

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

*На правах рукописи*

**Секова Варвара Юрьевна**

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

1.5.4. Биохимия

**Диссертация**

на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук Дерябина Ю.И.

МОСКВА 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Механизмы антистрессовой устойчивости у грибов.....	16
1.1.1 Развитие окислительного стресса.....	16
1.1.1.1. Химические свойства АФК.....	16
1.1.1.2. Повреждающий эффект АФК.....	20
1.1.2. Механизмы защиты клеток от окислительного стресса.....	22
1.1.2.1. Ферменты первой линии антиоксидантной защиты.....	23
1.1.2.1.1. СОД.....	23
1.1.2.1.2. Кatalаза.....	27
1.1.2.1.3. Глутатион и ферменты глутатионовой системы.....	29
1.1.2.1.3.1. Глутатион.....	29
1.1.2.1.3.2. Глутатионпероксидазы.....	31
1.1.2.1.3.3. Глутатионредуктаза.....	32
1.1.3. Альтернативная оксидаза митохондрий.....	34
1.1.4. Другие белковые компоненты защиты клеток от окислительного стресса.....	36
1.1.4.1. Тиоловые пероксидазы.....	36
1.1.4.2. Тиоредоксины.....	37
1.1.4.3. Глутаредоксины.....	38
1.1.4.4. Пероксиредоксины.....	39
1.1.5. Механизмы устойчивости дрожжевых клеток к рН-стрессу.....	40
1.1.6. Механизмы устойчивости дрожжей к ТШ.....	48
1.1.7. БТШ.....	52
1.1.8. Перекрёстная адаптация у грибов.....	55
1.2. Роль компонентов углеводной природы в адаптации клеток грибов к стрессам.....	62
1.3. Роль липидных компонентов в антистрессовой устойчивости клеток.....	66
1.3.1. Запасные липиды.....	66
1.3.2. Роль мембранных липидов в антистрессовой защите клеток.....	67
1.4. Изменения протеома клеток грибов в условиях стресса.....	73
1.4.1. Агрегация и секвестрация белков.....	73
1.4.2. Поиск универсального «стрессового» протеома.....	74
1.5. Структурная реорганизация грибных клеток в условиях стресса.....	78
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	82
2.1. Методы поддержания культуры дрожжей <i>Y. lipolytica</i> .....	82
2.2. Методы оценки выживаемости клеток.....	83
2.2.1. Метод Коха.....	83

2.2.2. Спот-тест.....	84
2.2.3. Проточная цитометрия с окрашиванием иодистым пропидием.....	84
2.3. Методы микроскопии.....	84
2.3.1. Световая микроскопия.....	84
2.3.2. Окрашивание клеток флуоресцентными красителями.....	85
2.3.3. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).....	86
2.3. Методы определения углеводного и липидного состава клеток.....	86
2.3.1. Определение углеводного спектра клеток.....	87
2.3.2. Определение липидного состава клеток.....	87
2.4. Анализ протеома клеток.....	89
2.4.1 Двумерный электрофорез по О'Фарреллу.....	89
2.4.2 Идентификация белков масс-спектрометрией.....	91
2.5. Анализ параметров редокс-статуса клеток.....	91
2.5.1. Исследование активности СОД.....	92
2.5.2. Определение суммарной каталазной активности.....	92
2.5.3. Получение электрофоретических профилей каталазы и СОД в ПААГ.....	93
2.5.4. Исследование содержания в клетках восстановленной и окисленной форм глутатиона.....	94
2.5.5. Исследование активности ферментов глутатионовой системы.....	95
2.5.6. Исследование уровня АФК в клетках.....	95
2.5.7. Исследование скоростей клеточного дыхания.....	96
2.6. Измерение содержания белка по методу Бредфорд.....	97
2.7. Изучение экспрессии гена <i>POR1</i> .....	97
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	100
3.1. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ РОСТА И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КУЛЬТУРЫ <i>Y. LIPOLYTICA</i> ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	100
3.1.1. Параметры роста культуры <i>Y. lipolytica</i> .....	100
3.1.1.1 Исследование кинетики накопления биомассы в суспензионной культуре дрожжей <i>Y. lipolytica</i> в различных условиях.....	101
3.1.2. Выживаемость клеток <i>Y. lipolytica</i> , выращенных при различных значениях рН и в условиях ТШ.....	103
3.1.3. Изучение ультраструктуры клеток <i>Y. lipolytica</i> , выращенных при различных значениях рН и температурных режимах.....	106
3.1.4 Флуоресцентное окрашивание клеток <i>Y. lipolytica</i> , выращенных при различных значениях рН и температурных режимах.....	108
3.2. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС КУЛЬТУРЫ <i>Y. LIPOLYTICA</i> ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	111
3.3. ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС КУЛЬТУРЫ <i>Y. LIPOLYTICA</i> ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	113

3.3.1. Исследование уровня АФК в клетках <i>Y. lipolytica</i> , выращенных при разных условиях. ....	113
3.3.2. Изменения активности ферментов первой линии защиты .....	114
3.3.2.1 Изменения активности СОД .....	114
3.3.2.2 Изменения активности каталазы .....	117
3.3.3. Изучение соотношения восстановленного и окисленного глутатиона в клетках.....	119
3.4. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ОТВЕТ КУЛЬТУРЫ <i>Y. LIPOLYTICA</i> ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ .....	122
3.4.1. Спектр соединений углеводной природы цитозоля клеток <i>Y. lipolytica</i> , выращенных в разных условиях.....	122
3.4.2. Липидный спектр клеток <i>Y. lipolytica</i> , выращенных в различных условиях. ....	128
3.4.2.1. Запасные липиды.....	128
3.4.2.2. Мембранные липиды .....	130
3.4.3. Изучение протеома клеток <i>Y. lipolytica</i> , выращенных в различных условиях .....	137
3.5. ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ПРОМОТОРА ГЕНА <i>POR1</i> КЛЕТКАХ <i>Y. LIPOLYTICA</i> , ВЫРАЩЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ, С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ПОДХОДОВ.	162
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	168
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	209

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

2,4,6-ТНТ – 2,4,6-тринитротолуол

АДГ - алкогольдегидрогеназа

АО – альтернативная оксидаза митохондрий

АФК – активные формы кислорода

БТШ – белок теплового шока

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГК – гексокиназа

ГЛР – глутатионредуктаза

ГПД – глутатионпероксидаза

ГФЛ – глицерофосфолипиды

ДАГ – диацилглицериды

ДГК – докозогексановая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДОА – диоксигеназа оксида азота

ЖК – жирные кислоты

КДГ –  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа

ККБ – контроль качества белков

КЛ – кардиолипиды

КОЕ – колониеобразующие единицы

КСЕ – крупные субъединицы каталазы

КС – комбинированный стресс

КФ – код фермента

ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины

ЛФХ – лизофосфатидилхолины

МАГ - моноацилглицериды

МДГ – малатдегидрогеназа

МДФ – маннитол-1-фосфатдегидрогеназа

МСЕ – малые субъединицы каталазы

МФФ – маннитол-1-фосфатфосфатаза

НЛ – нейтральные липиды  
НМД – НАДФ<sup>+</sup>-маннитол-2-дегидрогеназа  
ПКА – протеинкиназа А  
ПКС – сигнальный путь клеточной стенки  
СОД – супероксиддисмутаза  
Ст – стерины  
СФ - сфинголипиды  
ТАГ – триацилглицериды  
ТС – тепловой стресс  
ТСХ – тонкослойная хроматография  
ТШ – тепловой шок  
ФИ – фосфатидилинозитолы  
ФК – фосфатидные кислоты  
ФЛГПД – фосфолипид гидропероксид глутатионпероксидаза  
ФОН – фактор обмена нуклеотидов  
ЦПМ – цитоплазматическая мембрана  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот  
ЦС – цитратсинтаза  
ЩС – щелочной стресс  
ЭПК - эйкозапентаеновая кислота  
GFP – Green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок  
GSH – восстановленная форма глутатиона  
GSSG – окисленная форма глутатиона  
GSSR – глутатион, связанный с белком дисульфидной связью  
GST – глутаредоксин  
HBSS - Hank's balanced salt solution, буферная система солей Хенка  
IF - флавиновый сайт комплекса I  
IIF – флавиновый сайт комплекса II  
IQ – убихинон-редуцирующий сайт комплекса I  
IIIQo – сайт окисления убихинона комплекса III

LCS-1 – 4,5-дихлоро-2-(3-метилфенил)-3(2H)-пиридазинон, специфический ингибитор Cu/Zn-СОД

МАРК - Mitogen-activated protein kinase, активируемая митогеном протеинкиназа

MEC1 – серин/треонин-протеинкиназа *Saccharomyces cerevisiae*

PBS - phosphate-buffered saline, натрий-фосфатный буфер

Q – убихинон

TOR – target of rapamycin, мишень рапамицина; протеинкиназа серин-треониновой специфичности

SDS – sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия

Se-Cys – селеноцистеин

VDAC – voltage dependent anion channel, порин внешней мембраны митохондрий.

X-Gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-b-D-галактопиранозид

Yck1/2 – гомологи казеинкиназы *Saccharomyces cerevisiae*

## ВВЕДЕНИЕ

**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) [1]; в «желтой» – пищевой – биотехнологии применяются ферменты, в больших количествах секретлируемые *Y. lipolytica* во внешнюю среду, главным образом, липазы и протеазы [2; 3]. В «белой» – генноинженерной – биотехнологии перспективы применения *Y. lipolytica* крайне широки: секрета белков по ко-транскрипционному (легко контролируемому) принципу [4] делает данный биообъект привлекательным штаммом-хозяином для экспрессии таких гетерологичных белков, как лакказы [5] и инулиназы [6]. 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 [7]. 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 [8], 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 [9]. Кроме того, высокая липолитическая активность делает дрожжи *Y. lipolytica* перспективным штаммом для биоконверсии низкокачественных жиров, таких как отработанное фритюрное масло, в биодизель [10]. Высокая галотолерантность [11] позволяет использовать *Y. lipolytica* для биоремедиации морских сред, загрязнённых нефтепродуктами.

Наконец, полностью аннотированный геном этого организма [12] делает его крайне удобной моделью для изучения различных физиологических процессов в эукариотической клетке [13].



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 [14], 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 [15].

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 рН 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 [16].

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 [17; 18].

Наконец, большое разнообразие доступных исследователям штаммов *Y. lipolytica*, обнаруженных в разных точках Земли, делает этот микроорганизм удобной моделью для изучения геномного разнообразия [19]. 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 [20]. 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**:

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 (pH 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 (pH 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** 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. Пущино, 2013);
- 10<sup>th</sup> International Congress On Extremophiles (Россия, г. Санкт-Петербург, 2014); международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пущино, 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);
- 4м 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 материалу диссертации опубликовано 6 статей в российских и международных журналах:

*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

*Секова В.Ю., Гесслер Н.Н., Исакова Е.П., Антипов А.Н., Дергачева Д.И., Дерябина Ю.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.

*Куланбаева Ф.Ф., Секова В.Ю., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И., Николаев А.В.* Новый эффективный промотор гена митохондриального потенциалзависимого порина VDAC в геноме дрожжей *Yarrowia lipolytica* //Доклады Академии наук. 2016. Т. 470. № 4. С. 475-478

*Секова В.Ю., Дергачева Д.И., Терешина В.М., Исакова Е.П., Дерябина Ю.И.* Углеводный спектр экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях рН-стресса //Микробиология. 2018. Т. 87. № 2. С. 125-135

*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 V. 9. № 12. P. 30

*Sekova V. Y. 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*

Также были опубликованы два патента:

Пат. RU 2562869 С1 Российская Федерация, МПК Н С12N 15/81. Интегративная генетическая конструкция рQ-SRUS для получения штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica*, обладающих способностью к гомологичной рекомбинации генома митохондрий за счёт экспрессии гена белка RECA бактериального происхождения/ Эпова Е.Ю., Дерябина Ю.И., Исакова Е.П., Секова В.Ю., Трубникова Е.В., Кудыкина Ю.К., Зылькова М.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН). – № 2014144075/10; заявл. 31.10.2014; опубл. 10.09.2015.

Пат. RU 2609646 С Российская Федерация, МПК Н С12N 15/81. Модифицированный вариант гена lacZ из *E. coli*, кодирующий стабилизированный вариант белка, для использования в качестве транскрипционного репортера в *Yarrowia lipolytica*/ Эпова Е.Ю., Баловнева М.В., Дерябина Ю.И., Исакова Е.П., Секова В.Ю., Трубникова Е.В., Кудыкина Ю.К., Зылькова М.В., Гусева М.А., Белоус А.С., Диссанаяке Д.Г., Лашодя В.Д.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Курский государственный университет" (ФГБОУ ВПО "КГУ") – № 2015116622; заявл. 30.04.2015; опубл. 02.02.2017.

**Связь с государственными программами.** Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 19-04-00327 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 215 страницах,

содержит 36 рисунков и 9 таблиц и одно приложение. 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.



## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### 1.1. Механизмы антистрессовой устойчивости у грибов.

#### 1.1.1 Развитие окислительного стресса.

В процессе дыхания в электрон-транспортной цепи митохондрий  $O_2$  постепенно восстанавливается до двух молекул воды. Полное его восстановление происходит последовательно в несколько стадий и требует четырёх электронов, в то время как неполное восстановление  $O_2$  приводит к образованию химически активных соединений, которые являются мощными окислителями, таких как  $O_2^{\bullet-}$  (супероксид-анион),  $H_2O_2$  (перекись водорода) и  $\bullet OH$  (гидроксильный радикал) [21]. Эти соединения, получившие общее название активные формы кислорода (АФК), могут продуцироваться как с участием ферментов, так и без него и инициировать цепные реакции окисления. В силу своей высокой окислительной активности они крайне токсичны для живых клеток и могут детоксифицироваться системой антиоксидантной клеточной защиты, которая позволяет не только предотвращать, но и устранять последствия воздействия АФК.

Термином «окислительный стресс» называют критический дисбаланс между генерацией и инактивацией АФК в клетках [21].

##### 1.1.1.1. Химические свойства АФК.

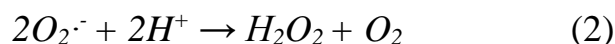
Гидроксильный радикал  $\bullet OH$  генерируется в результате реакции Фентона из  $H_2O_2$  в присутствии переходных металлов (уравнение 1).



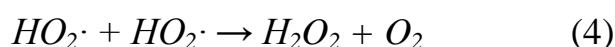
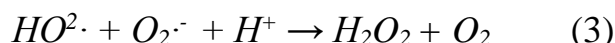
Физиологическая концентрация гидроксильного радикала  $\bullet OH$  *in vivo* стремится к нулю из-за его крайне высокой реакционной активности. Это соединение очень быстро вступает в реакции со всеми известными типами биомолекул: сахарами, аминокислотами, липидами, нуклеиновыми и органическими кислотами [21].

$O_2^{\bullet-}$  в сравнении с  $\bullet OH$  обладает гораздо меньшей реакционной способностью в водных растворах, однако, способен быстро реагировать с другими радикалами,

например, с нитроксидом ( $\cdot\text{NO}$ ) и некоторыми железо-серными кластерами ферментов ( $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ ). Кроме того, этот радикал способен претерпевать самопроизвольную реакцию дисмутации (уравнение 2).



Вероятнее всего, этот процесс происходит в результате протонирования  $\text{O}_2^{\cdot-}$  с последующей реакцией образовавшегося радикала  $\text{HO}_2^{\cdot}$  с другой молекулой  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (уравнения 3 и 4).



Ингибиторный анализ, а также варьирование субстратов окисления позволило выявить в эукариотических клетках ряд сайтов генерации АФК, а также дать оценку максимально возможной для каждого сайта продукции АФК. [22; 23]. В дыхательной цепи митохондрий основными источниками АФК являются сайты на дыхательных комплексах  $\text{I}_F$ ,  $\text{I}_Q$ ,  $\text{II}_F$  и  $\text{III}_{Q_0}$ . Сайт  $\text{I}_F$  долгое время рассматривался как основной поставщик супероксида [24]. Однако, группа Бранда [22; 25] показала, что большая часть продукции АФК, ранее приписываемой сайту  $\text{I}_F$ , в действительности возникает на других дегидрогеназах, в частности на 2-оксоглутаратдегидрогеназе и пируватдегидрогеназе.

Генерация АФК на сайте  $\text{I}_Q$  подтверждается тем фактом, что введение ротенона заметно снижает её, а введение антимицина А стимулирует генерацию АФК на сайте  $\text{III}_{Q_0}$ .  $\text{II}_F$  рассматривается в качестве основного поставщика АФК на  $\text{II}$  комплексе и не уступает в интенсивности генерации АФК комплексу  $\text{IQ}$  [22].

В  $\text{III}$  комплексе электрон-транспортной цепи наиболее высокая генерация АФК характерна для сайта  $\text{III}_{Q_0}$ . Общепринято мнение, что генерация АФК на комплексе  $\text{III}$  обусловлена образованием нестабильных семихинонов  $\text{SQ}$  в  $\text{Q}_0$  в ходе каталитического процесса. Однако механизм образования семихинона  $\text{Q}_0$  все еще остается предметом споров. Механизм цикла убихинона [24], основан на бифуркации двух электронов, высвобождающихся из молекулы  $\text{QH}_2$  при связывании

с сайтом  $III_{Q_0}$ . Первый электрон переносится на железно-серный белок, а второй – на гем с низким потенциалом –  $b_L$ . От гема  $b_L$  электрон переходит внутри цитохрома  $b$  для уменьшения более высокого потенциала гема  $b_H$ , который в свою очередь уменьшает связывание убихинона при следующем связывании убихинона с сайтом  $Q_i$ . Перенос электрона из хинола к цитохрому  $c$  – сложный процесс, включающий в себя: (1) перенос первого электрона из хинола, связанного на каталитическом уровне с сайтом  $Q_0$ , к железосерному кластеру, расположенному в головке белка Рискс – ключевого элемента цитохромного комплекса [26], расположенном на внутренней мембране митохондрий; (2) амплитудное движение головки восстановленного белка Рискс в направлении цитохрома  $c1$ ; (3) восстановление цитохрома  $c1$  и, в конечном счете, (4) восстановление цитохрома  $c$  с помощью цитохрома  $c1$  и возвращение головки белка Рискс на сайт  $Q_0$  [24].

Помимо описанной выше утечки электронов в электрон-транспортной цепи во внутренней мембране митохондрий, на внешней мембране также могут происходить события, приводящие к образованию АФК. Это происходит при участии фермента моноаминоксидазы, которая восстанавливает молекулярный кислород до перекиси водорода [27]. Физиологическая значимость этого явления объясняет внутриклеточную локализацию антиоксидантных ферментов, необходимых для поддержания физиологических концентраций супероксид-аниона ( $O_2^{\cdot-}$ ) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), в матриксе митохондрий и цитозоле [28; 29]. Хорошо изучены факторы, влияющие на изменения скорости образования  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  в митохондриях. Так как утечка электронов в дыхательной цепи митохондрий является основным источником АФК в клетке, генерация АФК связана, главным образом, с метаболическим состоянием митохондрий. Скорость образования  $O_2^{\cdot-}$  контролируется, главным образом, действующей массой молекулярного кислорода (уравнение 5), возрастающей в случае снижения потока электронов (возрастания концентрации доноров электронов  $R^{\cdot}$ ) и в случае увеличения содержания кислорода [30].

$$d[O_2^{\cdot-}]/dt = k[O_2] \times [R^{\cdot}] \quad (5)$$

где:

$[O_2^{\bullet-}]$  – концентрация супероксид-аниона

$[O_2]$  – концентрация молекулярного кислорода

$[R^{\bullet}]$  – концентрация доноров электрона

$k$  – константа скорости реакции.

Таким образом, любое событие, приводящее к увеличению концентрации  $R^{\bullet}$  (блокирование дыхательной цепи ингибиторами, истощение АДФ в результате прекращения движения  $H^+$  посредством АТФ-синтазы и накопление градиента протонов) и замедлению движения электронов, может рассматриваться как приводящее к взрывному росту концентрации  $O_2^{\bullet-}$ . С другой стороны, снижение концентрации  $R^{\bullet}$ , происходящее, например, в результате увеличения потока электронов через альтернативные пути окисления (в частности, АО) должно приводить к снижению скорости генерации  $O_2^{\bullet-}$ .

