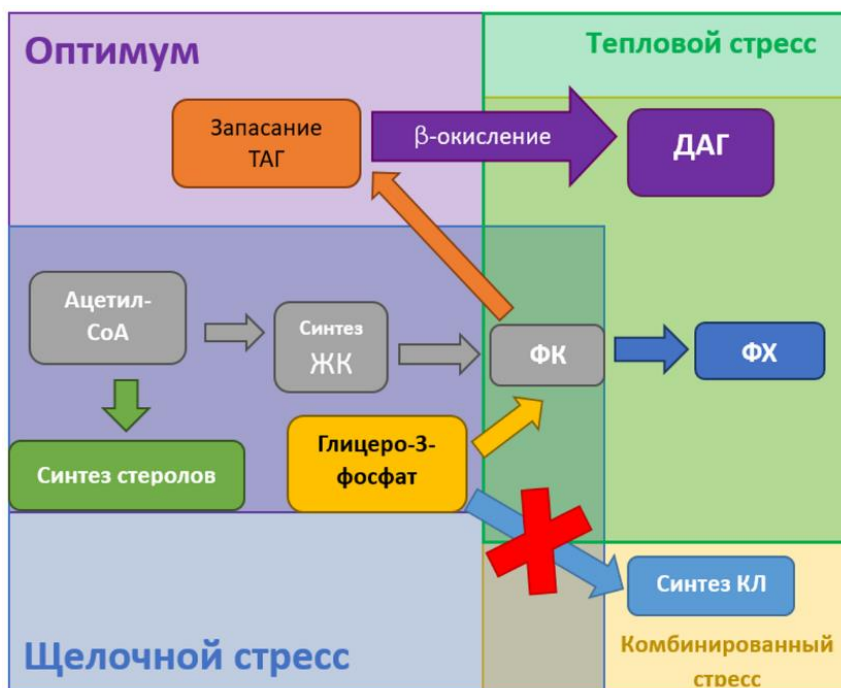


Рисунок 14. Гипотетическая схема изменений метаболизма липидов *Y. lipolytica* при оптимальной температуре в условиях ЩС и ТС при утилизации глицерина.

Адаптация к КС, оказывающему наиболее выраженное воздействие на дрожжевые клетки, включает в себя перестройки метаболизма углеводов и липидов, а также индукцию АО и ферментов первой линии защиты, аналогичные ТС. Кроме того, в этих условиях индуцируется защита клеток от продуктов перекисного окисления липидов, для чего в протеоме появляются карбонилредуктазы. Повреждение белков и последующий протеолиз при этом усиливаются – многие уникальные белки обнаруживаются в виде фрагментов. К способам защиты от токсичных продуктов перекисного окисления при КС также можно отнести сокращение содержания мембранных липидов в клетках. Заметное усиление индукции антиоксидантных ферментов и АО митохондрий, а также сдвиг метаболизма в сторону адаптации к повышению температуры приводят к возникновению перекрестной адаптации, которая позволяет повысить выживаемость клеток.

Наши исследования подтверждают, что митохондриальный порин VDAC, важность которого была показана при адаптации к ЩС, является важным компонентом приспособительной стратегии дрожжевых клеток *Y. lipolytica* к окислительному стрессу, но не ТС. Вероятно, при ТС и КС выход АФК в цитоплазму является нежелательным явлением, приводящим к повреждению белков и липидов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны эффективные экспериментальные модели для исследования адаптивного ответа штамма дрожжей *Y. lipolytica* W29 на долгосрочное действие условий экстремально щелочных pH (pH 9.0), высокой температуры (38°C) и их комбинации.
2. Все исследованные стрессовые воздействия приводят к развитию в клетках *Y. lipolytica* W29 адаптивного ответа, о чем свидетельствует изменение параметров роста, индукция АО, рост уровня АФК и активности СОД, а также снижение соотношения [GSH]/[GSSG].