Известно, что любое стрессовое воздействие на клетку прямо или косвенно обуславливает развитие в ней окислительного стресса. Состояние стресса характеризуется сниженной скоростью клеточного дыхания [31], что может вызывать у аэробных клеток состояние гипоксии. Условия гипоксии, в свою очередь, могут приводить к усилению генерации АФК в митохондриях. Гипоксия и реоксигенация приводят к обратимой дезорганизации АТФ-азы и архитектуры внутренней мембраны митохондрий. Начальная стадия гипоксической перфузии (<15 мин) характеризуется резким возрастанием содержания АДФ и активности АТФ-азы и критическим снижением соотношения АТФ/АДФ в митохондриях. Следующая фаза гипоксической перфузии (от 30 мин и более), характеризуется флуктуациями активности АТФ-азы, при которых становятся более очевидными повреждения ультраструктуры митохондрий. В этой ситуации сохранить структурную целостность митохондрий клетке может помочь резерв фосфатов, который накапливается в клетках в виде волютина – гранул, содержащих длинные

цепочки неорганического фосфата. Соотношение АТФ/АДФ при этом снижается до 1 [32].

### 1.1.1.2. Повреждающий эффект АФК.

АФК способны вызывать повреждения митохондриальной ДНК. Наиболее часто отмечают модификацию гуанина с образованием 7,8-дигидро-8-оксогуанина. Это результат окисления гуанина по C<sub>8</sub> и N<sub>7</sub> атомам. В то время как немодифицированный гуанин образует водородные связи преимущественно с цитозином, 8-оксогуанин может связываться как с цитозином, так и с аденином по принципу Хугстона [33]. В последнем случае остатки оксогуанина в ДНК, ошибочно связанные с аденином, часто становятся причиной замены G×C → T×A как *in vitro*, так и *in vivo*. Этот тип замен является вторым по распространённости, обнаруживаемым в клетках злокачественных образований человека, и особенно преобладает в спектре мутаций гена-супрессора опухолей TP53. Таким образом, 8-оксогуанин является наиболее значимым внутриклеточным мутагеном, который вносит значительный вклад в спонтанную трансформацию клеток в целом [34].

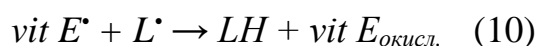
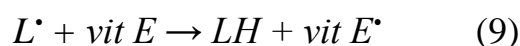
АФК могут провоцировать значительные изменения как в молекулах белка, так и в активных центрах ферментов, содержащих металлы или нуклеотиды в качестве коферментов. Изменение активности ферментов при действии АФК показаны на примере малатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. [35]. Наиболее распространенные необратимые модификации белков связаны с образованием карбонильных групп при окислении лизиновых, гистидиновых, тирозиновых, аргининовых остатков [36]. К другой значимой модификации белков под действием АФК приводит окисление цистеиновых остатков с образованием дисульфидных связей. Окислению подвергаются и другие аминокислотные остатки в белках, например, метионин. Изменения, связанные с окислением цистеиновых и метиониновых остатков, обратимы, т.е. они могут быть восстановлены с участием глутатион-зависимых или тиоредоксиновых ферментов [37].

Крайне губительно для клеток перекисное окисление липидов, инициируемое повышенным содержанием в клетке АФК. Наиболее вероятным инициатором

перекисного окисления липидов выступает гидроксильный радикал [38]. Благодаря малым размерам он легко проникает в толщу мембран и в присутствии кислорода взаимодействует с ненасыщенными жирными кислотами с образованием липидного и липид-пероксильного радикалов. Эти продукты окисления, в свою очередь, запускают цепную реакцию, развитие которой происходит по следующему сценарию (уравнения 6 и 7):



Обрыв цепи в данном случае возможен лишь при взаимодействии радикалов между собой, либо при своевременном введении антиоксидантов (уравнения 8-10):



Продукты перекисного окисления липидов оказывают повреждающее воздействие на клетку по двум основным механизмам. Во-первых, окисленные липиды нарушают структурную организацию мембран, так как повреждённые молекулы липидов имеют механические и химические свойства, отличные от свойств исходных молекул. Во-вторых, пероксиды липидов имеют высокую реакционную способность и способны сами запускать цепные реакции образования АФК, что приводит к повреждению белков и ДНК [39].

Перекисное окисление мембранных липидов существенно влияет на физические свойства липидных бислоев. В частности, изменяются липид-липидные взаимодействия и текучесть что, в свою очередь влияет на проницаемость мембран, трансмембранные градиенты ионов [40]. Изначально с помощью моделирования молекулярной динамики было показано, что подверженные перекисному окислению фосфолипиды могут переориентироваться таким образом, что окисленная цепь перемещается в липидном бислое к границе раздела фаз (в направлении полярных головок молекул), уменьшая толщину мембраны [41]. Позднее было показано, что

вся окисленная цепь может переместиться в полярную [42]. В мембранах липосом увеличение концентрации окисленных липидов вызывает снижение текучести мембран и замедление латеральной диффузии [43]. Окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) 5-липоксигеназой требует гидролиза цепи ЖК из исходного фосфолипида, оставляя после себя лизофосфолипиды. Исследования липидных монослоёв *in vitro* показали, что образующиеся лизофосфолипиды легко солюбилизируются в цитозоле [44]. Считается, что как растворение лизофосфолипидов, так и конформационное изменение окисленных фосфолипидов способствуют повышению проницаемости мембран [44; 45].

Пероксиды липидов проявляют дополнительную токсичность из-за продуктов распада, которые они спонтанно образуют. Атомы железа могут реагировать с пероксидами липидов, что приводит к образованию алкоксирадикала, который сам по себе способен инициировать реакции перекисного окисления [46]. Крайне токсичны для клеток продукты распада альдегидов перекисей липидов, такие как 4-гидроксиноненал и малоновый диальдегид. Оба они являются высокореактивными молекулами. Показано, что малоновый диальдегид образует ковалентные аддукты на N-концах пептидов и нуклеофильных аминогрупп на боковых цепях аминокислот, таких как лизин, гистидин, аргинин, глутамин и аспарагин, что приводит к образованию флуоресцентного дигидропиридина, аддуктов основания Шиффа и нарушениям вторичной структуры белков. [47]. 4-гидроксиноненал также содержит альдегидную функциональную группу и может образовывать аддукты оснований Шиффа с первичными аминами и продуктами циклизации, подобными малоновому диальдегиду [48].

### **1.1.2. Механизмы защиты клеток от окислительного стресса.**

Неблагоприятные внешние обстоятельства приводят к развитию у грибов разнообразных механизмов защиты против стрессовых воздействий, направленных как на противостояние конкретному виду стресса, так и против окислительного стресса как неизбежного следствия воздействия любого стрессора. Второе явление получило название метаболической адаптации – необходимого элемента ответа

дрожжей на действие стрессоров [49]. Показано, что одной из первых реакций на стресс является прекращение роста, изменение углеводного обмена и синтез вторичных соединений, направленный как на снижение уровня глюкозы в цитоплазме, так и на образование соединений с выраженными антиоксидантными свойствами. Повреждающее действие глюкозы в присутствии АФК связано с ее окислением до дикарбонильных продуктов и их связыванием с белками [50]. Окисление SH-групп под действием АФК приводит к снижению активности ферментов гликолиза и синтеза белка [51].

К другим универсальным средствам защиты клеток против окислительного стресса можно отнести такие системы, как ферменты первой линии антиоксидантной защиты, глутатион и ферменты глутатионовой системы, АО, неферментные антиоксидантные компоненты клеток.

#### **1.1.2.1. Ферменты первой линии антиоксидантной защиты.**

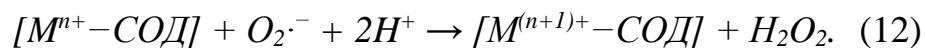
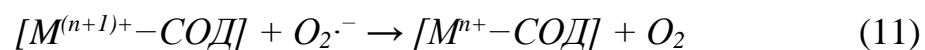
Ферменты первой линии защиты, снижающие уровень  $O_2^{\bullet-}$  продукта его дисмутации  $H_2O_2$ , представлены в основном супероксиддисмутазами (СОД) (КФ 1.11.1.6) и каталазами (КФ 1.15.1.1). Основная функция этих ферментов состоит в своевременном обезвреживании АФК, постоянно образующихся в результате утечки электронов в дыхательной цепи митохондрий. Внутриклеточная локализация различных форм обоих ферментов может быть разной: как СОД, так и каталазы встречаются в митохондриях, цитоплазме и пероксисомах. Таким образом, СОД и каталазы можно отнести к конститутивным ферментам, индукция которых, значительно изменяется в зависимости от условий окружающей среды [52].

Ферменты антиоксидантной защиты высоко специфичны к АФК, благодаря атомам металлов (меди, цинка, марганца, железа, селена) в активном центре [53].

##### **1.1.2.1.1. СОД**

СОД – ферменты, катализирующие восстановление супероксидного радикала до  $H_2O_2$  (уравнения 11-12):





Как видно из уравнений (11-12), для функционирования этого фермента в его активном центре необходимо наличие атома металла, способного изменять свою степень окисления. Часто для стабилизации конформации данного фермента необходим кофактор в виде атома другого металла, как в случае Cu/Zn СОД, где медь выступает в качестве акцептора электронов, а цинк стабилизирует конформацию фермента [54].

СОД считается первым эшелонем защиты против окислительного стресса у эукариотических клеток. Этот фермент характеризуется высокой термостабильностью (до 100°C в течение 1 мин), а также сохраняет активность в широком диапазоне рН [54].

Для эукариот наиболее типичны Cu/Zn-СОД, кодируемая геном *Sod1*, – в цитозоле, и Mn-зависимая СОД, кодируемая геном *Sod2*, – в матриксе митохондрий. [55]. Митохондриальная Mn-СОД играет уникальную роль в защите ДНК и белков митохондрий и регулируется различными факторами, чтобы дополнить Cu/Zn-СОД цитозоля или экскретируемой формы (см. далее). Однако часть Mn-СОД находятся вне митохондрий. Некоторые патогенные грибы, такие как *Candida albicans*, имеют димерную цитоплазматическую форму Mn-СОД, а также тетрамерную митохондриальную форму этого фермента [56]. Третья форма СОД существует во внеклеточных жидкостях млекопитающих и известна как внеклеточная (экскретируемая) Cu/Zn-СОД, кодируемая геном *Sod3*. Кроме этих трех форм известна еще Fe-СОД, которая встречается у прокариот [57]. Этот тип фермента практически не встречается в грибах и животных, но обнаруживается в хлоропластах растений и в некоторых паразитических протистах, таких как трипаносомы. В них фермент защищает от окислительного стресса, который инициирует организм хозяина в ответ на заражение [56]. Mn-СОД и Fe-СОД имеют большое сходство как в отношении структуры, так и в отношении свойств. Mn-СОД считается эволюционно более поздним вариантом СОД, так как в окислительных

условиях аэробного мира железо в активном центре фермента могло проявлять токсические свойства [57].

Наконец, известна Ni-СОД, обладающая уникальной гомогексамерной структурой. Этот тип фермента известен у цианобактерий и некоторых представителей порядка актиномицетов [56].

Характерная особенность Mn-СОД – высокая устойчивость к  $H_2O_2$  (продукту реакции), что обеспечивает устойчивую работу комплекса ферментов первой линии защиты в митохондриях в условиях окислительного стресса. Высокая индуцибельность фермента подтверждается тем, что под действием ионизирующей радиации скорость транскрипции мРНК фермента и его стабильность повышаются в 2 и 3 раза, соответственно [58]. У дрожжей *S. cerevisiae* в условиях окислительного стресса и при переходе в стационарную стадию роста происходит дополнительная экспрессия как Cu/Zn-СОД, так и Mn-СОД [59]. Повышение экспрессии генов обеих форм клетках *S. cerevisiae* связывают с увеличением продолжительности жизни клетки и устойчивости к окислительному стрессу [60].

Так как часть Cu/Zn-СОД локализуется в межмембранном пространстве митохондрий, этот фермент не в состоянии дисмутировать супероксиды в митохондриальном матриксе. Исключение составляют лишь некоторые клетки злокачественных опухолей млекопитающих. Ингибирование Cu/Zn-СОД LCS-1 в отсутствие Mn-СОД приводит к быстрому набуханию и фрагментации митохондриального матрикса [61].

Существует предположение, что Cu/Zn-СОД в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий защищает белки матрикса, т.к. увеличение содержания супероксида в цитозоле может приводить к реакциям с эндогенным оксидом азота (NO), с последующим формированием активных форм азота, которые и инактивируют железосерные кластеры белков матрикса. Доля Cu/Zn-СОД в митохондриях невелика (~1% от клеточного содержания), и её функциональное значение в межмембранном пространстве до конца не ясно [56].

Независимо от своей канонической функции антиоксидантного фермента,

Cu/Zn-СОД играет значительную роль в редокс-сигналинге для поддержания стабильности генома путем изменения внутриклеточной локализации. Sod1, локализуемая в ядре, фосфорилируется каскадом киназ Mec1-Dun1 в ответ на увеличение  $H_2O_2$  [62]. Анализ профиля экспрессии генов *S. cerevisiae* при помощи ДНК-микрочипов у *Sod1*-мутанта по сравнению с диким типом показал, что экспрессия 123 генов, участвующих в ответе на окислительный стресс и репарации ДНК, значительно ослабляется на транскрипционном уровне при экзогенном введении  $H_2O_2$  [63].

Дрожжевой мутант, лишенный митохондриального порина VDAC, показал ухудшение роста на несбраживаемом (окислительном) субстрате. Сверхэкспрессия человеческой, но не дрожжевой Cu/Zn-СОД, полностью восстанавливала дефект роста этого мутанта на неферментативном источнике углерода путем стимуляции транскрипции генов белков внешней мембраны митохондрий с  $\beta$ -спиральными мотивами, что указывает на роль ядерной дрожжевой Cu/Zn-СОД как фактора транскрипции [65]. Эти результаты показывают, что основная функция Cu/Zn-СОД в ядре не ограничивается удалением вредных супероксидных радикалов.

Ещё одной неожиданной функцией функция Cu/Zn-СОД оказалась роль ключевого модулятора сигнализации в метаболизме глюкозы. В дрожжах Cu/Zn-СОД способствует передаче сигнала от глюкозы и кислорода для подавления дыхания, физически взаимодействуя и стабилизируя две казеинкиназы 1-гамма Yck1 и Yck2, необходимые для распознавания нутриента, при этом такая функция все еще требует антиоксидантной активности СОД [65].

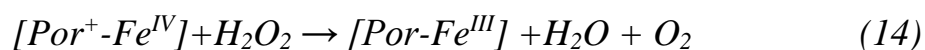
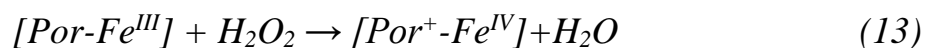
В геноме дрожжей *Y. lipolytica* обнаружено 6 генов СОД: две формы с Mn в активном центре (*YALI0C16621* и *YALI0B08921*), локализованные в митохондриях, и одна Cu/Zn-СОД (*YALI0E12133*), локализованная в цитоплазме. Помимо этого, в геноме идентифицированы еще три гена, обнаруживающие слабое сходство с СОД других организмов: *YALI0E02266* – с Cu/Zn-СОД *Neurospora crassa*, *YALI0B16742* и *YALI0B20086* – с Fe/Mn-СОД *S. cerevisiae*. Предполагается, что у *Y. lipolytica* индукция СОД относится к универсальным факторам ответа на любой вид стресса:

возрастание активности этого фермента в клетках в 1,5 – 5 раз наблюдалось при обработке клеток нелетальными дозами различных стрессоров, такими как повышение температуры, введение оксидантов (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и параквата) или этанола [66]. Также было показано, что высокая толерантность *Y. lipolytica* к ионам меди обеспечивается активностью Cu/Zn-СОД, но не Mn-СОД [67].

У патогенных диморфных дрожжей *Candida albicans* одна из форм СОД необходима для проявления вирулентности (перехода клеток к гифальному росту) [68], а при переходе к стационарной стадии роста у этих дрожжей обнаруживалась нестандартная Mn-СОД в цитоплазме [69]. Таким образом, обе изоформы фермента - Cu/Zn-СОД и Mn-СОД - необходимы для регуляции жизненного цикла у мицелиальных грибов и дрожжей.

#### 1.1.2.1.2. Каталаза

Каталазы представляют собой группу металлоферментов, катализирующих разложение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с образованием воды и молекулярного кислорода (уравнения 13-14).



*Каталаза*

С точки зрения структуры каталазы представляют собой гомотетрамеры, состоящие из двух димеров. Димеры, в свою очередь, представляют собой «переплетения» двух мономеров: N-терминальный конец одного из них погружен в наружный домен Q-связанной субъединицы и наоборот. Гемовая группа при этом погружена глубоко в структуру, и молекула H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вынуждена продвигаться по достаточно длинному каналу, чтобы достигнуть активного центра [70]. Как тетрамеры, так и димеры каталазы проявляют каталитическую активность, в то время как мономеры не активны [71]. Разложение перекиси водорода происходит в два этапа: на первом молекула H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> восстанавливается двумя электронами гема до одной молекулы воды и оксоферрил-порфиринового аниона (уравнение 13). Затем,

на второй стадии вторая молекула  $H_2O_2$  окисляется, отдавая два электрона на оксоферрил-порфириновый анион с образованием одной молекулы кислорода и одной молекулы воды. Активный центр фермента при этом возвращается в первоначальное состояние (уравнение 14) [70]. Каталаза не является высоко консервативным ферментом: размер субъединиц у разных микроорганизмов может значительно различаться – от 55 кДа у *Candida tropicalis* до 80–85 кДа у *N. crassa* и *Aspergillus niger* [72]. Можно выделить три типа монофункциональных гемовых каталаз. Крупные субъединицы каталаз (КСЕ) аналогичны малым субъединицам каталаз (МСЕ), но имеют дополнительный С-концевой домен (150-210 аминокислотных остатков). Эти два типа каталаз имеют очень разную кинетику: МСЕ ингибируются субстратом, а КСЕ активируются  $H_2O_2$  [73] МСЕ не подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен, т.к. они обратимо ингибируются субстратом с образованием менее активного комплекса. КСЕ, напротив, не ингибируются субстратом, однако, они также не подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен, так как активность фермента возрастает с увеличением концентрации субстрата [74].

У многих организмов встречается наличие нескольких форм каталазы; индукция каждой из них может быть связана с переходом клеточной популяции на разные стадии клеточного цикла [75]. Так, мицелиальные аскомицеты, как правило, имеют несколько вариантов каталаз: обычно два варианта КСЕ и от одного до четырех МСЕ. Дрожжи обычно имеют только два МСЕ - одну цитозольную и одну пероксисомальную; некоторые виды *Candida* имеют только одну МСЕ [73].

В геноме *S. cerevisiae* выявлены гены двух каталаз: каталазы А (*CTA1*), локализованной в пероксисомах, и цитоплазматической формы каталазы Т (*CTT1*). В геноме *Y. lipolytica* насчитывается три гена каталаз: *YALI0E34265* и *YALI0E34749* (две 60 кДа формы, локализованных в митохондриях и пероксисомах) имеют высокое сходство с *CTT1 S. cerevisiae*, а также *YALIOF30987* – 55 кДа форма, сходная с каталазой *Emericella nidulans* [12]. Для *Y. lipolytica* каталаза рассматривается как универсальный компонент ответа клетки на стрессовые воздействия любой природы. Обработка

клеток *Y. lipolytica*, находящихся в стационарной стадии роста, нелетальными дозами различных стрессоров (тепловой шок (ТШ), обработка экзогенными оксидантами – перекисью водорода и менадионем – приводила к возрастанию активности этого фермента в 3-5 раз [76; 66].

### 1.1.2.1.3 Глутатион и ферменты глутатионовой системы

#### 1.1.2.1.3.1. Глутатион

Глутатион – пептид, состоящий из остатков глутамата, цистеина и глицина. Важнейшей особенностью этого соединения является водородная связь между аминогруппой Cys и карбоксильной группой боковой цепи глутамата (рис. 1).

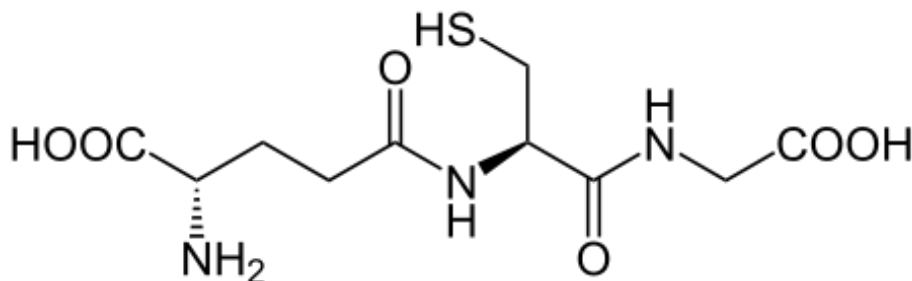


Рисунок 1. Структура восстановленного глутатиона.

Этот пептид при помощи фермента глутатионпероксидазы способен отдавать свои электроны для восстановления других молекул (в т.ч. перекиси водорода), переходя из восстановленной формы (GSH) в окисленную форму (GSSG) с образованием димера, содержащего «сульфидный мостик». В клетках также обнаружен смешанный дисульфид глутатиона (GSSR), связанный при помощи сульфидного мостика с белками [77]. На модели *S. cerevisiae* было показано, что нарушение биосинтеза GSH приводит к снижению устойчивости к окислительному стрессу [78]. Не способные к синтезу GSH мутанты *S. cerevisiae* при внесении в среду культивирования  $H_2O_2$  испытывали необратимое окисление цистеина; особенно подвержены такой модификации оказались гликолитические ферменты и ферменты синтеза белка [79].

Помимо непосредственной антиоксидантной защиты остатков цистеина поддержания редокс-статуса клеток, GSH является кофактором для ряда антиоксидантных ферментов: он участвует в элиминации пероксидов посредством

глутатионпероксидаз (ГПД), ковалентно связывается с цистеиновыми остатками некоторых белков при помощи глутаредоксинов, и участвует в обезвреживании электрофилов, катализируемых глутаредоксином GST с образованием GS-R [80; 81]. Еще одна цитопротекторная роль глутатиона – способность к детоксикации и транспорту ионов меди внутри клеток. Цистеиновая группа GSH позволяет транспортировать этот металл апопротеинам Cu-содержащих ферментов, таких как Cu/Zn-СОД [82]. Связывание внутриклеточной меди препятствует потенциально опасным реакциям между металлами и кислородом (реакции Фентона), приводящим к образованию цитотоксичных продуктов. Потенциально опасен для клетки и избыток цистеина; и глутатион, в свою очередь, позволяет обеспечить клетку нетоксичной формой цистеина [83].

Несмотря на то, что глутатион является одним из наиболее изученных антиоксидантов, его роль в ответе клеток дрожжей на стресс неоднозначна. Так штаммы *Schizosaccharomyces pombe*  $\Delta gcs1$  и  $\Delta gsa1$ , не способные к синтезу глутатиона оказались менее чувствительны к пероксиду или супероксиду, чем дикий тип. Этот результат подтверждает недавно появившуюся точку зрения о том, что глутатион на самом деле не представляет собой первую линию клеточной защиты от окислительного стресса [84].

В то же время, необходимость глутатиона для противостояния кислого стресса промышленными дрожжами *Candida utilis* была продемонстрирована в работе [85]. Мутанты  $\Delta gsh1$  и  $\Delta gsh2$  показали большую устойчивость как к острому (рН 1.5, 2 ч), так и к хроническому (рН 3.5, 6 ч) кислому стрессу. Большое количество публикаций указывает на необходимость глутатиона для адаптации дрожжей к токсическому воздействию тяжелых металлов. Так, например, было продемонстрировано, что глутатион защищает клетки устойчивых штаммов *Candida tropicalis* и *S. cerevisiae* от токсичного воздействия мышьяка [86], а также *S. cerevisiae* от воздействия ионов меди [87].

Механизм цитопротекторного действия глутатиона сводится к обратимому ковалентному связыванию (s-глутатионилированию) с SH-группами белков, что

затрудняет образование дисульфидных связей внутри белка и предохраняет белки от конформационных изменений в условиях окислительного стресса. Особенно это важно для защиты белков дыхательной цепи митохондрий, что подтверждается изменением распределения глутатиона между цитозолем и митохондриями в стрессовых условиях [81; 88].

#### 1.1.2.1.3.2. Глутатионпероксидазы

ГПД – (К Ф 1.11.1.9) – ферменты, восстанавливающие  $H_2O_2$  до воды, используя в качестве донора электронов восстановленную форму глутатиона (уравнение 15):



Первоначальные исследования на человеческих ГПД показали, что эти ферменты содержат высокореактивный остаток Se-Cys активном центре. После окисления эти Se-Cys-содержащие ГПД регенерируются до восстановленной формы с участием GSH.

Напротив, дрожжи, наземные растения и некоторые животные лишены селенопротеинов. Однако эти организмы содержат селено-независимые ГПД, также называемые NS-Gpx, где остаток Se-Cys активного сайта заменяется цистеином. ГПД млекопитающих могут иметь как гомотетрамерную, так и мономерную структуру, в то время как ГПД дрожжей представлены только мономерами [89]. В присутствии глутатиона эти ферменты проявляют слабую пероксидазную активность: донорами электронов для них являются тиоредоксины [90].

Большинство NS-ГПД, в том числе из высших растений, дрожжей и цианобактерий, относятся к группе фосфолипид гидропероксид ГПД (ФЛГПД). Было показано, что ФЛГПД способны восстанавливать гидроперекиси фосфолипидов непосредственно. В случае NS-ГПД сульфеновая кислота образует дисульфид со вторым цистеином фермента, и этот дисульфид может быть восстановлен на второй стадии реакции при помощи GSH. Многие исследования



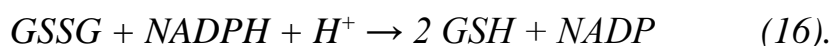
показали, что большинство NS-ГПД используют тиоредоксин, а не глутатион в качестве донора электронов [91].

Так как остатки цистеина в транскрипционных факторах, как правило, недостаточно реактивны для непосредственного взаимодействия с  $H_2O_2$ , механизм «распознавания» АФК нуждается в посреднике, таком как тиоловые пероксидазы или ГПД. Активация Yap1 может быть «выключена» при помощи тиоредоксина. Таким образом, важнейшая физиологическая роль ГПД состоит не столько в удалении  $H_2O_2$ , сколько в улавливании сигнала  $H_2O_2$ , что позволяет впоследствии развернуть систему ферментативной защиты против повреждений, вызываемых АФК. [92; 93]. Мутанты *S. cerevisiae* по *Gpx3* проявляют повышенную чувствительность к пероксидам, тогда как фенотип мутантов по *Gpx1* и *Gpx2* не отличаются по от дикого типа.

В геноме *Y. lipolytica* на данный момент обнаружен всего один ген, имеющий высокое сходство с ГПД *S. cerevisiae* YIR037 – это белок YALI0E02310 [12].

#### 1.1.2.1.3.3. Глутатионредуктаза

Глутатионредуктаза (ГЛР, КФ 1.8.1.7) – фермент, восстанавливающий GSSG при помощи НАДФН и поддерживающий таким образом соотношение GSH/GSSG в клетке (уравнение 16):



ГЛР состоит из высококонсервативных доменов с двумя укладками Россмана в составе. Часть из них необходима для связывания ФАД и НАДФН, другие взаимодействуют с доменом димеризации [94]. Домен димеризации включает два региона: вблизи С-конца – в районе 372-482 а.о. и вблизи N-конца, в районе 71-104 а.о. ГЛР содержит два высококонсервативных остатка цистеина – (С61, С65) в активном центре, которые способны образовать дисульфидную связь. У *S. cerevisiae*, неконсервативный остаток цистеина С239 подвергается воздействию растворителя и может при необходимости связываться с избытком GSH. ГЛР накапливается в областях клетки с высоким потоком электронов, где обычно и происходит активная

генерация АФК. У прокариот это может быть, например, периплазматическое пространство и внутренняя мембрана, контактирующая с цитоплазмой. АФК также могут секретироваться во внеклеточную среду. У эукариот ГЛР обнаруживается как в цитоплазме, так и внутри органелл – в ядре и митохондриях. Оксидоредуктазная активность ГЛР также присутствует в просвете ЭПР и лизосомах, где тиоловые редуктазы восстанавливают окисленную форму глутатиона. Хотя митохондрии и содержат свой собственный геном, синтеза GSH *de novo* в них не происходит, а экспорт GSSG ничтожен или отсутствует вовсе [95]. Таким образом, ГЛР необходимы внутри органелл, и следовательно, возникает потребность в их переносе через внутриклеточные мембраны из цитозоля. Существует ряд экспериментальных доказательств того, что у некоторых организмов в т.ч., у дрожжей и человека, цитозольные и митохондриальные ГЛР кодируются одним геном. ГЛР этих организмов, действующие в различных компартментах клетки, синтезируются с альтернативных стартовых кодонов рамки считывания: если синтез начинается с первого кодона AUG, синтезируется длинная форма, приспособленная к транспорту в митохондрии. Если же трансляция начинается со второго кодона AUG, синтезированный белок остаётся в цитоплазме [96].

У дрожжей *S. cerevisiae* был идентифицирован ген, кодирующий ГЛР – *GLR1*. Делеция этого гена приводила к снижению уровня GSSG, также, как и GSH, при этом мутанты обладали более высокой чувствительностью к оксидантам [97]. У *S. cerevisiae* вариант регуляции синтеза разных изоформ белка с одного гена является редкостью. Исследование цитозольной и митохондриальной форм ГЛР методом масс-спектрометрии позволило провести более детальный анализ. В то время как цитозольная форма имеет ацетилсерин на N-терминальном конце, было показано, что митохондриальная форма имеет три альтернативных варианта N-терминального конца. [96].

В геноме *Y. lipolytica* идентифицирован один ген, обнаруживающий сходство с *Glr1 S. cerevisiae* – ген *YALI0E18029* [12]. Предполагается, что индукция ГЛР является одним из неспецифичных ответов клетки на любое стрессовое воздействие.

Обработка клеток *Y. lipolytica*, находящихся в стационарной стадии роста нелетальными дозами различных стрессоров (ТШ, обработка окислителями – перекисью водорода и менадионом) приводила к возрастанию активности этого фермента примерно в 2 раза [66].

### 1.1.3. Альтернативная оксидаза митохондрий

Альтернативная оксидаза митохондрий (АО) – это фермент, непосредственно восстанавливающий молекулярный кислород до  $H_2O$  с окислением пула убихинонов [98]. Этот альтернативный путь переноса электронов менее выгоден, чем основной, так как при таком механизме по крайней мере два из трёх пунктов сопряжения отсутствуют, и потенциально генерация градиента протонов, конвертируемая впоследствии в синтез АТФ, возможна только на комплексе I при окислении НАДН, что значительно снижает конечный выход АТФ. Образующийся при этом избыток энергии, который не может быть потрачен на синтез АТФ, рассеивается в виде тепла [99].

Изучение структуры АО было проведено для ряда организмов, включая *Y. lipolytica*. В активном центре АО этого организма два атома железа координируются шестью аминокислотными остатками: четырьмя остатками глутамата (Glu151, Glu190, Glu241 и Glu297) и двумя остатками гистидина (His193 и His300). Эта структура высококонсервативна, в то же время остальные аминокислотные остатки, этого домена, достаточно вариабельны и, вероятно, необходимы для поддержания расположения аминокислотных остатков в активном центре [100]. Сайт связывания убихинона АО *Y. Lipolytica* образован аминокислотными остатками Arg146, Phe147, Leu150, Ile153, Leu240, Thr247, кроме того, была описана структура «гидрофобного кармана», вмещающего молекулу убихинона [100]. У аэробного грибного патогена сельскохозяйственных культур *Sclerotinia sclerotiorum* АО проявляет активность на всех стадиях роста [101]. В то же время, у некоторых других видов дрожжей, например *Dipodascus. Magnusii*, в нормальных условиях, когда активны основные ферменты дыхательной цепи, активность АО низка, либо не обнаруживается вовсе [100].

У *Y. lipolytica* известно два гена альтернативной оксидазы - *YALIOD09933* и *YALIOE00814*, - расположенных в ядерных хромосомах D и E соответственно [12]. Участие АО в подавлении окислительного стресса может снижать порог чувствительности клеток к различным стрессорам [102]. Для *Y. lipolytica* индукция АО митохондрий рассматривается как один из неспецифических ответов клетки на любое стрессовое воздействие. При обработке клеток *Y. lipolytica* экспоненциальной стадии роста нелетальными дозами различных стрессоров (перекись водорода, этанол, ТШ), наблюдалась повышенная активность АО. Вклад этого фермента в потребление кислорода составлял 30-35% от общего митохондриального дыхания [66].

Активность АО у дрожжей достоверно увеличивается при ингибировании терминальной части основной дыхательной цепи, которое может произойти, например, в результате инкубации клеток с антимицином А, цианидом или азидом, специфического ингибирования транскрипции и трансляции митохондрий; возникновение соответствующих мутаций, снижения концентрации кислорода в среде или роста клеток на средах с дефицитом ионов железа, серы или меди [100].

Цианид- и антимицин А-резистентное потребление кислорода в митохондриях грибов связывают с изменением из физиологического состояния: активность или количество транскрипта АО увеличивается под воздействием мягкого ТШ [102], а также в условиях окислительного [66] и осмотического [103] стрессов. Активность АО значительно возрастает у патогенных грибов под воздействием фунгицидов [104].

Таким образом, можно сделать вывод о фундаментальной функции АО в уменьшении последствий и предотвращении окислительного стресса. Предполагается, что одной из первых мишеней АФК в ходе развития окислительного стресса в клетке становятся сами ферменты электрон-транспортной цепи митохондрий, нарушение работы которых ведёт, с одной стороны, к необходимости направить транспорт электронов по альтернативному пути для поддержания энергетического статуса клеток, а с другой – минимизировать

возможность генерации АФК, что и приводит к индукции АО [105]. Кофермент Q является донором восстановительных эквивалентов для АО. Снижение степени его восстановленности связывают со снижением генерации супероксид-аниона [100].

#### **1.1.4. Другие белковые компоненты защиты клеток от окислительного стресса.**

##### **1.1.4.1. Тиоловые пероксидазы**

Тиоловые пероксидазы – ферменты, разлагающие перекись водорода и органические гидроперекиси, также эти ферменты катализируют восстановление окисленных цистеиновых остатков в белках [106]. К тиолпероксидазам относят белки двух семейств: ферменты типа ГПД и пероксиредоксины. Хотя эти два типа ферментов различаются как по механизму действия, так и эволюционно, они имеют общие субстраты (субстратную специфичность). Они разлагают  $H_2O_2$ , другие гидропероксиды и пероксинитриты посредством низкомолекулярных тиолов, таких как глутатион, или белки с реактивными поверхностно-открытыми остатками цистеина, - тиоредоксины, глутаредоксины, трипаредоксины и др., содержащие мотив CxxC. Оба типа ферментов работают через "механизм замещения", в котором сами ферменты окисляются гидропероксидом (ROOH) и повторно восстанавливаются тиолами, этот процесс происходит в две независимых стадии [107]. Значительное число тиолпероксидаз, особенно у высших животных, катализируют гидропероксидное восстановление с помощью остатка Se-Cys, который в составе высококонсервативной каталитической тетрады с остатками Asn, Gln и Trp, предположительно, окисляется ROOH до селеновой кислоты [107].

Однако, в большинстве тиолпероксидаз каталитический Se-Cys заменяется на обычный Cys [108]. В этих ферментах, обнаруженных у растений, грибов, бактерий, протистов и насекомых, часто второй цистеин, расположенный в подвижной петлеобразной структуре, участвует в катализе в качестве «внутримолекулярного кофактора» путем образования внутримолекулярного дисульфида с другим остатком цистеина. Это изменение механизма реакции «2-Cys-ГПД» обычно связано с переходом от специфичности к глутатиону к специфичности к редоксинам [109].

В семействе пероксидаз активный сайт Se-Cys наблюдается только в исключительных случаях, в подавляющем большинстве в составе каталитической триады вместе с Asn, Gln и Trp находится обычный Cys, который, как и у ГПД, окисляется гидропероксидом до сульфеновой кислоты [109]. Затем он образует промежуточный комплекс (типичный 2-Cys-Prx) или внутримолекулярный дисульфидный мостик (атипичный 2-Cys-Prx) со вторым остатком Cys. Дисульфидная связь в окисленных 2-Cys-Prxs восстанавливается редоксинами [109]. В 1-цис-пероксиредоксинах сульфеновая кислота должна вступать в непосредственную реакцию с восстановительным субстратом, например, с аскорбатом или с глутатионом, что обеспечивается глутатион-S-трансферазой  $\pi$  у человека [107] или глутаредоксином у ряда бактерий [110].

#### 1.1.4.2. Тиоредоксины.

Тиоредоксины – термостабильные белки небольшого размера (около 12 кДа), содержащие в своём активном центре последовательность Cys-Gly-Pro-Cys. Их антиоксидантное действие заключается в восстановлении конформации повреждённых белков [111]. Изначально для тиоредоксинов была установлена функция донора водорода для рибонуклеотидредуктазы; позже была показана их роль в работе ферментов, образующих в своём каталитическом цикле дисульфиды. К таким ферментам, например, относится *Yap1* – фактор транскрипции у дрожжей *S. cerevisiae* [112]. Тиоредоксины также необходимы для предотвращения агрегации рибосом [113]. Восстановление окисленных осуществляет цитозольная тиоредоксинредуктазы 1, и митохондриальные тиоредоксинредуктазы 2. Донором электронов в этом процессе является непосредственно НАДФН.

Гены *TRX1* и *TRX2* кодируют цитозольные тиоредоксины у *S. Cerevisiae*; ген *TRX3* кодирует тиоредоксин митохондрий [112]. Делеции каждого из трёх генов оказались нелетальны для *S. cerevisiae*, однако, но они приводили к увеличению содержания GSH в 2 раза и GSSG – в 7 раз, а также гиперчувствительности к  $H_2O_2$ . При делеции двух генов наблюдалось удлинение S-фазы клеточного цикла и сокращению фазы  $G_1$ , GSH при этом повышался в 3,5 раза, а GSSG – в 70 раз [112].

Окислительно-восстановительный потенциал митохондриального тиоредоксина не связан с цитозольной системой тиоредоксинов, в условиях окислительного стресса, а также у мутантов по тиоредоксинредуктазе митохондрий он может оставаться достаточно высоким. Это можно связать с тем, что участие в восстановлении тиоредоксинов митохондрий принимает ГЛР, локализованная как в цитоплазме, так и в митохондриях [112].

Тиоредоксины выступают в роли специфических доноров электронов для ряда пероксиредоксинов – у штаммов дрожжей, мутантных по всем трем генам тиоредоксинового пути, в цитозоле происходит конститутивная активация *Yap1* и увеличение содержания некоторых *Yap1*-зависимых белков, а также ряда пероксиредоксинов: Tsa1, Tsa2, Ahp1, Cu/Zn-СОД и шаперона, Cu/Zn-СОД Ccs1 [114]. Для этих мутантов характерно увеличение окисления тиолов по сравнению с диким типом в Cu/Zn-СОД, Ccs1, Pep41, Mxr12, протеиндисульфидизомеразах, Tsa1 и Tsa2, Ahp1, митохондриальном пероксиредоксине, и Gpx-2 [115].

Тиоредоксиновый путь крайне важен для детоксикации эндогенной  $H_2O_2$ . У штаммов дрожжей с мутациями генов тиоредоксинового пути при обработке  $H_2O_2$  образование дисульфидов в белках было достоверно выше, чем у дикого типа [115].