3. Специфическая устойчивость *Y. lipolytica* к ЩС обеспечивается за счет снижения повреждающего эффекта АФК за счет регуляции окислительного фосфорилирования, увеличения содержания VDAC во внешней мембране митохондрий и высокого цитозольного содержания маннита – полиола с антиоксидантными свойствами.
4. Адаптация *Y. lipolytica* к повышенной температуре культивирования достигается за счет многократного повышения активности каталазы, накопления в цитозоле цитопротекторного дисахарида трегалозы, смещения метаболизма в сторону β -окисления запасных ТАГ и изменения состава мембранных липидов за счет замещения Ст на ФХ и ФК при увеличении степени ненасыщенности жирных кислот.
5. При культивировании *Y. lipolytica* в условиях КС наблюдается эффект перекрестной адаптации, который заключается в смещении метаболизма в сторону противодействия фактору с большим повреждающим эффектом – температуре. При этом возрастает выживаемость клеток и снижается уровень АФК.
6. Универсальными цитопротекторными белками при адаптации клеток *Y. lipolytica* W29 к исследованным стрессовым воздействиям являются Cu/Zn-СОД, тиоредоксин и шапероны 70-кДа БТШ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. **Секова В. Ю., Исакова Е. П., Дерябина Ю. И.** Применение экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в биотехнологии (обзор) //Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – №. 3. – С. 290-290.
2. **Секова, В. Ю., Гесслер, Н. Н., Исакова, Е. П., Антипов, А. Н., Дергачева, Д. И., Дерябина, Ю. И., и Трубникова, Е. В.** Окислительно-восстановительный статус экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при адаптации к рН-стрессу //Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – №. 6. – С. 570-570.
3. **Куланбаева, Ф. Ф., Секова, В. Ю., Исакова, Е. П., Дерябина, Ю. И., и Николаев, А. В.** Новый эффективный промотор гена митохондриального потенциалзависимого порина VDAC в геноме дрожжей *Yarrowia lipolytica* //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2016. – Т. 470. – №. 4. – С. 475-478.
4. **Секова, В. Ю., Дергачева, Д. И., Терешина, В. М., Исакова, Е. П., и Дерябина, Ю. И.** Углеводный спектр экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях рН-стресса //Микробиология. – 2018. – Т. 87. – №. 2. – С. 125-135.
5. **Sekova, V. Y., Dergacheva, D. I., Isakova, E. P., Gessler, N. N., Tereshina, V. M., Deryabina, Y. I.** Soluble sugar and lipid readjustments in the *Yarrowia lipolytica* yeast at various temperatures and pH //Metabolites. – 2019. – Т. 9. – №. 12. – С. 307.
6. **Sekova, V. Y., Kovalyov, L. I., Kovalyova, M. A., Gessler, N. N., Danilova, M. A., Isakova, E. P., & Deryabina, Y. I.** Proteomics Readjustment of the *Yarrowia lipolytica* Yeast in Response to Increased Temperature and Alkaline Stress //Microorganisms. – 2021. – Т. 9. – №. 12. – С. 2619.

Доклады на конференциях:

1. **Секова В.Ю., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И.** Роль систем антиоксидантной защиты экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в реализации адаптивного ответа на рН стресс. Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 27-30 мая 2013 г., с.598.

2. **Sekova V., Isakova E.P., Deryabina Y. I.** Mannitol Protects Alkalophilic Yeast of *Yarrowia lipolytica* against Unfavourable Conditions (постерная сессия – постер P190) 10th International Congress on Extremophiles, Saint Petersburg, Russia, September 7-11, 2014, p.329.
3. **Дергачева Д.И., Секова В.Ю.** Перекрестная адаптация полиэкстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* к неблагоприятным факторам среды. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015». Москва, МГУ. 13-17.04.2015.
4. **Секова В.Ю., Дергачева Д.И., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И.** Изучение адаптации дрожжей *Yarrowia lipolytica* к тепловому и pH – стрессу. Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Материалы межд. конф. Пущино: ФГБУН Институт Биофизики Клетки РАН. 2015. С. 560 – 563.
5. **В. Ю. Секова, И. С. Клемешова.** Цикл маннита играет важную роль в адаптации дрожжей *Yarrowia lipolytica* к низким pH среды. Тезисы X молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Москва: Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. 27 — 30 октября 2015 г. С. 136-138
6. **Дергачева Д.И., Секова В.Ю.** Дрожжи *Yarrowia lipolytica* демонстрируют некоторые элементы перекрестной адаптации при воздействии теплового и pH-стрессов. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016». Москва, МГУ. 11-15. 04. 2016.
7. **Секова В.Ю., Дергачева Д.И.** Липидный спектр дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях температурного и pH-стрессов. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016». Москва, МГУ. 11-15. 04. 2016.
8. **Sekova, V., Dergacheva, D., Kharchenko, E., Teplova, V., Isakova, E., & Deryabina, Y.** Study of physiological regulation of the POR1 gene in the *Yarrowia lipolytica* yeast //FEBS JOURNAL. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL, 2016. – Т. 283. – С. 372-372.
9. **В.Ю. Секова, Е.П. Исакова, Д.И. Дергачева, Ю.И. Дерябина.** Исследование физиологической регуляции экспрессии гена POR1 у дрожжей *Yarrowia lipolytica*. // ACTA NATURAE. 2016. Т.2. Спецвыпуск «НАУЧНЫЕ ТРУДЫ V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России». С. 51
10. **Дергачёва Д.И., Секова В.Ю.** Изучение ультраструктурной организации клеток экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica*. В условиях теплового и pH-стрессов. Современная микология в России. 2017. Т.6. С. 82.
11. **Секова В.Ю.** Изменения спектра углеводов дрожжей *Yarrowia lipolytica* в ответ на тепловой и pH-стрессы. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018». Москва, МГУ. 9-13. 04. 2018.
12. **Varvara Yu. Sekova, Daria I. Dergacheva, Natalia N. Gessler, Elena P. Isakova, Vera M. Tereshina and Yulia I. Deriabina.** Lipid composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* cells under pH-and thermal exposures. 14th Yeast Lipid Congress. Ljubljana, Slovenia 22-24.05.2019.
13. **Sekova V., Dergacheva D.** The proteome of *Yarrowia lipolytica* yeast during adaptation to a combined (cross) pH and heat stress //FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA : WILEY, 2019. – Т. 9. – С. 135-135.
14. **Dergacheva D., Sekova V.** The influence of the medium pH and hydrogen peroxide on the redox status of the *Yarrowia lipolytica* yeast //FEBS OPEN BIO. – 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2019. – Т. 9. – С. 171-172.