#### 1.1.4.3. Глутаредоксины.

Глутаредоксины – еще один антиоксидантный компонент клеток дрожжей, структурно и функционально схожий с тиоредоксинами [116]. Глутаредоксины классифицируют по количеству остатков Cys, участвующих в катализе, на дитиоловые и монотиоловые; большинство грибов содержат оба типа. Восстановление глутаредоксинов происходит при участии GSH, который, в свою

---

1 Pep4 - аспартилпротеаза, участвующая в пост-трансляционной регуляции вакуольной протеиназы у дрожжей *S. cerevisiae*.

2 Mxr1 - Пептидметионинсульфоксид редуктаза – фермент, восстанавливающий окисленный до сульфоксида метионин у дрожжей *S. Cerevisiae*.

очередь, затем может быть восстановлен глутатионредуктазой в присутствии НАДФН [116].

У *S. cerevisiae* есть два дитиоловых глутаредоксина (*GRX1* и *GRX2*), содержащих последовательность Cys-Pro-Tyr-Cys в активном центре и локализованных в цитозоле, а также три монотиоловых глутаредоксина – (*GRX3*, *GRX4* и *GRX5*), содержащий в активном центре последовательность Cys-Gly-Phe-Ser [117; 118, 119].

*GRX1* и *GRX2* катализируют разложение  $H_2O_2$  и гидроперекисей [120]; благодаря глутатион-S-трансферазной активности эти белки участвуют в образовании смешанных GSSR, что обеспечивает одну из их антиоксидантных активностей, причём эта реакция является обратимой и регулируется уровнем GSH. Делеция генов *GRX1* и *GRX2* приводила к снижению термоустойчивости дрожжей, а также увеличению содержания GSH (в 2.5 раза) и GSSG (в 8 раз) по сравнению с диким типом [115]. Глутаредоксин 2 был обнаружен не только в цитоплазме, но и в митохондриях [121].

*GRX3* и *GRX4* локализованы в ядре, а *GRX5* – в митохондриях. Мутанты по всем трем генам и двойной мутант *grx2 x grx5* нежизнеспособны; у мутантов по *grx5* наблюдалось нарушение восстановления дисульфидных связей [122; 123].

#### 1.1.4.4. Пероксиредоксины.

Пероксиредоксины участвуют в восстановлении гидроперекисей до спиртов, а также – в ряде случаев –  $H_2O_2$ , пероксинитритов [124]. К этому классу антиоксидантных соединений относят тиоредоксидазы и алкилгидропероксидредуктазы, имеющие как цитозольную, так и митохондриальную локализацию. Некоторые формы пероксиредоксинов, также обнаружены в ядре и плазматических мембранах. В клетках эукариот, как правило, присутствует несколько изоформ пероксиредоксинов. По сравнению с глутаредоксинами каталазой, их эффективность несколько ниже. Предполагается, что основная специализация этих белков состоит в защите липидов плазматических



мембран от перекисного окисления [125]. Наряду с каталазами, пероксиредоксины играют важную роль в детоксикации  $H_2O_2$  [126].

В геноме *S. cerevisiae* обнаружено пять генов пероксиредоксинов – *TSA1*, *TSA2*, *AHP1*, *TPX* (или *DOT5*), *PRX1*, при этом первые четыре из них относятся к 2-Cys-пероксиредоксинам [127]. Пероксиредоксин Tsa1 защищает глутаминсинтетазу от инактивации в результате окисления. Этот вид пероксиредоксинов присутствует на всех стадиях роста, он проявляет бóльшее сродство к  $H_2O_2$ , чем к органическим пероксидам и, по-видимому, является основным пероксиредоксином цитоплазмы. Помимо этого, Tsa1 проявляет антиоксидантные свойства при митохондриальной дисфункции. Недостаточность Tsa1 у дрожжей приводит к увеличению содержания SH-групп и усилению транскрипции основных генов  $H_2O_2$ -резистентности [128]. Помимо пероксидазной активности Tsa1 может выполнять функции шаперонов критические важные при окислительном стрессе и ТШ. В нормальных условиях цитоплазматические мономеры Tsa1 образуют 272 кДа -комплексы, обладающие пероксидазной активностью. В присутствии оксидантов в клетках появляются 545 кДа-комплексы, которые проявляют свойства шаперонов [129].

Индукция *TSA2* наблюдается при окислительном стрессе. Изменение молекулярной массы и четвертичной структуры пероксиредоксина цитозоля Tsa2 в присутствии оксидантов так же, как и в случае Tsa1, сопряжено с изменением их функциональной активности [130]. Делеция гена пероксиредоксина *AHP1* не влияет на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae*, выращиваемых на среде с глюкозой, но повышает их чувствительность к органическим перекисям. Показано также участие Ahp1 в защите дрожжей от токсического действия металлов (ионов меди, кобальта, хрома, мышьяка, свинца, цинка). Активность Ahp1 возрастала у мутантов по Tsa1. Предполагается, что Ahp1 защищает плазматическую мембрану от окисления в присутствии экзогенных ионов меди [130].

### **1.1.5. Механизмы устойчивости дрожжевых клеток к рН-стрессу**

Значение внешнего рН – крайне важный параметр для поддержания нормальной жизнедеятельности дрожжевых клеток. Трансмембранный потенциал

цитоплазматической мембраны (ЦПМ), определяемый соотношением внутриклеточного и внешнего рН, играет ключевую роль в транспорте нутриентов через мембрану. Так, например,  $H^+$ -зависимые симпортёры необходимы для транспорта глюкозы и других сахаров, а также аминокислот. Кроме того, протон-связанные транспортёры вместе с  $K^+$ -транспортёрами, белками Trk1 и Trk2, и  $Na^+/H^+$  антипортером влияют на рН цитозоля, и для их нормальной работы необходимо поддержание градиента протонов [131]. Считается, что оптимальным для дрожжей значением рН является 5.5 (рН-оптимум активности  $H^+$ -АТФазы ЦПМ *S. cerevisiae*), хотя в зависимости от вида, этот показатель может значительно варьировать [132]. Выделяют кислый и щелочной стрессы.

Кислый стресс – частый спутник производства органических кислот грибными продуцентами. В течение роста грибные клетки выделяют протоны, которые со временем накапливаются в среде культивирования, что приводит к ингибированию роста клеток [133]. Происходит это по ряду причин, в числе которых изменение конформации мембранных белков и свойств клеточной стенки под воздействием внешнего рН, а также непосредственное изменение липидного бислоя гидрофобными катионами некоторых органических кислот. Под воздействием этих факторов проницаемость ЦПМ для различных ионов повышается, в клетку попадают избыточные количества заряженных соединений, имеющих сигнальные свойства (в частности, как самих протонов, так и одно- и двухвалентных катионов). Особую опасность для клеток представляют слабые органические кислоты, способные к транспорту через гиперполяризованные мембраны. В цитоплазме, где рН значительно ниже, чем вне клеток, эти кислоты диссоциируют, что приводит к повышению содержания протонов уже внутри клеток [134].

Ряд экспериментов на *S. cerevisiae* в условиях кислого стресса показал изменения большого количества генов, ответственных за структурную организацию клеточной стенки, а также метаболизм металлов. Методами протеомики было показано, что отсутствие АТФазы вакуолей, ответственных за перекачку протонов из цитоплазмы в вакуоль, а также белков стрессового сигнального пути MAPK

HOG13 приводит к пониженной толерантности к кислотному стрессу [135; 136]. Так, например анализ экспрессии генов с помощью микрочипов позволил установить, что кислый стресс приводит к изменению экспрессии генов, регулируемых транскрипционными факторами Aft1p и Aft2p, а именно редуктаз железа FRE1-3, FRE5, пермеазы железа FTR1, транспортёров сидерофоров ARN1 и 2, ферроксидазы (FET3) и белков, связанных с поглощением сидерофоров FIT1–FIT3 [136; 137; 138]. Это свидетельствует об изменениях в метаболизме металлов в условиях кислого стресса. Также в условиях кислого стресса индуцировался транскрипционный фактор AFT1. Более того, Aft1, подсвеченный GFP, локализовался в ядре клеток, выращенных в присутствии молочной, уксусной и соляной кислот. Это же явление наблюдалось и в условиях недостатка железа. Два наиболее вероятных объяснения этому состоят в том, что в условиях кислого стресса (1) клетки не могут импортировать железо; (2) клетки нуждаются в повышенном количестве железа. Известно, что метаболизм железа определяется в большей степени не внешней концентрацией железа, а активностью железосерных кластеров, которые у дрожжей локализованы, в основном, в митохондриях. Результаты ряда исследований показывают, что концентрации белков, содержащих железосерные кластеры, кодируемые генами LEU1 и ACO1 значительно снижаются в кислых условиях [139]. Более того, было продемонстрировано, что Aft1p вовлечен в механизм диауксического сдвига и окислительного стресса [140]

Экспрессия *SEDI*, кодирующего маннопротеин клеточной стенки, который особенно активно экспрессируется в стационарной фазе, также регулируется транскрипционным фактором Aft1p. Было показано также, что *SEDI* индуцируется в кислых условиях, хотя делеция этого гена приводит к устойчивости к кислотам. Эти результаты свидетельствуют о том, что понижение pH среды приводит к изменениям архитектуры клеточной стенки [137; 141].

Еще одним важным для противостояния кислому стрессу ферментом оказалась вакуолярная АТФ-аза. Мутанты *S. cerevisiae* с дефектным геном этого

---

3 HOG1 – основная МАРК *S. cerevisiae*

фермента показывали пониженную устойчивость к кислому стрессу [136]. Вакуолярная АТФаза – это мультисубъединичный фермент, который присутствует во всех эукариотических клетках. Вакуолярные АТФ-азы поддерживают кислотность вакуолей и поддерживают потенциал, необходимый для транспорта и накопления органеллами ионов, небольших молекул, аминокислот и некоторых метаболитов [135].

*Y. lipolytica* получила широкое распространение как продуцент органических кислот [1], в том числе, благодаря своей высокой толерантности к низким значениям рН. Так как *Y. lipolytica* наиболее интенсивно изучается с практической точки зрения, сведений об изменениях экспрессии генов, протеома или метаболома при кислотном стрессе в полном объёме на данный момент нет. Однако, накоплено достаточно данных о способности данного продуцента к синтезу различных органических соединений в кислых условиях и/или без контроля рН. Так, значения рН 2.8-4.0 были оптимальны для синтеза янтарной кислоты [142], итаконовой кислоты [143], а также лимонной кислоты [144].

Щелочной стресс, в отличие от кислого, ведет к деполяризации мембраны, что сильно затрудняет работу клеточных транспортёров [145]. Так, например, в оптимальных условиях у *S. cerevisiae* активно работает антипортер *Nha1*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , через который одновалентные катионы ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  и  $\text{K}^+$ ) выводятся из клетки. Этот процесс крайне важен для транспорта фосфатов, опосредованного градиентом ионов  $\text{Na}^+$ . В нейтральных и щелочных условиях этот процесс осложняется изменением градиента протонов. Для преодоления этого препятствия в щелочных условиях у дрожжей транспорт натрия переключается на альтернативный антипортер –  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФ-азу *Ena* [146]. Работа этого антипортера создаёт необходимый градиент одновалентных катионов для запуска транспортёра фосфатов *Pho89*. Регуляция экспрессии гена *Ena1* осуществляется за счёт работы различных сигнальных путей, речь о которых пойдёт ниже [147; 148].

Другим негативным для клеток последствием повышения рН является снижение растворимости важных микроэлементов, таких как железо и медь.

Делеции ряда генов, связанных с метаболизмом этих металлов (*CCC2*, *AFT1*, *FET3*, *LYS7* и *CTR1*) приводили к снижению выживаемости клеток в щелочных условиях [148]. Напротив, введение дополнительных копий генов *FET4* и *CTR1* повышало выживаемость. Более того, увеличение концентрации ионов железа и меди повышало устойчивость *S. cerevisiae* к высоким значениям pH [151].

Наиболее известный pH-чувствительный путь сигнальной трансдукции у грибов – это путь Pal/Rim. Этот путь был тщательно изучен на *A. nidulans* (Pal) и *S. cerevisiae* (Rim). У *A. nidulans*, путь Pal последовательно задействует белки PalH, PalI, PalF, PalC, PalA и PalB (рис.2). Кроме этого, в данный путь также опционально вовлекаются компоненты других процессов, например, белки клеточного транспорта [151].

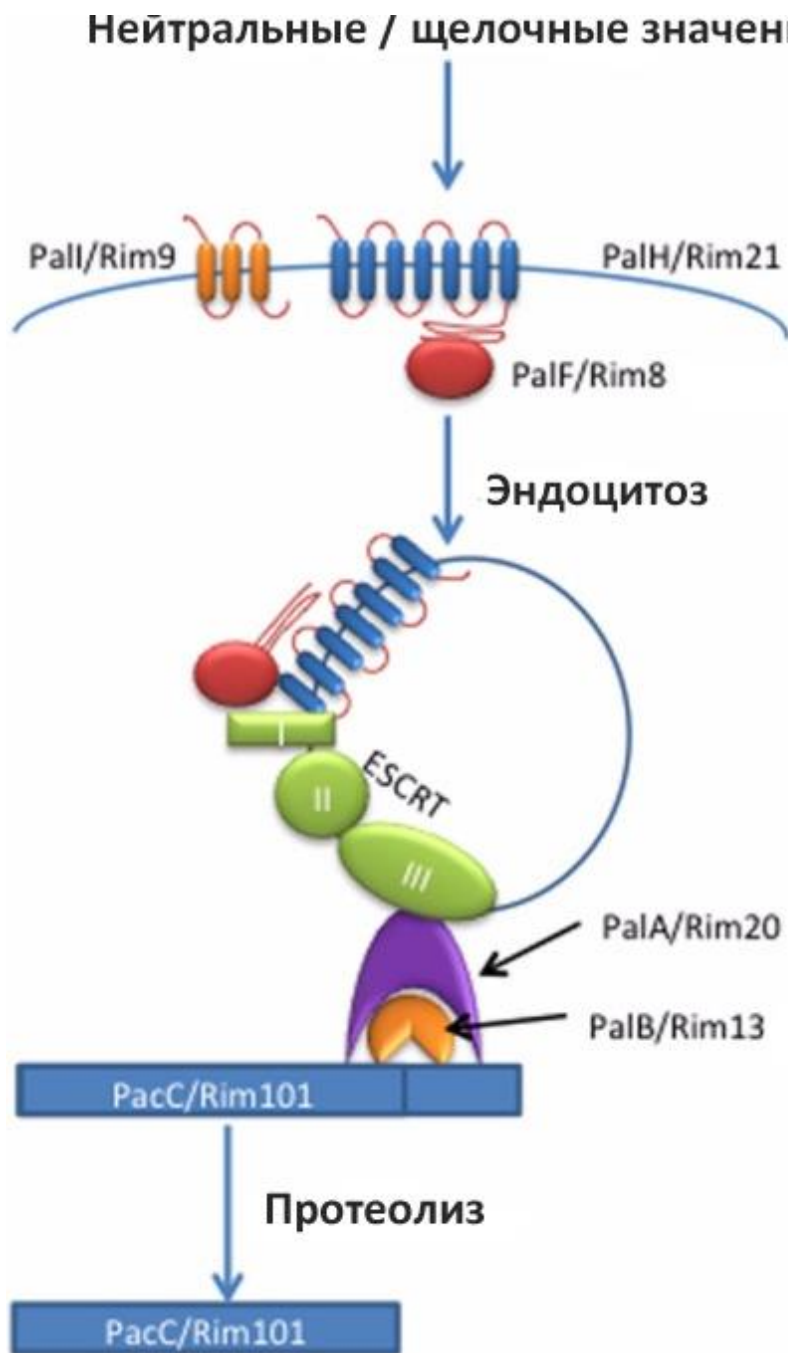


Рисунок 2. Белок ЦПМ PalH/Rim21, состоящий из семи трансмембранных доменов, функционирует как pH-рецептор. PalH образует комплекс с белком PalF/Rim8, который убиквитинируется в щелочных условиях и вызывает эндоцитоз с захватом ESCRT-белков, создавая тем самым множество сайтов присоединения для нижестоящих сигнальных компонентов (PalA/Rim20, PalB/Rim13) Эти белки, в свою очередь, инициируют протеолитическую активацию транскрипционного фактора Rim101 [152].

Активация этого сигнального пути щелочными значениями pH приводит к протеолитической активации транскрипционного фактора PacC/Rim101. PacC, в свою очередь проходит два последовательных протеолитических расщепления, в результате чего вместо 72 кДа неактивной формы возникает активная форма

величиной 27 кДа. Первое из этих расщеплений является непосредственно рН-зависимым и приводится в действие сигнальной PalB (рис. 2) [153].

Считается, что PalH/Rim21, белок ЦПМ, состоящий из семи трансмембранных доменов, функционирует как рН-рецептор. PalH образует комплекс с аррестиноподобным белком PalF/Rim8, который убиквитинируется рН-зависимым образом в щелочных условиях и рекрутирует ESCRT-I Vps23, создавая тем самым множество сайтов присоединения для нижестоящих сигнальных компонентов (рис. 2) [154]. Вопрос того, как именно PalH/Rim21 распознаёт щелочные значения рН, до сих пор остаётся открытым. Возрастание внешнего рН приводит не только к деполяризации ЦПМ, но и к нарушениям структуры ЦПМ, образуемой фосфолипидами. В этой связи стоит отметить, что сигнальный путь Rim101 у дрожжей может быть активирован рН-независимым образом, как при помощи обработки протонофорами, так и при исчерпании фосфатидилсерина во внутреннем слое ЦПМ. Оба этих варианта приводят к деполяризации ЦПМ, как и в щелочной среде, что однозначно свидетельствует о том, что деполяризация ЦПМ является ключевым фактором активации Rim21 [154]. Более того, недавние исследования показали, что изменения в асимметрии липидов и локальных зарядов во внутреннем слое ЦПМ также приводят к диссоциации Rim21 и инициации последующих сигнальных событий. На основе этих наблюдений было сделано предположение о том, что гибкий цитозольный С-концевой домен Rim21 работает как своеобразная антенна для распознавания асимметрии липидов ЦПМ [155].

Помимо Pal/Rim, существует еще один сигнальный путь, позволяющий грибным клеткам адаптироваться к нейтральным и щелочным условиям. Кальциневрин – Са-зависимая протеинфосфатаза, которая необходима грибам для роста при щелочных значениях рН, также, как и регулируемый ей транскрипционный фактор Crz1. Crz1 также необходим для устойчивости к повышенной концентрации анионов [153].

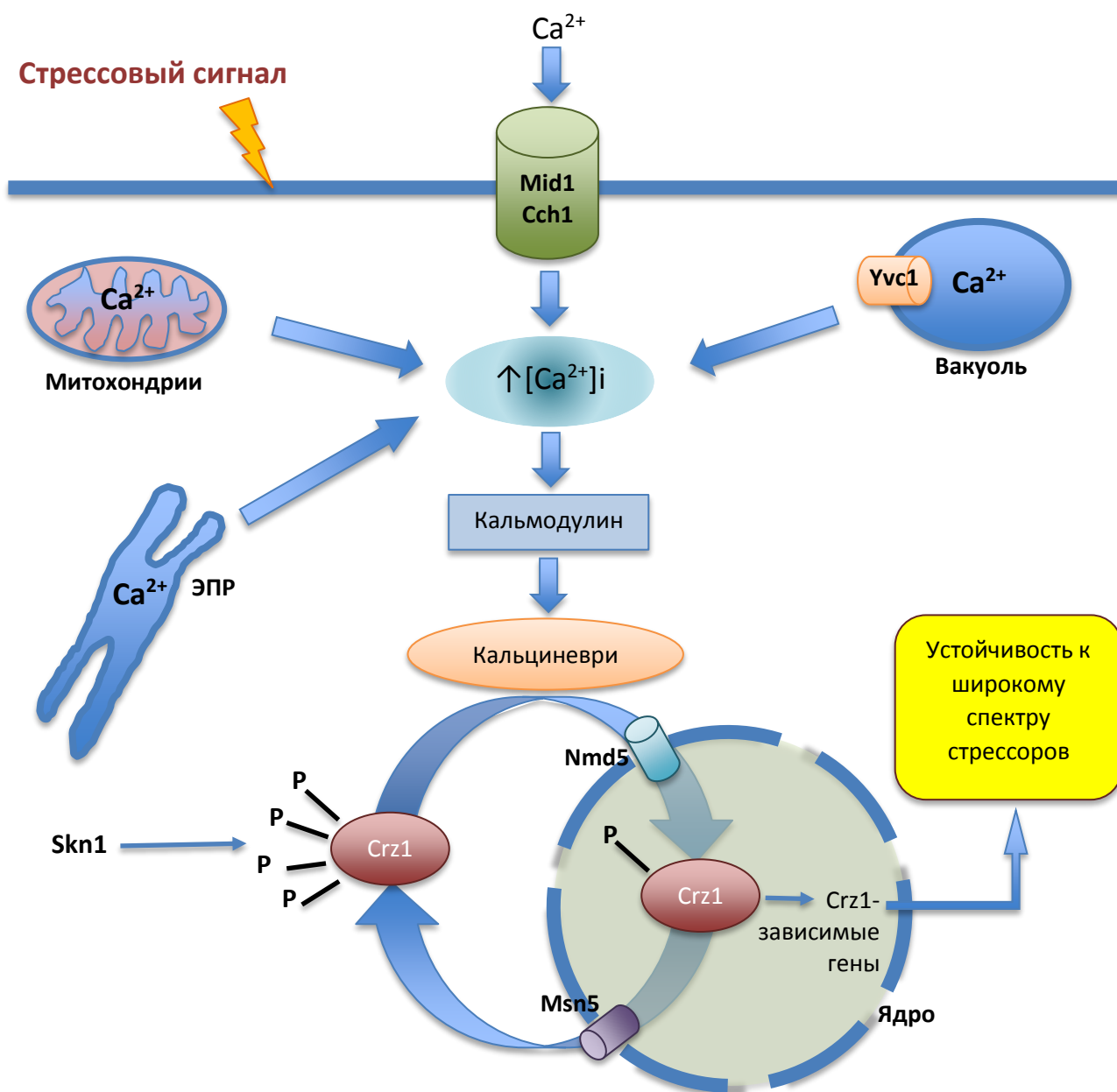


Рисунок 3. Сигнальный путь кальциневрина Crz1. Когда концентрация  $Ca^{2+}$  в цитозоле возрастает, кальмодулин активирует кальциневрин, который, в свою очередь, фосфорилирует Crz1. Crz1 затем импортируется в ядро, где репрессирует или индуцирует таргетные гены. После отсоединения фосфо групп Crz1 экспортируется из ядра [156].

Mds3, негативный регулятор сигнального пути TOR, также участвует в адаптации к нейтральным и щелочным значениям pH. Более того, мутанты *S. cerevisiae* по ряду трансмембранных белков сигнального пути MAPK показали большую чувствительность к щелочным условиям, что выразалось в быстром и кратковременном фосфорилировании MAPK Slt2 [157]. Это свидетельствует о том, что щелочной стресс также влияет на композицию клеточной стенки грибов.



Недавно был открыт новый сигнальный путь, необходимый для устойчивости к щелочному и катионному стрессу у *A. nidulans*. Этот путь, который, по-видимому, специфичен для мицелиальных грибов, определяется транскрипционным фактором SltA и сериновой протеазой SltB. Активация SltA требует протеолитического расщепления и удаления N-концевого домена SltB и фосфорилирования функциональной C-концевой части [158].

Важной особенностью *Y. lipolytica* является устойчивость в экстремально щелочных условиях – до pH 10.5. Исследование этой уникальной способности продолжаются больше 20 лет. Значительный вклад в изучение устойчивости *Y. lipolytica* к щелочным условиям внесла группа Р.А. Звягильской. Так, в ряде работ Звягильской и соавт. было показано, что в кислой среде *Y. lipolytica* осуществляет транспорт фосфата протон-зависимым образом, в то время как в щелочных условиях преобладающим становится Na<sup>+</sup>-зависимый путь. При этом в условиях, близких к нейтральному значению pH, «зоны ответственности» этих двух независимых механизмов перекрываются [11]. Однако, позже было показано, что экспрессия гена Na<sup>+</sup>-зависимой АТФазы *Ena1* у *Y. lipolytica* происходит лишь при росте на синтетической среде с глицерином и сукцинатом в качестве источников энергии и углерода, но не на полноценных средах с глюкозой и пептоном [159].

Важным этапом в изучении высокой алкалотолерантности *Y. lipolytica* стало изучение изменения протеома клеток при росте в щелочных условиях (pH 8.5) по сравнению со слабокислыми (pH 5.5). В этой работе было показано, что все белки, содержание которых в клетках *Y. lipolytica* существенно возрастает относительно других при увеличении pH, имеют митохондриальную локализацию. Это ферменты матрикса малатдегидрогеназа (МДГ) и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа (КГД), белки внешней мембраны (порин VDAC) или компоненты дыхательной цепи [160].

### **1.1.6. Механизмы устойчивости дрожжей к ТШ.**

В связи с резкими сезонными и суточными колебаниями температуры в различных природных средах явление ТШ широко распространено среди микроорганизмов. Один из наиболее значимых механизмов адаптации к тепловым

воздействиям у эукариот – это так называемый ответ на ТШ, высококонсервативная программа изменений экспрессии генов, запуск которой приводит к репрессии генов биосинтетической активности и индукции ряда цитопротекторных генов, кодирующих белки теплового шока (БТШ) [162]. В большинстве своём БТШ функционируют как молекулярные шапероны, предохраняя термически повреждённые белки от агрегации, развёртывая агрегированные белки и подвергая рефолдингу (корректируя третичную структуру) повреждённых белков. Кроме того, некоторые БТШ помечают повреждённые белки для их дальнейшей успешной деградации [162].

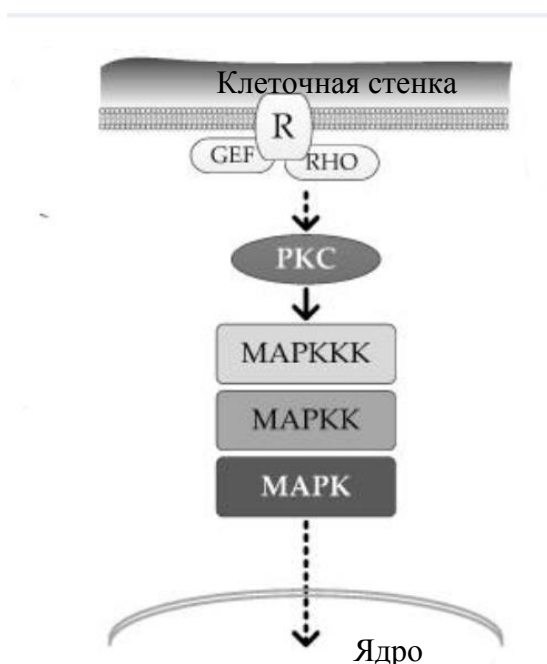
Физиологические изменения, такие как синтез совместимых осмолитов, перестройки клеточной стенки и временная приостановка клеточного цикла – также являются необходимыми условиями для выживания клеток в условиях повышенной температуры [163]. Последовательность событий ответа на ТШ принято рассматривать как фундаментальный цитопротекторный механизм противостояния высоким температурам, однако нет однозначной позиции относительно того, рассматривать этот механизм мерой «ремонта» клеточных структур и адаптации её метаболизма к работе повреждённых белков, или же как профилактическую меру. Наиболее вероятно, что изначально ответ на ТШ был отобран в результате эволюции как мера предотвращения нарушений в условиях сильных колебаний температуры окружающей среды, а не как способ преодоления уже нанесённых высокой температурой повреждений [164]. Ниже будут рассмотрены некоторые аспекты физиологической и метаболической адаптации клеток дрожжей к повышению температуры окружающей среды.

При остановке клеточного цикла в стадии G1 клетки находятся в неделящемся состоянии с нереплицированными хромосомами. ТШ инициирует временную приостановку именно на этой стадии, вероятно, из-за характерного для неё сниженного уровня транскрипции циклинов *CLN1* и *CLN2*, так как повышенная экспрессия гена *CLN2* с промотора *GAL1* необходима и достаточна для предотвращения, вызываемой ТШ остановки клеточного цикла [165]. Это говорит о том, что остановка клеточного цикла на стадии G1 представляет собой не столько

физиологическое явление, сколько сигнальное событие. Также предполагается, что накопление неправильно упакованных белков быстро активирует транскрипционный фактор Hsf1 (см. далее), который в свою очередь инициирует экспрессию одного или нескольких белков, блокирующих экспрессию *CLN1/2* [165].

Возникает вопрос, в чем заключается конкурентное преимущество остановки клеточного цикла на стадии G1 в ответ на накопление неправильно упакованных белков? Предполагается, что синтез ДНК или продолжение митоза на этой стадии даёт клетке некоторый выигрыш во времени, за который клетка успевает восстановить гомеостаз. Эта модель вполне согласуется с положением, устанавливающим наличие контрольных точек клеточного цикла, в которых его развитие останавливается при наличии повреждающих ДНК агентов или неправильно спаренных хромосом [165].

Поверхность клетки подвергается тепловому воздействию в первую очередь. В грибных клетках периплазматическое пространство – пространство между ЦПМ и клеточной стенкой - содержит ряд секретируемых ферментов и мембранных белков. Был предложен сигнальный путь с участием мембранных белков внешней поверхности ЦПМ ГТФазы Rho1, и каскада протеинкиназы, начинающегося с протеинкиназы Pkc1 и заканчивающийся на эффекторных транскрипционных факторах (рис. 4).



**Рисунок 4.** Схематическое представление пути клеточной стенки у грибов. Стрессовый сигнал на клеточной стенке детектируется рецептором (R), который имеет сильную связь с рядом ГТФаз, таких как факторы обмена нуклеотидов гуанидина (GEF) и гомологи Ras (RHOs). Каскад фосфорилирования начинается с протеинкиназы С (PKC), которая активирует фосфорилирование модуля MAPK. После фосфорилирования непосредственно MAPK, эта молекула перемещается в ядро, где инициирует транскрипцию ряда генов [166].

Этот сигнальный путь был назван путём клеточной стенки (ПКС). Инициация этого сигнального пути начинается с перестроек клеточной стенки, вызываемыми такими стрессорами, как затруднение синтеза компонентов клеточной стенки, изменения внешнего значения рН и температуры [166]. Повышение температуры активирует сигнальный путь ПКС по неустановленному механизму. Тем не менее, для его работы необходим как минимум один предполагаемый белок-сенсор Mid2 и рецепторы Wsc1 - Wsc4. В отсутствие этих блоков сигнальный путь успешно активируется при ответе на ТШ, однако клетки остаются чувствительными к ТШ и подвергаются автолизу, так и не активировав транскрипционный фактор Rlm1 сигнального пути ПКС [166].

Ранее было показано, что вне зависимости от вида стресса, транскрипционные изменения дрожжевой клетки в ходе адаптации к нему затрагивают около 900 генов, при этом происходит индукция около 300 генов и репрессия около 600. К последним относятся гены синтеза белка, компоненты рибосом, факторы процессинга РНК, и другие гены, обеспечивающие рост клеток [167]. Механизм ПКС можно рассматривать как часть генеральной линии ответа клетки на любое стрессовое воздействие, однако, часть генов, индуцируемых в ходе этого механизма, не является необходимой для выживания клеток в данных условиях. Возможно, такой механизм индукции сложился эволюционно для обеспечения клеткам устойчивости при последующих стрессовых воздействиях [168].

Наиболее важными для инициации ответа на ТШ транскрипционными факторами являются Hsf1 и Msn2/4. Транскрипционные факторы Hsf так или иначе присутствуют у всех эукариот. В клетках дрожжей наибольшее значение имеет фактор Hsf1, регулирующий экспрессию белков теплового шока. В геноме дрожжей содержится всего одна копия Hsf1, кодирующая белок из 833 аминокислотных остатков. Он имеет в своём составе домен связывания с ДНК, лейциновую «молнию», обеспечивающую его тримеризацию и трансактивационный С-концевой домен. Кроме того, уникальной особенностью дрожжевого Hsf1 является дополнительный активационный домен вблизи N-конца [169].

После синтеза в ядре транскрипты некоторое время проходят процессинг и затем выходят в цитоплазму для дальнейшей трансляции. При ТШ (42°C) в ядрах дрожжей накапливается большое количество транскриптов различных белков, однако, транскрипты БТШ эффективно транспортируются в цитоплазму [170]. Как минимум, один белок ядерной поры, Rip1, необходим для эффективного экспорта транскриптов БТШ в условиях ТШ, но не при нормальной температуре, что говорит о наличии специфического механизма транспорта этих жизненно важных мРНК [170]. Предполагается, что такой специфический механизм транспорта транскриптов возник из-за того, что в условиях ТШ «нормальный» механизм подвергается инактивации.

### 1.1.7. БТШ

БТШ были определены как белки, синтез которых стимулируется при температурах, превышающих оптимальную для данного организма на несколько градусов [171]. Выделяют следующие подклассы шаперонов: например, такую классификацию

- Hsp110 с молекулярной массой 100–110 кДа;
- Hsp90 с молекулярной массой 83-90 кДа;
- Hsp70 с молекулярной массой 66-78 кДа;
- Hsp60, образующие кольцевые комплексы из 14 субъединиц (шаперонины);
- Hsp40 (кошаперон для Hsp 70);
- Hsp20 – низкомолекулярные шапероны (small Hsp, sHsp) с молекулярной массой 15–30 кДа.

Наиболее консервативной аминокислотной последовательностью обладают белки БТШ70. Они относятся к шаперонам, способствующим правильной упаковке (фолдингу). В случае неправильного фолдинга, происходящего в условиях ТШ, и приводящего к агрегации и денатурации белка, БТШ70 взаимодействует с этими повреждёнными макромолекулами, способствуя их дезагрегации и правильной укладке полипептидной цепи *de novo* [172]. БТШ70 обладают активностью АТФазы,

следовательно, его каталитическая активность регулируется в двух ключевых точках: соотношением скорости гидролиза АТФ и восстановления АДФ до АТФ. Для регулирования каждого из этих процессов БТШ70 нуждаются в кофакторах двух основных групп: J-белках, называемых также БТШ40, и факторах обмена нуклеотидов (ФОН). J-белки стабилизируют конформацию БТШ70, усиливая их АТФазную активность и ускоряя гидролиз АТФ. В отличие от консервативных J-белков, ФОН у разных организмов представлены белками различной структуры. Их основная функция заключается в ускорении отсоединения АДФ от домена связывания нуклеотидов БТШ70 для последующего связывания с новой молекулой АТФ и запуска нового каталитического цикла. [173].

Гены, кодирующие БТШ70 у *S. cerevisiae*, разделяют на 4 семейства: *Ssa*, *Ssb*, *Ssc* и *Ssd*. Регуляция экспрессии этих генов осуществляется по-разному: некоторые из них конститутивно присутствуют в цитоплазме, в то время как экспрессия других индуцируется повышением температуры. Помимо цитоплазмы, шапероны с функцией, аналогичной БТШ70, присутствуют также в ЭПР и митохондриях. Связанные с ЭПР БТШ необходимы для предотвращения агрегации секретлируемых белков; для их функционирования также как, и для цитоплазматической формы БТШ70 необходимы кофакторы, модулирующие процессы связывания-отсоединения нуклеотидов [174].

В митохондриях функции шаперонов БТШ выполняют белки *Ssc1*, *Ssc3*, и *Ssq1*. *Ssc1* функционирует в матриксе митохондрий. Его действие сводится к облегчению транслокации белков в митохондрии с последующим их фолдингом [175]. Было показано, что этот белок связывается непосредственно с прекурсорами белков митохондрий, перенося их в матрикс, причём для этого процесса необходим определённый трансмембранный потенциал, но не градиент протонов [176; 177]. Аналогичной функцией обладает шаперон *Ssc3*. Его основным отличием от *Ssc1* является специфичность по отношению к белкам, необходимым для метаболизма различных субстратов в митохондриях. Наконец, третий тип митохондриальных 70кДа шаперонов – *Ssq1* – необходим для правильного синтеза и сборки железосерных кластеров в митохондриях [178].

Ещё одним важным в условиях ТШ классом белков являются шаперонины – крупные молекулярные комплексы, состоящие из двух колец, образующих полости, в которых происходит фолдинг перемещенных или новосинтезированных белков. Шаперонины I типа - члены семейства БТШ60 – индуцируются в стрессовых условиях. Это гомо-олигомеры, состоящие из 14 субъединиц [179]. Внутренняя полость этого комплекса может вмещать белки массой до 50 кДа и предохранять эти белки от окислительных условий матрикса. Значимость БТШ60 была показана в исследованиях на штаммах с нулевой мутацией по этому белку. Клетки оказались нежизнеспособными в условиях повышенной температуры в связи с увеличением неправильного фолдинга белков в митохондриях, включая такие белки как F1-субъединица АТФазы, цитохром b2, а также железо-серные кластеры сукцинатдегидрогеназы. В матриксе митохондрий этих мутантов в большом количестве накапливаются агрегаты белков, неспособные собираться в белковые комплексы [180]. Для решения этой проблемы в матриксе митохондрий присутствует ещё один протекторный белок – БТШ78. Он связывается с неправильно собранными полипептидами, стабилизируя их и предотвращая агрегацию. Делеция этого белка не приводит к значительному снижению роста клеток ни в нормальных условиях, ни в условиях ТШ. Однако при снижении температуры до физиологических значений у клеток дикого типа, в отличие от мутантов по БТШ78, синтез белка в митохондриях быстро восстанавливается [181].

Еще один важный компонент защиты клеток от ТШ – БТШ90 – консервативный белок со слабой АТФазной активностью, обеспечивающий в условиях ТШ правильное «созревание» заново синтезированных белков и правильную сборку сложных макромолекулярных структур [164]. Часто этот белок выделяется в виде макромолекулярного комплекса вместе с БТШ60 и БТШ70. Для *S. cerevisiae* известны два гена этого белка: *HSP83* и *Hsc83*, причем первый экспрессируется конститутивно, а экспрессия второго индуцируется ТШ, а также при переходе к стационарной стадии роста и спорообразованию [182].

БТШ100 – это протеазы с АТФазной активностью. У *S. cerevisiae* экспрессия БТШ104 наблюдается в нормальных условиях при росте на ферментируемых

источниках углерода. Белок-шаперон БТШ104 обладает уникальной для эукариот особенностью распознавать неправильно свёрнутые белки в агрегированном состоянии и активно разворачивать их, в конечном счёте, разбирая нерастворимые структуры. БТШ104 в значительной мере индуцируется повышением температуры, в нормальных условиях его присутствие в клетках дрожжей необязательно, а делеции значительно не затрагивают роста [183]. Однако, БТШ104 необходим для обеспечения клеткам дрожжей термотолерантности, а делеция этого белка снижает выживаемость клеток в 100-1000 раз в условиях летального ТШ [183].

Малые БТШ – это белки, обладающие функцией шаперонов, но не обладающие АТФ-азной активностью. Они участвуют в фолдинге белков как в нормальных, так и в экстремальных условиях. Эти молекулы способствуют элиминации полностью денатурированных белков и ренатурации частично денатурированных, «передавая» эти повреждённые белки шаперонам с АТФазной активностью и большей молекулярной массой [184]. У *S. cerevisiae* известны такие малые БТШ как БТШ30, БТШ26 и БТШ12. БТШ30 – стресс-индуцибельный гидрофобный мембранный белок, основной функцией которого является ингибирование активности протонной АТФ-азы в условиях ТШ, что приводит к консервации энергии в виде АТФ [185].

Таким образом, можно заключить, что адаптация клеток к ТШ включает в себя целый комплекс мер, затрагивающих самые разные метаболические пути и механизмы. Неудивительно, что часть этих механизмов может быть мобилизована на защиту клетки от прочих неблагоприятных воздействий, таких как осмотический стресс или повышенное содержание в среде этанола [66]. Предполагается, что по крайней мере часть этих эффектов может лежать в основе так называемой перекрёстной адаптации.

### **1.1.8. Перекрёстная адаптация у грибов.**

Перекрёстной адаптацией назван эффект усиления устойчивости клеток к одному виду стресса под воздействием нелетальных значений другого [153]. Очевидно, что экологические ниши, занимаемые различными микроорганизмами,



предполагают воздействие не одного, а нескольких видов стресса. Следует отметить, что возникновение стрессовых условий различной природы может происходить как последовательно, тогда следует говорить о последовательном воздействии стрессовых факторов, так и одновременно, тогда имеет место быть комбинированный стресс. В обоих случаях, однако, можно выделить некоторые признаки перекрёстной адаптации, о которых будет сказано ниже [153]. В клетках низших эукариот – дрожжей – ответ на стресс сопровождается индуцибельными изменениями в генеральном стрессовом ответе генома. Этот ответ включает функционирование *STRE*-элементов (*s*tress *r*esponse *e*lements), содержащих общий коровый фрагмент CCCCT и обеспечивающих стресс-индуцируемую транскрипцию целого ряда генов антиоксидантной защиты [187, 188]. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* геномный ответ на окислительный стресс (в частности, на воздействие оксидантов) затрагивает 1/3 генома, которая включает гены, кодирующие детоксифицирующие ферменты (каталаза, супероксиддисмутаза (СОД), глутатион-пероксидаза), и гены, вовлеченные в окислительно- восстановительные реакции (тиоредоксин, глутатион-редуктаза, глутаредоксин) (рис. 5).

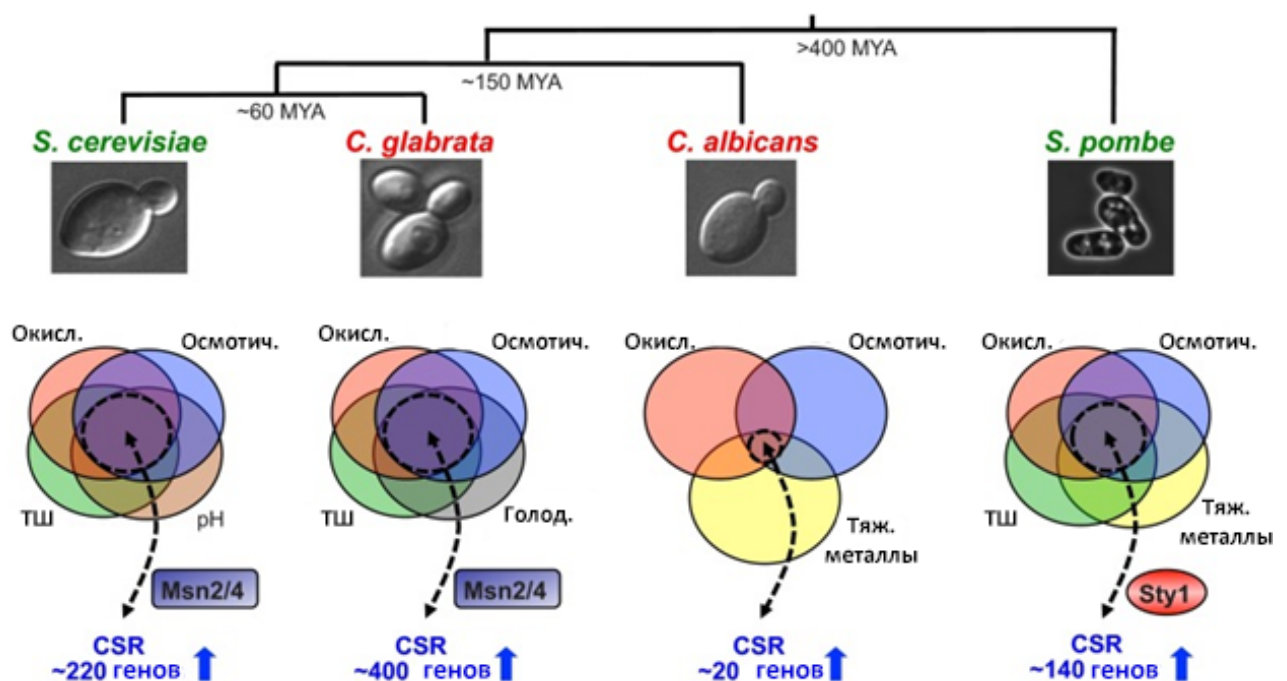


Рисунок 5. Генеральный ответ дрожжей на стрессовые условия. Дрожжи *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *Candida glabrata* и *Schizosaccharomyces pombe* эволюционно разделялись в течение миллионов лет и заняли в результате различные экологические ниши: зеленым цветом указаны непатогенные штаммы, красным – патогенные [188].

Индукция генов через *STRE*-регулон зависит от факторов транскрипции Yap1p и Yap2p [189]. Генетический ответ дрожжевой клетки на физический стресс, в частности, на увеличение температуры, заключается в индукции генов стрессового комплекса (металлотионеин, DNA-damage response-гены (DDR), белки теплового шока (Hsps), каталаза) при участии фактора транскрипции HSF [187].

В случае адаптации к различным видам стресса, молекулярный механизм защитного эффекта состоит в ответе на стресс на уровне транскрипции, при котором в адаптации к одному виду стресса индуцируются гены, участвующие в адаптации к другому виду стресса [189]. Так, для *S. cerevisiae* известен закаливающий эффект нелетального ТШ против последующего окислительного стресса [190; 153]. Аналогичным образом предварительная обработка в виде сублетального окислительного, осмотического или теплового стрессов увеличивает устойчивость клеток *S. cerevisiae* к замерзанию-оттаиванию [191].

Также было показано, что у *S. cerevisiae* в условиях теплового, осмотического, окислительного и рН-стрессов активируются сотни генов, играющих роль не только в адаптации к стрессовым воздействиям, но и центральных метаболических процессах, в т.ч. генерации энергии [191]. Этот коровый механизм защиты от различных стрессов координируется активаторами транскрипции Msn2 и Msn4, которые связываются с стресс-индуцируемыми элементами промоторов целевых генов [153; 182]. Стоит отметить, что универсальный механизм защиты против стрессов, обусловленный транскрипционными факторами Msn2/4, носит переходный характер, а интенсивность ответа зависит от интенсивности стрессового воздействия [182]. В свою очередь, регуляция экспрессии генов с участием Msn2/4 контролируется субстрат-зависимыми сигнальными путями: PKA, а также сигнальным путём TOR. Активность PKA регулируется доступностью субстрата при помощи регуляции уровня цАМФ в клетке, который в свою очередь, определяется активацией G-белков и аденилат-циклазой. Низкая активность PKA, вызванная ТШ или условиями недостатком глюкозы, что приводит к аккумуляции Msn2 и Msn4 внутри ядра, которая сохраняется даже после снятия стрессовых

условий. В то же время высокие уровни активности ПКА блокируют аккумуляцию этих транскрипционных факторов внутри ядра, что не позволяет им участвовать в регуляции экспрессии генов [153].

В случае последовательного воздействия стрессовых факторов ключевым является недолгосрочный эффект “молекулярной памяти”, предполагающий наличие в клетках в высоких концентрациях некоторых компонентов защиты клеток даже после устранения стрессового воздействия [192]. Важно отметить, что этот эффект работает как при последовательном введении одного и того же стрессового фактора разной интенсивности - “эффект закаливания”, так и для стрессоров различной природы. Наиболее характерным примером “эффекта закаливания” может служить т.н. возрастающая термотолерантность - снижение чувствительности к летальному ТШ (50°C), после предварительной экспозиции в условиях мягкого теплового воздействия (37°C), известная для *S. cerevisiae*, *S. pombe* и *C. albicans* [193; 194]. Среди ключевых компонентов защиты клеток, инициирующих возрастающую термотолерантность, выделяют БТШ104 и трегалозу [195]. При этом, долгосрочный эффект возрастающей термотолерантности обеспечивается в основном за счёт увеличения количества трегалозы, в то время как краткосрочная «молекулярная память» обеспечивается преимущественно за счёт БТШ104.

Необходимо отметить, что наличие коровых механизмов антистрессовой устойчивости не является универсальной чертой всех грибов, во всяком случае их универсальность подвергается сомнению. Так, например, подвергалось сомнению существование такого корового механизма для *C. albicans* [196]. Последующие исследования показали, однако, что коровый ответ на стресс у *C. albicans* всё же присутствует, однако включает в себя гораздо меньшее число генов, чем предполагалось ранее - около 25. При этом роль транскрипционных факторов Msn 2/4 выполняют МАРК Hog1 и Cap1 [197].

Важно отметить, что перекрёстная адаптация между последовательно действующими стрессорами далеко не всегда является симметричной, то есть если предобработка одним стрессовым фактором приводит к усилению устойчивости организма в отношении другого, то обратная закономерность наблюдается далеко

не всегда. Так, в клетках *C. albicans*, подверженных предобработке повышенной температурой, развивается устойчивость к последующему окислительному стрессу, но не осмотическому шоку [198]. Этот механизм перекрёстной защиты определяется транскрипционным фактором Cap1 и соотносится с индукцией целевых генов этого белка - генов теплового шока [199; 200]. В данном случае перекрёстная адаптация является асимметричной, так как предварительный сублетальный окислительный стресс не инициирует в клетках *C. albicans* устойчивость к последующему ТШ [198]. Митчелл с соавт. [200] предположили, что подобные механизмы асимметричной перекрёстной адаптации формируются в ходе эволюции у микроорганизмов, занимающих экологические ниши, где один из видов стресса неизбежно следует за другим, таким образом, эффекты асимметричной перекрёстной адаптации можно предсказать, исходя из экологической ниши, занимаемой организмом. Так, например, для клеток *S. cerevisiae*, используемых в промышленности при повышенной температуре для улучшения ферментации, было предсказано включение генов окислительного стресса, которые будут необходимы после того, как глюкоза будет исчерпана, а метаболизм переключится с брожения на дыхание [200].

Что касается одновременного воздействия стрессовых факторов – комбинированного стресса, в данном случае признаки перекрёстной адаптации могут выражаться в том, что повреждающий эффект от нескольких стрессовых воздействий может быть не равен суммарному эффекту каждого из них по отдельности [201]. Браун с соавт. [191] предположили, что этот эффект на молекулярном уровне может объясняться пересечением путей стрессового сигналинга.

В подтверждение этой гипотезы авторы предложили следующие примеры: сочетание окислительного ( $H_2O_2$ ) и нитрозативного стрессов, а также сочетание катионного ( $NaCl$ ) и нитрозативного стрессов оказывают суммарный эффект на рост клеток *C. albicans* [201].



**Рисунок 6. Гипотетическая схема перекрёстной адаптации *C. albicans* к различным видам стресса в соответствии с [189].**

Однако, индукция гена *YHB1* в этих условиях снижена, что указывает на повреждение сигнального пути Cta44. В то же время, неаддитивный эффект становится заметен при сочетании катионного и окислительного стрессов [202]. Эти воздействия наносят клеткам синергетическое повреждение. Авторы предположили, что этот синергетический эффект возникает из-за “интерференции” - перекрытия сигнальных путей Cap1 и Hog1, которое происходит при сочетании окислительного и катионного стрессов, в результате чего не происходит индукции генов окислительного стресса, а возрастающий уровень АФК в клетках приводит к апоптозу [189].

Напротив, сочетание повышенной температуры и некоторых других видов стресса ведёт к суммарному эффекту повышения устойчивости клеток: повышение температуры вызывают у *C. albicans* повышение чувствительности к повреждению клеточной стенки, но не к осмотическому стрессу [198]. Эти стрессовые взаимодействия опосредованы через белок теплового шока БТШ90. Как известно, сигнальные пути Hog1, Mck1 и Cek1 определяют функции клеточной стенки. Все участвующие в этих путях МАРК являются белками - клиентами БТШ90, а их активность определяется работой именно этого БТШ [198]. Повышение

4 Транскрипционный фактор *C. albicans*, активируемый олеатом.

температуры ведет не только к увеличению экспрессии БТШ90, но и к усилению его связывания с белками - клиентами, что снижает повреждающее воздействие стрессовых факторов на клеточную стенку и повышает устойчивость клеток [198].

О существовании эффектов перекрёстной адаптации в клетках *Y. lipolytica* известно сравнительно немного. Так, Аринбасарова с соавт. [66] показали существование возможности перекрёстной адаптации при последовательном воздействии на клетки таких стрессовых факторов, как повышенная температура, обработка оксидантами (перекисью водорода и менадионом) и воздействие этанола. Предварительное воздействие на клетки *Y. lipolytica* сублетальными дозами каждого из этих факторов приводило к усилению устойчивости против летальных доз остальных. Таким образом, авторы показали, что последовательное воздействие теплового, окислительного или этанольного стрессов приводят к симметричной перекрёстной адаптации клеток *Y. lipolytica*.

Помимо перекрёстной адаптации к указанным выше факторам авторы выявили также коровый механизм стрессовой защиты клеток *Y. lipolytica*, который включал в себя снижение уровня цАМФ и активацию защитных генов, контролирующих биосинтез антиоксидантных ферментов – каталазы, СОД, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, а также L-лактатоксидазы, НАД<sup>+</sup>-зависимой алкогольдегидрогеназы и АО [66]. Кроме изменения метаболической активности и антиоксидантного статуса клетки в неблагоприятных условиях любой природы происходили сходные изменения ультраструктуры клеток: набухание митохондрий и уплотнение их матрикса, появление электрон-плотных полифосфатных гранул, а также увеличение количества и размеров пероксисом в клетках, что вполне согласуется с установленными авторами изменениями метаболической активности клеток [66]. Авторы предположили, что выявленный ими механизм адаптации клеток *Y. lipolytica* является универсальным для любых стрессовых воздействий, однако вопрос о влиянии внешних значений pH на адаптацию клеток ко всем перечисленным стрессорам является нерешенным до сих пор. Некоторые данные, полученные этим же коллективом авторов, показали повышение устойчивости клеток *Y. lipolytica* к тепловым воздействиям при

преинкубации клеток в кислых условиях (pH 4.5 и pH 3.0) по сравнению с близкими к нейтральным значениями (pH 6.0 и pH 7.2) [66].

Несмотря на активное изучение и широкие перспективы применения такого уникального свойства *Y. lipolytica*, как устойчивость в щелочных условиях, информация о возможности перекрёстной адаптации между этим и какими-либо другими стрессовыми воздействиями на клетки практически отсутствует, хотя в данных условиях была показана индукция порина внешней мембраны митохондрий VDAC, играющего одну из ведущих ролей в транспорте АФК через внешнюю мембрану митохондрий и определяющего, как предполагается, АФК-опосредованный сигналинг в стрессовых условиях [201]. Кроме того, малопонятна роль и возможность интерференции сигнального пути RIM101 с другими сигнальными путями при адаптации клеток к каким-либо стрессам, кроме щелочного и катионного [203, 204].

## 1.2. Роль компонентов углеводной природы в адаптации клеток грибов к стрессам

Так же, как и белки, многие углеводы способны оказывать протекторное действие в клетках дрожжей при разных видах стресса. Это действие может состоять в механической защите клеточных структур при дегидратации, непосредственном антиоксидантном действии и др. [205].

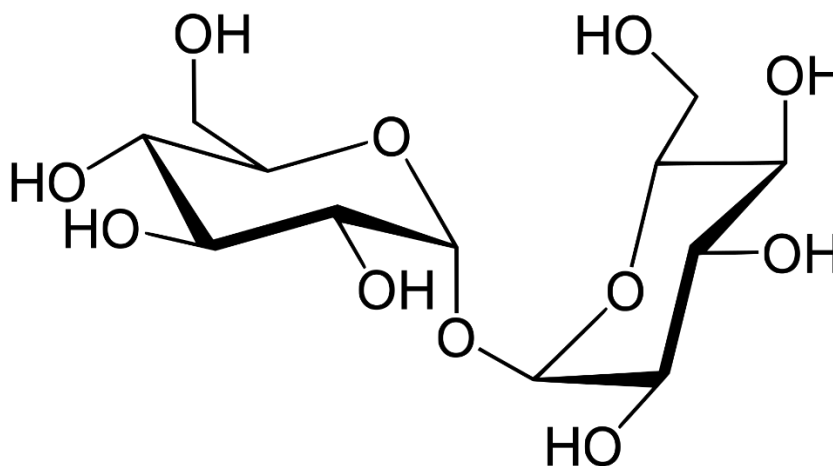


Рисунок 7. Молекула трегалозы

Наиболее известным «стрессовым» углеводом у грибов является трегалоза. Молекула трегалозы представляет собой дисахарид, состоящий из двух остатков  $\alpha$ -D-глюкозы (рис. 7); его полное название –  $\alpha$ -D-глюкопиранозил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид. Трегалоза была обнаружена у широкого ряда организмов, от бактерий до беспозвоночных. Наибольшее количество трегалозы – от 16 до 30% – было обнаружено в спорах мицелиальных грибов и дрожжах [206].

Несмотря на то, что накопление трегалозы клетками грибов рассматривается как стрессовый маркер, оно не всегда является стрессовым ответом [207]. Так, у мутантного штамма *Saccharomycopsis fibuligera A11* содержание трегалозы было конститутивно высоким, а при различных стрессовых воздействиях не наблюдалось ни активации трегалозофосфатсинтетазы (основного фермента синтеза трегалозы), ни изменения содержания этого дисахарида [206].

Крайне важную роль играет трегалоза при дегидратации клеток, возникающей во время неблагоприятных условий, когда многие организмы, в т.ч. дрожжи, способны впасть в состояние анабиоза [206]. Быстрый синтез трегалозы в этом процессе показан для многих организмов (от архей до грибов). Предполагается, что предпочтение этому углеводу в условиях с низким содержанием воды отдаётся из-за его пониженной способности к образованию кристаллов по сравнению с другими дисахаридами, которые могут механически повреждать различные клеточные структуры при понижении температуры. Таким образом, при обезвоживании организма трегалоза выполняет функцию стабилизатора белков и фосфолипидов в липидном бислое [208]. Особую значимость при дегидратации приобретает микровязкость – интегральная величину, обусловленная в т.ч. степенью ненасыщенности мембранных липидов. Показано повышение микровязкости находится в прямой зависимости от концентрации трегалозы, оказывающей влияние на упаковку мембранных белков и активность ферментов [209].

Помимо функций механического протектора, трегалоза также обладает некоторыми антиоксидантными свойствами. Антиоксидантные свойства трегалозы были показаны в опытах с *S. cerevisiae*, подвергнутыми ТШ или воздействию ингибитора протеасомы (MG132). Накопление трегалозы при этом было связано с



увеличением выживаемости клеток [210]. Цитотоксичное действие этанола обусловлено свободнорадикальным повреждением липидов клеточных структур и дегидратацей. Увеличение его концентрации в среде также сопровождалось ростом содержания трегалозы в клетках [211].

Деление клеток в культурах тканей высших эукариот регулируется не только количеством антиоксидантов, но и составом мембранных липидов, степенью их ненасыщенности. Эти же закономерности подтвердились в опытах с прокариотами и низшими эукариотами, в т. ч. с мицелиальными грибами [206]. Об антиоксидантных свойствах трегалозы, таким образом, свидетельствуют данные о взаимосвязи между степенью ненасыщенности ацильных цепей липидов, микровязкостью мембран и интенсивностью накопления у мицелиальных грибов.

Цитопротекторная функция при стрессе показана для ряда других соединений: полиолов глицерина, гликозилглицерина, арабита, маннита, сорбита, а также аминокислот – глутамата, глицина, глицинбетаина, эктоина, гамма-аминомасляной кислоты, пролина, бетаина [212].

В зависимости от систематического положения, цитопротекторная функция соединений углеводной природы в условиях ТС у грибов реализуется по-разному [213]. У представителей класса *Zygomycetes* – *Cunninghamella japonica* и *Absidia coerulea* – происходит только превращение глюкозы в трегалозу, стабилизирующую мембранные липиды. Кроме того, трегалоза является своеобразным «депо» глюкозы, которая может быть затем использована для удовлетворения потребности клеток в энергии. У (–) штамма *Blakeslea trispora* в стилоспорах, полученных в условиях гипертермии, был обнаружен полиол инозит [213].

У *Aspergillus japonicus* и *Myceliophthora thermophila* набор углеводов цитозоля более разнообразен: помимо трегалозы у этих грибов был обнаружен ряд цитопротекторных полиолов. В условиях ТС было показано накопление трегалозы и инозита, а при гипотермии – маннита и глицерина [213].

Спектр цитопротекторных углеводов у базидиомицетов еще шире. У этих грибов адаптация к ТС происходит за счет разнообразных физиолого-биохимических механизмов. У *Lentinula edodes* при гипотермии в качестве

криопротектора выступает арабит, а не маннит, как у аскомицетных грибов, но, как и у последних, обнаруживается глицерин [214].

У базидиомицета *Pleurotus ostreatus* при гипертермии резко увеличивался уровень сахарозы, и наблюдалось исчезновение арабита [215]. У всех исследованных грибов количество трегалозы снижалось при понижении температуры культивирования, что можно объяснить превращением трегалозы в глицерин при понижении температуры культивирования [216].

Следует сказать еще несколько слов о протекторной роли полиолов в клетках. Антиоксидантными свойствами могут также обладать маннит и арабит, которые в больших количествах накапливают клетки некоторых грибов. Споры фитопатогенного гриба *Puccinia graminis* накапливают до 10% массы этих сахаров [217], как и споры возбудителя пиркульяриоза *Pyricularia oryzae*. Эти полиолы могут играть роль в непосредственной защите прорастающих спор от окислительного стресса инициируемого организмом хозяина в ответ на заражение. Важно заметить, что накопленный в спорах грибов маннит при этом не расходуется на энергетические нужды при прорастании [218]. В связи с этим для маннита была предположена осмолитическая функция.

В лабораторной практике маннит широко используется для обезвреживания радикала ОН<sup>•</sup> и может выполнять аналогичную функцию в клетках грибов. Мутанты с пониженным содержанием маннита патогенного гриба *Cryptococcus neoformans* оказались более уязвимы к модели окислительного стресса, продуцируемого клетками хозяина, чем дикий тип [219].

Патель и Вильямсон [218] предположили, что маннит фитопатогенных грибов ингибирует гидроксил-зависимые реакции фитоиммунитета. Для борьбы с цитопротекторными свойствами маннита у патогенов многие растения синтезируют фермент маннитдегидрогеназу, окисляющую маннит до маннозы. В стерильных растениях табака присутствуют лишь следы маннитдегидрогеназы, но ее активность повышается при контакте растений с грибами патогенными. В то же время при обработке грибов рода *Alternaria* экстрактами растений в клетках гриба возрастает содержание маннита [218].

Все изложенные данные свидетельствуют о том, что в процессе эволюции у грибов возрастало разнообразие цитопротекторных соединений углеводной природы и вариантов их действия. Если в спорах низших грибов, накапливается до 90-95% трегалозы от общей массы сахаров, то у аскомицетов появляются полиолы – эритрит, маннит и инозит в качестве основных протекторов [213].

### **1.3. Роль липидных компонентов в антистрессовой устойчивости клеток.**

Важную роль в защите клетки от неблагоприятных условий окружающей среды играют содержащиеся в клетке липидные компоненты. Липидные компоненты могут быть представлены как запасными, так и мембранными липидами, которые в свою очередь можно подразделить на компоненты цитоплазматической мембраны и компоненты мембран клеточных органелл. Физико-химические свойства этих компонентов (полярность гидрофильных групп, жирнокислотный состав гидрофобных групп, температура плавления и пр.) играют важную роль в защите клеток против различных неблагоприятных условий и могут иметь критическое значение, определяющее жизнеспособность микробной клетки в условиях того или иного стрессового воздействия [220]

#### **1.3.1. Запасные липиды.**

Данные, полученные для дрожжей *S. cerevisiae*, свидетельствовали, что способность накапливать триацилглицериды (ТАГ) в виде липидных капель предохраняла клетку от апоптотических изменений, вызываемых липотоксичностью в присутствии полиненасыщенных кислот [221]. Похожие данные были получены и для *S. pombe* [222]. Наконец, принципиально иные данные были получены для штамма *S. cerevisiae* H1246, неспособного накапливать ТАГ в виде липидных капель. У этого штамма в присутствии цитотоксичного жирорастворимого белка  $\alpha$ -синуклеина выживаемость клеток была значительно выше, а показатели окислительного стресса заметно ниже, чем у клеток дикого типа [223]. Таким образом, как данные, подтверждающие защитную функцию запасных липидов, так и данные о влиянии их состава на жизнеспособность клеток дрожжей под воздействием различных стрессоров остаются неоднозначными. Основным

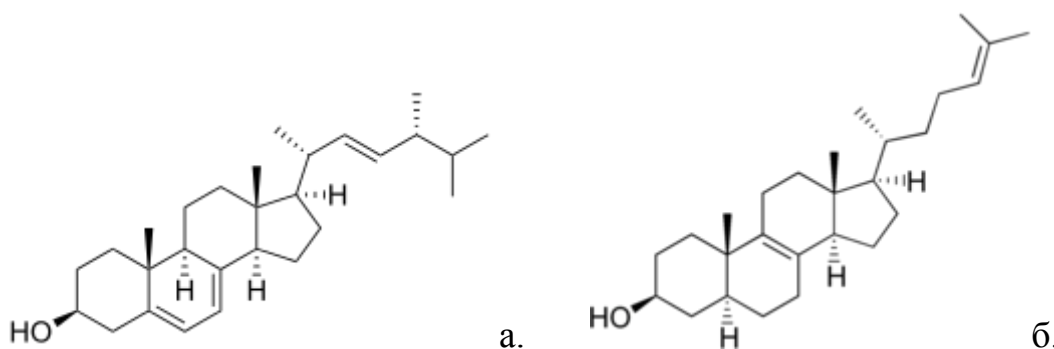
протекторным свойством липидных капель считается способность накапливать избыток свободных жирных кислот в безопасном для клеток виде ТАГ [224], однако позже был показан ряд сигнальных функций ТАГ. Ряд важных генов антиоксидантной защиты обладают т.н. элементом антиоксидантной защиты (antioxidant response element, ARE) – последовательностью в промоторной области, которая способна связываться с транскрипционным фактором NRF2; считается, что это ключевой этап инициации ответа клеток животных на стресс и повышение уровня АФК в тканях [225]. Влияние полиненасыщенных жирных кислот, в особенности докозогексановой кислоты (ДГК) и эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) на экспрессию генов, участвующих в антиоксидантном ответе клетки, наиболее вероятно, опосредовано воздействием продуктов окисления этих жирных кислот на NRF2 [226]. Окисленные  $\omega$ -3 жирные кислоты стабилизируют NRF2 и усиливают эндогенную экспрессию генов, регулируемых этим белком.

### **1.3.2. Роль мембранных липидов в антистрессовой защите клеток.**

Плазматические мембраны отличаются от остальных мембран клетки, так как содержат большую фракцию стеролов (Ст) и сфинголипидов (СФ). Изучение моделей мембран показало, что Ст и СФ могут образовывать упорядоченные липидные домены, в отличие от глицерофосфолипидов (ГФЛ), образующих однородные смеси [227]. Основанием для этого служит тот факт, что Ст содержат структуры, состоящие из 4 конденсированных колец и алифатические «хвосты», которые могут определённым образом взаимодействовать с СФ [228]. Ацильные цепи липидов плотно упаковываются, взаимодействуя с жесткими Ст, образуя небольшие области с конденсированным бислоем, которые получили название жидких упорядоченных структур [229] или рафтов. ГФЛ с ненасыщенными ацильными цепями неспособны упаковываться таким образом и образовать рафтовые домены. Одной из предполагаемых функций липидных рафтов является преимущественное связывание со специфическими белками, что делает рафты своеобразными «центрами организации» плазматической мембраны. Предполагается, что липидно-модифицированные белки на внешней стороне

мембраны и ацилированные белки на внутренней стороне мембраны присутствуют в рафтах в связи с их большим сродством с насыщенными ацильными цепями. У дрожжей липидные рафты обуславливают способность мембран к удержанию белков, секреции, эндоцитозу, а также клеточную полярность. Показана особая важность эргостерола и СФ для этих процессов [230]. Важность эргостерола и СФ в процессах эндоцитоза показана на мутантах *ergΔ*, которые накапливали различные интермедиаты Ст. В этом исследовании было показано значение Ст как на ранних стадиях эндоцитоза, так и на поздних стадиях везикулярного транспорта [231]. Недавние исследования показали, что у грибов липидные рафты гораздо большего размера, чем предполагалось ранее. Предполагалось, что эти области имеют размеры от 3 до 15  $\mu\text{m}^2$ , в зависимости от конкретного организма и локализации. Последние данные свидетельствуют о том, что размер липидных рафтов у грибов около 75  $\text{nm}^2$  [232].

В ряде работ было изучено влияние состава Ст на выживаемость клеток *S. cerevisiae* в условиях воздействия различных стрессоров. Так, Дюпон и соавт. [233] показали, что приводящий к дегидратации осмотический шок, снижает выживаемость клеток мутанта *erg6Δ*, не способного к синтезу эргостерола, менее, чем до 10%, против 80% у дикого типа. Авторы связали это с тем, что у эргостерола, в отличие от зимостерола (рис. 8) в кольце В присутствует двойная связь между 7 и 8 атомами углерода, необходимая для благоприятной упаковки молекул в бислое, повышающей жёсткость мембраны.



**Рисунок 8. Структуры эргостерола (а) и зимостерола (б).**

Дегидратация клетки, неизбежно возникающая при осмотическом шоке, приводит к деформации клеточной мембраны, которая в случае недостаточной её

жесткости, может стать летальной для клетки [228]. Другое важное наблюдение, сделанное авторами, состояло в увеличении проницаемости клеточной мембраны на стадии регидратации при снижении осмотического давления с 30 до 1,4 мПа. При этом в культуре мутантных клеток *erg6Δ* было повреждено 89% клеток, в то время как у дикого типа этот показатель не превышал 6%. Хотя связанное с дегидратацией уменьшение поверхности клетки происходило как у дикого типа, так и у мутанта, ТЭМ позволила выявить характерные лишь для клеток мутанта полости, образуемые мембраной непосредственно под клеточной стенкой. Авторы связали формирование этих полостей с недостаточной жёсткостью ЦПМ, которая имеет критическое значение на стадии регидратации клетки [233]. Аналогичные данные в 2015 г. получили Кодедова и Сычрова [234]. В их работе было показано, что мутанты *erg6Δ* обладали не только наименьшей по сравнению с диким типом и другими мутантами пути синтеза эргостерола устойчивостью к воздействию токсичных ионов лития и высоких концентраций NaCl, но и характеризовались наибольшей деполяризацией ЦПМ вследствие закисления цитозоля, что становилось ещё более заметно в стрессовых условиях. Авторы связали это явление с изменениями протеома ЦПМ, которые возникают вследствие изменения состава Ст [234]. В условиях кислого стресса (pH 3.0) мутанты пути синтеза эргостерола также характеризовались разной выживаемостью. Наиболее уязвимыми в данных условиях оказались *erg2Δ*, *erg3Δ* и *erg6Δ*, накапливающие в своей мембране фикостерол, эпистерол и зимостерол, соответственно. Таким образом жёсткость колец в структуре эргостерола, обусловленная наличием в них двойных связей, является определяющим фактором для работы ряда мембранных белков, в т. ч. ионных помп.

Стоит отметить, что взаимосвязь между активностью мембранных транспортёров и липидным спектром ЦПМ может также осуществляться по принципу механизма с обратной связью. Так, на примере дрожжей *Candida glabrata* было показано, что транскрипционный фактор CRZ1, регулирующий транскрипцию гена кальциневрина – Ca<sup>2+</sup>-зависимой АТФазы – определяет не только устойчивость клеток в условиях кислого стресса, но также состав их ЦПМ и обусловленные им её механические свойства [235]. Мутанты *crz1Δ* характеризовались повышенным

содержанием в мембране зимостерола на фоне снижения эргостерола, а ненасыщенность жирнокислотного состава мембранных липидов у этих клеток заметно снижалась в основном за счёт понижения содержания олеиновой (C 18:1) кислоты. Кроме того, у этих мутантов наблюдалось выраженное снижение активности  $H^+$ -зависимой АТФазы в кислых условиях [235].

Влияние жирнокислотного состава мембранных липидов на работу ионных помп ЦПМ было показано и ранее. В 2009 г. Язава и соавт. [236] показали активацию сигнального пути Rim101 при введении в геном *S. cerevisiae* десатураз *FAD2* и *FAD3*. Авторы предположили, что повышение содержания в ЦПМ линолевой и линоленовой кислот определяет функционирование цитоплазматических белков Rim8 и Rim9, активируемых в ответ на смещение внешнего рН в щелочную сторону. Таким образом, содержание в ЦПМ линолевой и линоленовой кислот определяет эффективность работы сигнального пути Rim101, который переключает систему транспорта фосфатов с  $H^+$ -зависимого  $Na^+$ -зависимый механизм, что определяет устойчивость дрожжевых клеток к щелочным условиям [237].

Имеются убедительные данные о влиянии жирнокислотного состава мембранных липидов на устойчивость клеток дрожжей к некоторым другим стрессорам. Например, повышенное содержание олеиновой кислоты обуславливает устойчивость *S. cerevisiae* к этанолу. Предполагается, что увеличение содержания этой моновенасыщенной кислоты на фоне снижения линолевой и линоленовой приводит к компенсации увеличения текучести мембраны в условиях этанольного стресса [238]. Увеличение текучести ЦПМ за счет возрастания содержания в её составе линолевой кислоты также позволило увеличить устойчивость клеток *S. cerevisiae* к осмотическому стрессу, а также замораживанию-оттаиванию. Трансформанты *S. cerevisiae*, в геном которых были встроены десатуразы *FAD2* и *FAD3* подсолнечника продемонстрировали повышенную устойчивость к этим стрессорам при общем увеличении текучести ЦПМ [239].

Состав внутриклеточных мембран, обеспечивающих обособленность отдельных компартментов клетки, также имеет важное значение для устойчивости клеток к различным стрессовым воздействиям. Так, например, Януцевич и соавт.

[240] показали, что стрессовые воздействия различной природы (тепловой и холодовой шок, окислительный и осмотический стрессы) на мицелиальный гриб *A. niger* приводили к значительному возрастанию содержания фосфатидных кислот (ФК) в составе его мембран. Авторы предположили, что вклад ФК в адаптацию гриба к стрессовым воздействиям состоит в увеличении гибкости внутренних мембран клетки. Известно, что ФК являются важными участниками везикулярного транспорта внутри клетки, так как обуславливают способность мембран к слиянию и разрывам. Помимо этого, структуры, образуемые ФК внутри клетки, демонстрируют крайнюю чувствительность к таким параметрам цитозоля как pH, а также концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Так, *in vitro* было показано, что в слабокислых условиях и при увеличении концентраций двухвалентных катионов богатые ФК липидные бислои способны образовать цилиндрические структуры [241].

В состав мембранных липидов различных органелл часто входят специфические классы липидов. Например, кардиолипины (КЛ) – основной липид внутренней мембраны митохондрий. Этот липид, называемый в литературе «ловушкой для протонов» благодаря наличию в полярной части двух отрицательно заряженных фосфатов, а также содержанию в ней большого количества атомов кислорода с избытком электронной плотности, способен удерживать два протона, которые создают электрохимический градиент внутренней мембраны митохондрий и используются в окислительном фосфорилировании [242]. Однако, в 2008 г. Ростовцева и Безруков [243] показали, что участки, богатые КЛ, имеются и во внешней мембране митохондрий. Трансмембранный потенциал, который создают протоны, удерживаемые кардиолипином, необходим для регулирования работы порина VDAC, обеспечивающего транспорт метаболитов через внешнюю мембрану митохондрий. Как было сказано выше, порин обеспечивает выход АФК из митохондрий, что делает его ключевым регулятором сигнальной трансдукции в условиях окислительного стресса и важнейшим звеном в обеспечении защиты клеток против любых стрессовых воздействий.



Таким образом, вклад липидов в ответ дрожжевых клеток на различные стрессоры включает в себя изменения вязкости/текучести мембран, обусловленное содержанием в них Сг и ненасыщенностью жирнокислотных остатков. Кроме того, важное значение имеет наличие в составе мембран специфических компонентов, таких, как ФК и КЛ. Ещё одно важное при адаптации к стрессовым воздействиям свойство липидов – способность связываться с мембранными белками и обеспечивать условия для их правильного функционирования.

Роль мембран и липидов в механизме ответа на ТШ остаётся неясной. Исследование, выполненное как на почкующихся дрожжах, так и на патогенном диморфном грибе *Histoplasma capsulatum*, показало, что соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах определяет, при какой температуре в клетках начинается индукция ответа на ТШ [244]. Принято считать, что ТШ приводит к изменению текучести мембран, при этом упаковка липидов в мембранах, содержащих большее количество насыщенных жирных кислот (ЖК), сильно отличается от таковой в мембранах, имеющих меньшее соотношение С:Н, что сказывается на функционировании мембранных белков, однако, какой именно из мембранных белков может принимать участие в инициации механизма ответа на ТШ при изменении текучести мембраны, на данный момент неизвестно [244].

СФ – это класс мембранных липидов, имеющих в своём составе длинноцепочечные насыщенные углеродные скелеты с гидроксильной и/или аминогруппой на одном конце молекулы. *S. cerevisiae* синтезируют в основном 18-углеродные СФ – дигидросфигнозин и фитосфигнозин, но иногда способны накапливать и 20-углеродные СФ через 5-10 минут после ТШ [245; 246]. Штаммы *S. cerevisiae*, не способные к образованию СФ, оказывались более чувствительными к ТШ, чем дикий тип, однако, внесение в питательную среду СФ корректировало этот фенотип, повышая выживаемость клеток [247].

СФ-основания так же могут выполнять важную посттранскрипционную функцию в ответ на ТШ. Индуцированное ТШ повышение уровня фитосфигнозинов необходимо как для трансляции, так и для убиквитин-зависимого протеолиза, а также для перестройки актинового цитоскелета [248; 249; 250].

## **1.4. Изменения протеома клеток грибов в условиях стресса**

Механизмы изменения протеома крайне разнообразны. Тем не менее, современные алгоритмы накопления и обработки больших данных позволяют сделать осторожные предположения о том, какие изменения протеома можно считать универсальными при адаптации к различным видам стресса. Кроме того, позволяют можно оценить динамику изменений протеома, инициированных теми или иными стрессовыми воздействиями. Ниже будут изложены некоторые аспекты изменений протеома, характерные для реакции на различные виды стресса.

### **1.4.1. Агрегация и секвестрация белков**

Наиболее цитотоксичным эффектом стрессовых воздействия принято считать дестабилизацию белков, приводящую впоследствии к утрате жизненно важными белками своих функций. Оно может быть вызвано как непосредственным влиянием на вторичную и третичную структуру белка в случае ТШ, так и окислительным повреждением в результате повышенной генерации АФК при стрессе. Это явление также имеет такие негативные последствия, как накопление неправильно свёрнутых белков, ингибирующих нормальную работу убиквитин-зависимых протеасом, а также накопление цитотоксичных агрегированных белков [251; 252].

Гомеостаз белков (протеостаз) важнейшая функция клеток, значимость которой возрастает в неблагоприятных условиях. Для реализации этой функции у клеток сформировалась система контроля качества белков (ККБ), представленная рядом шаперонов и протеаз [253].

Кроме того, у эукариот существует механизм, называемый пространственной секвестрацией повреждённых белков. Это процесс заключается в накоплении повреждённых белков в особых агрегатах, где они не могут вызвать повреждения других клеточных структур или нарушения процессов, и откуда затем могут быть выведены без вреда для клеток [254; 255].

Особый интерес вызывает тот факт, что агрегаты, вызываемые тепловым и окислительным стрессами, различны как по структуре, так и по механизму удаления: основной цитозольный Hsp40, Ydj1, необходим для эффективного удаления

агрегатов, образующихся при ТШ, но не является необходимым для удаления агрегатов, возникших при окислительном повреждении [256]. Это может быть объяснено тем фактом, что некоторые шапероны типа 40кДа БТШ, в т.ч. дрожжевой Ydj1, инактивируются во время окислительного стресса путем окисления их богатых Cys доменов цинкового пальца. Кроме того, «тепловые» агрегаты намного менее подвижны, чем «окислительные» [257].

#### **1.4.2. Поиск универсального «стрессового» протеома.**

Изучение транскрипции и трансляции у дрожжей в стрессовых условиях было проведено на микрочипах [258], однако изучение протеома оказалось более сложной задачей, так как протеом контролируется трансляцией и транскрипцией, с одной стороны и протеолитическими процессами – с другой. Попытка наиболее полно оценить изменения протеома дрожжей в стрессовых условиях была предпринята в 2018 г [259]. В этой работе были обобщены результаты 21 исследования, в которых изучались изменения протеома *S. cerevisiae* в различных стрессовых условиях: воздействие гидроксимочевины и метилметансульфоната, окислительный стресс, восстановительный стресс, обработка рапамицином и азотное голодание.

Неожиданно оказалось, что 68% изменений количества белка наблюдались только при одном или двух типах воздействия. Это позволило предположить, что наиболее выраженные явления, связанные с изменением количества белка при адаптации к различным воздействиям, являются специфическими. Лишь шесть белков (Afg3, Rpt6, Isa1, Rax2, Dat1 и Rna1) увеличивали своё содержание в клетках во всех изученных стрессовых условиях. Функции этих белков будут рассмотрены ниже [259].

Afg3 - компонент протеазного комплекса м-ААА, который представляет собой АТФ-зависимую металлопротеазу, опосредующую деградацию несобранных белков внутренней мембраны митохондрий. Комплекс необходим для сборки дыхательной цепи митохондрий и АТФ-азных комплексов [260].

Rpt6 – регуляторная единица 26S протеасомы. Эта протеасома обеспечивает деградацию подавляющего большинства (80–90%) внутриклеточных белков убиквитин-зависимым образом с использованием энергии АТФ [261].

Белок Isa1 – принимает участие в сборке железосерных белков митохондрий и цитоплазмы. У дрожжей этот белок участвует в синтезе *de novo* железосерных кластеров белков электрон-транспортной цепи – ферредоксин редуктазы Arh1 и ферредоксина Yah1 [262].

Белок Rax2 необходим для поляризации дрожжевых клеток [263].

Dat1 - ДНК-связывающий белок, распознающий олиго(А) и олиго(Т)-последовательности [264] Ряд исследований выявили у этого белка свойства регулятора транскрипции генов, содержащих АТ-последовательности в области промотора. Однако достоверных сведений о том, какие именно гены могут подвергаться такой регуляции *in vivo*, не было получено до настоящего времени [265].

Белок Rna1 является специфическим активатором ГТФазы Gsp1. Он заметно ускоряет деградацию в клетках ГТФ - сигнальной молекулы, необходимой для осуществления таких клеточных функций как трансляция, регуляция роста рост микротрубочек, а также функционирование митохондрий [266].

Таким образом, можно предположить, что в стрессовых условиях перед дрожжевой клеткой наиболее остро встаёт вопрос замены повреждённых белков нормально функционирующими, в первую очередь белков митохондрий. Также важное значение имеют регуляция клеточного цикла и поляризация клеток [266].

### **1.4.3. Стрессовый протеом *Yarrowia lipolytica*.**

Ряд исследований протеома в неблагоприятных условиях был проведён и в отношении *Y. lipolytica*. Наиболее изученным с точки зрения протеома является рН-стресс (как кислый, так и щелочной), а также осмотическое воздействие и влияние ксенобиотиков.

Так, влияние кислого стресса на протеом *Y. lipolytica* при производстве  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты изучалось в работе [267]. Белки, содержание которых

сильно повышалось в кислой среде, были поделены на несколько групп, в зависимости от функции, выполняемой в клетках: поддержание внутриклеточного рН-гомеостаза: (1) Atp1p, Atp2p, Atp3p, Atp7p, Cdc48p и Afg1p, которые участвуют во внутриклеточной экструзии протонов и синтезе АТФ; (2) Nuam, Nuem, Nufm, Qcr2p и Sod2p, участвующие в митохондриальной цепи переноса электронов и элиминации АФК; (3) ассимиляция глицерина, включая Pgc1p, Gut2p, Eno2p, Tri1p, Tdh3p, Fba1p и Pck1p; (4) ЦТК - Cit1p, Pda1p, Pdb1p, Mdh1p, Icl1p, Kgd2p и Acs2p; (5) Aat2p, Leu1p, Gcv2p, Sam2p, Met6p, Ilv5p, Ses1p, Gat1p и Shm1p, которые были вовлечены во внутриклеточный метаболизм аспартата, лейцина, изолейцина, валина, серина, метионина и глицина; (6) молекулярные шапероны: Kar2p, Ssep1p и Ssa4p; и (7) порин внешней мембраны митохондрий VDAC, обеспечивающий транспорт небольших метаболитов между цитозолем и митохондриями. Авторы сделали предположение, что в ответ на закисление цитоплазмы активируется синтез АТФ за счёт гиперполяризации мембран. Это влечет за собой усиление генерации АФК, для защиты от которых клеткам необходимы антиоксидантные компоненты и шапероны. Для активации обмена метаболитами между цитозолем и митохондриями в клетках увеличивается содержание VDAC.

Также были изучены изменения протеома *Y. lipolytica* в ответ на щелочной стресс [268]. Было показано, что в щелочных условиях (рН 8,5) в клетках заметно возрастало содержание ряда митохондриальных белков - ферментов матрикса (КДГ, МДГ), белков внешней мембраны (VDAC) и компонентов дыхательной цепи. Кроме того, возрастало содержание цитопротекторных белков – Cu/Zn-СОД, а также пептидилпролил-цис-транс-изомеразы, обладающей свойствами шаперона. Исходя из данных, полученных в этой работе, можно предположить, что механизм адаптации к щелочному стрессу имеет много общего с механизмом адаптации к кислому стрессу. Интересно отметить, что авторам при этом не удалось обнаружить увеличения содержания в клетках Na<sup>+</sup>-зависимой АТФ-азы, которая, предположительно, должна обеспечивать транспорт фосфата при деполяризации ЦПМ при щелочных рН.

Не было обнаружено увеличения содержания этого белка и в работе [269], где изучался ответ со стороны протеома клеток *Y. lipolytica* на осмотический стресс, вызываемый высокой концентрацией NaCl (до 70 г/л). Результаты исследования в целом перекликались с исследованиями pH-адаптации, описанными выше. Среди 55 белков, содержание которых в клетках увеличивалось при осмотическом стрессе, были обнаружены ферменты ЦТК и компоненты дыхательной цепи, антиоксидантные ферменты (в особенности, увеличивалось содержание каталазы), белки теплового шока и ферменты метаболизма углеводов, ответственные за синтез осмолитов.

В работе [270] изучался ответ со стороны протеома *Y. lipolytica* на утилизацию 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ), являющегося токсичным загрязняющим агентом, осложняющим рекультивацию почвы. Для *Y. lipolytica* показана способность к утилизации 2,4,6-ТНТ, что делает данный организм перспективным агентом биоремедиации. Было показано, что при утилизации 2,4,6-ТНТ в клетках *Y. lipolytica* действительно повышалось содержание ряда белков, ответственных за утилизацию этого соединения: НАДН-флавиноксидоредуктазы, НАДН-оксидазы, а также протеин-дисульфид изомеразы. Важно отметить, что помимо ферментов, необходимых непосредственно для утилизации 2,4,6-ТНТ, в клетках повышалось содержание БТШ, а также альгинат-продуцирующих ферментов. НАДФН-хинонредуктаза, катализирующая двухэлектронное восстановление хинонов и нитроароматических соединений, повышалась на стадии максимального накопления комплексов ТНТ в клетках. Кроме того, вторая стадия трансформации ТНТ характеризовалась повышением содержания глутатион-S-трансферазы. На всех стадиях роста на среде с 2,4,6-ТНТ в клетках повышалось содержание антиоксидантных ферментов: СОД, каталазы и диоксигеназы оксида азота (ДОН) [271].

Изложенные выше материалы позволяют предположить, что высокий адаптационный потенциал *Y. lipolytica* обеспечивается, главным образом, способностью этого организма к перестройке протеома митохондрий для эффективного противостояния окислительному стрессу.

### 1.5. Структурная реорганизация грибных клеток в условиях стресса.

Как было показано выше, стрессовые воздействия существенно влияют на различные механические свойства клеточных мембран, что не может не отразиться на их функционировании и морфологии внутриклеточных органелл. Действительно, реорганизация ультраструктуры клеток в стрессовых условиях широко изучалась на клетках растений и животных, однако дрожжевые клетки в этом отношении изучались сравнительно мало.

Одно из пионерских исследований в этой области было проведено на дрожжах *S. cerevisiae*, подвергнутых ТШ в двух режимах: 37°C в течение 30 минут и 52°C в течение 5 минут [272]. Данное исследование выявило появление электрон-плотных (гранулярных) структур в цитоплазме, ядре и митохондриях клеток. Кроме того, авторы отметили уменьшение размера клеток в стрессовых условиях. Подобные явления были выявлены как для животных, так и для растительных клеток в условиях ТШ, однако, в клетках дрожжей эти изменения проявлялись в гораздо меньшей степени. Авторы связали появление гранул в цитозоле и митохондриях с денатурацией цитоплазматического белка в результате ТШ и, как следствие, закисления цитозоля.

Впоследствии такие явления, как изменение размера клеток, структуры митохондрий и ядра были показаны в ответ на другие виды стресса. Так, в работе [272] было изучено влияние различных концентраций этанола на ультраструктуру дрожжей *S. cerevisiae*. В этом исследовании было показано, что уже при небольших концентрациях этанола (2,5 и 5%) наблюдается расслоение ЦПМ и клеточной стенки. ЦПМ при этом образует глубокие инвагинации. Кроме того, уже при низких концентрациях этанола в клетках *S. cerevisiae* отмечается набухание крист митохондрий – один из характерных признаков апоптоза [273]. Наконец, низкие концентрации этанола приводили к заметной вакуолизации клеток. Более высокие концентрации этанола (7,5 – 10%) приводили к истончению клеточной стенки вплоть до нарушения её целостности. Набухание или видоизменение митохондрий в ряде клеток становилось более выраженным. При приближении концентрации этанола к летальной (15%) в клетках дрожжей отмечалось изменение формы ядра.

Ещё одно важное наблюдение касалось уменьшения размера клеток на 10-15% под воздействием высоких концентраций этанола. Это явление наблюдалось у клеток, подверженных воздействию этанола в концентрациях 7,5 – 10% через 8 часов, а при приближении его концентрации к летальной – уже через 1 час. Стоит отметить, что изменения размера клеток в условиях этанольного стресса могут происходить как в сторону уменьшения [274], так и в сторону увеличения [275]. Появление увеличенных вакуолей в клетках под воздействием сублетальных концентраций этанола авторы связали с возможной митофагией повреждённых митохондрий, что подтверждалось наличием в вакуолях некоторых клеток везикул, содержащих повреждённые митохондрии [276].

Аналогичные изменения были показаны и для дрожжей *D. magnusii*, окислительный стресс в которых был вызван ингибированием ферментов первой линии защиты против АФК [277]. В этой работе было показано, что данное стрессовое воздействие приводит к таким изменениям структуры клетки, как повреждение целостности цитоплазматической мембраны и увеличение размера вакуолей. Кроме того, в данных условиях у клеток наблюдались характерные признаки апоптоза – набухание митохондрий и маргинация ядерного хроматина – смещение хроматина от центра ядра к периферии.

Наконец, изменения ультраструктуры дрожжевой клетки в различных стрессовых условиях (окислительный стресс, инициированный внесением перекиси водорода; этанольный стресс и ТШ) тщательно изучались на модели дрожжей *Y. lipolytica* [278]. В данной работе было показано, что в мягких стрессовых условиях, т.е. после экспозиции с малой дозой прооксидантов (0.5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) или этанола (5%), а также умеренного ТШ (37°C, 60 мин), в клетках увеличивалось количество пероксисом, располагающихся по периферии цитоплазмы. Митохондрии при этом увеличивались, их матрикс уплотнялся, наблюдалось увеличение количества крист. После любого из указанных стрессовых воздействий в клетках появлялись крупные липидные включения, кроме того, имело место изменение структуры поверхности клеточной стенки. В случае окислительного стресса или ТШ на поверхности клеточной стенки происходило появление множества глобулярных структур



неизвестной природы. В случае этанольного стресса ЦПМ клеток образовала выраженные глубокие инвагинации, глобулярные структуры на поверхности при этом отсутствовали. Такие же изменения организации оболочки отмечались у клеток, выращенных на этаноле. Наиболее важной чертой ультраструктуры клеток в стрессовых условиях стали электронплотные гранулы, имеющих высокое структурное сходство с внутриклеточными гранулами полифосфатов [278]. На основании полученных ранее данных авторы предположили, что ответ клеток на стрессоры различной природы носит неспецифический характер и служит, главным образом, цели защиты против окислительного стресса – неизбежного следствия любого стрессового воздействия.

Таким образом, можно заключить, что вне зависимости от природы стресса и вида дрожжей, подверженного ему, реорганизация ультраструктуры клеток в ответ на стресс включает в себя, главным образом, увеличение размера и количества митохондрий, видоизменение их структуры, вакуолизацию клеток, изменения морфологии ЦПМ и клеточной стенки. Кроме того, часто отмечается появление в вакуолях и цитоплазме клеток различных гранулярных включений. Стоит также отметить частые изменения размера клеток в ответ на стресс, как в сторону увеличения, так и уменьшения. На данный момент нельзя однозначно ответить, какие из этих изменений являются проявлением защитных механизмов клетки, а какие – свидетельством патологических процессов, протекающих в них.

Проведённый выше обзор литературы показывает, что механизмы адаптации, защищающие клетки дрожжей от различных неблагоприятных воздействий среды сложны и многообразны и затрагивают огромное количество метаболических путей, обслуживающих почти все жизненные процессы клетки. Однако, до настоящего времени остается неясным, существует ли универсальный коровый механизм адаптации клеток *Y. lipolytica* к любым неблагоприятным воздействиям и в чём принципиальные различия адаптации клеток *Y. lipolytica* к острым и хроническим воздействиям неблагоприятных факторов. Наиболее вероятным представляется, что ответ на все эти вопросы лежит в области пересечения сигнальных путей клетки, ответственных за те или иные адаптационные изменения.

В представленной работе проведена комплексная оценка изменений липидной и углеводной композиции клеток, изменений протеома, изменений редокс-статуса клеток, а также их морфологии и параметров роста культур *Y. lipolytica* W29 при адаптации к неблагоприятным значениям pH среды культивирования, повышенной температуре, а также совместному воздействию этих факторов. Комплексный подход к оценке этих параметров, а также тщательный анализ имеющихся литературных данных позволят ответить на эти вопросы, дадут возможность значительно приблизиться к их разрешению и существенно дополнить наши знания об адаптивном потенциале дрожжей *Y. lipolytica* W29.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Методы поддержания культуры дрожжей *Y. lipolytica*.

В работе был использован штамм дикого типа дрожжей *Y. lipolytica* W 29, полученный из коллекции типовых штаммов CIRM-Levures (Франция). Для проведения дальнейших экспериментов культуры дрожжей выращивали на синтетической среде YNB следующего состава (г/л):  $MgSO_4$ ; - 0.5,  $(NH_4)_2SO_4$  – 0.3;  $KH_2PO_4$ - 2;  $K_2HPO_4$  – 0.5; NaCl – 0.1;  $CaCl_2$  – 0.05; глицерин - 7.5; дрожжевой экстракт – 2. Значение pH среды доводили до требуемого при помощи KOH или  $H_2SO_4$  – по показаниям pH-метра.

В качестве микронутриентов в среду добавляли:

1) микроэлементы (мг/л): KI – 0.2;  $CuSO_4 \times 5H_2O$  – 0.08;  $MnSO_4$  – 0.08;  $FeCl_3 \times 6H_2O$  – 0.4;  $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$  – 0.4;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0.08;  $H_3BO_3$  – 1.0; биотин – 0.02 мкг/л; фолиевая кислота – 0.02 мкг/л;

2) витамины (мг/л): пантотенат кальция – 0.6; инозит – 3; никотиновая кислота – 0.6; пара-аминобензойная кислота – 0.3; пиридоксин-HCl – 0.6; рибофлавин – 0.3; тиамин-HCl – 0.15.

Долгосрочное поддержание культур, а также опыты по определению выживаемости клеток проводили на плотных средах следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 2; пептон – 5; солодовый экстракт – 3; глицерин – 7.5; агар-агар – 20; Значение pH среды доводили до требуемого при помощи KOH или  $H_2SO_4$  – по показаниям pH-метра.

Для накопления биомассы использовалась следующая схема: первичное накопление биомассы проводилось на скошенном агаре с соответствующим значением pH (5.5 или 9.0) и при соответствующей температуре (29°C или 38°C). Посев инокулята на жидкую среду проводился микробиологической петлёй, затем инокулят выращивали в качалочных колбах Эрленмейэра объёмом 750 мл,

содержащих 100 мл жидкой среды, при скорости аэрации 180 об./мин. и соответствующей температуре. Инокулят выращивали до перехода культуры в стационарную стадию роста, после чего использовали его для засева рабочих культур. Инокулят хранили при +4°C не более месяца.

Посев рабочих культур проводили с инокулята, который вносили в питательную среду в объёме 1% от количества среды. Рабочие культуры выращивали на жидкой среде с соответствующим значением pH (5.5 или 9.0) и при соответствующей температуре (29°C или 38°C) в качалочных колбах Эрленмейера объёмом 750 мл, содержащих 100 мл жидкой среды, при скорости аэрации 180 об./мин. Накопление биомассы проводили до стационарной стадии роста.

Для проведения физиологических экспериментов использовалась следующая матрица условий: в качестве оптимальных условий культивирования использовали значения pH 5.5 и температура 29 °C. Культуру клеток *Y. lipolytica*, выращенную в этих условиях, использовали в качестве контроля. Щелочной стресс моделировали при pH 9.0 и температуре 29°C. Тепловой стресс моделировали при температуре 37°C и pH среды 5.5. Комбинированное стрессовое воздействие моделировали при температуре 37°C и pH 9.0.

## **2.2. Методы оценки выживаемости клеток.**

### **2.2.1. Метод Коха.**

Оценка выживаемости клеток, выращенных в различных условиях, проводилась методом Коха на плотных средах. Для оценки выживаемости применялась плотная среда с pH 5.5, разлитая по 10 мл в чашки Петри диаметром 90 мм. Исходную культуру клеток разводили в стерильной дистиллированной воде в  $10^4$ ,  $10^5$  и  $10^6$  раз, после чего стерильно отбирали по 0.1 мл каждого разведения и вносили на чашки Петри. Внесённую суспензию растирали стерильным шпателем Дригальского до впитывания. Для каждой точки использовали по 3 чашки Петри. Чашки инкубировали при 29°C, количество выросших колоний подсчитывали на третьи сутки. В расчет принимались те чашки, на которых выросло от 10 до 200

колоний. После этого пересчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 л исходной суспензии с учётом разведения и сопоставляли результат с полученным для контрольной культуры клеток. Выживаемость выражали в % от контроля [279].

### **2.2.2. Спот-тест**

Для визуализации выживаемости клеток использовали спот-тест. Исходную культуру клеток разводили в стерильной дистиллированной в воде в  $10^3$ ,  $10^4$  и  $10^5$  раз, после чего стерильно отбирали семплером 0.01 мл каждого разведения и вносили точно на чашки Петри, не менее 5 капель каждого разведения на одну экспериментальную точку. Чашки инкубировали при 29°C. Фотографирование чашек с колониями и подсчет КОЕ проводили через 18 часов после посева, когда отдельные колонии из каждой внесенной капли ещё были хорошо различимы [279].

### **2.2.3. Проточная цитометрия с окрашиванием иодистым пропидием**

Выживаемость клеток оценивали методом проточной цитометрии с окрашиванием иодистым пропидием. Для этого клетки осаждали в микроцентрифужных пробирках «Eppendorf», отмывали в натрий-фосфатном буфере (PBS) от культуральной жидкости, разводили PBS до ОП > 0.05, затем окрашивали иодистым пропидием в конечной концентрации 5 мкг/мл в течение 30 мин. [279]. В качестве положительного контроля использовали клетки, выдержанные при 100°C в течение 5 минут. Измерения проводили на проточном цитометре «CytoFLEX S» («Beckman Coulter», США) с облучением синим лазером (488 нм) и каналом флуоресценции 585 нм.

## **2.3. Методы микроскопии.**

### **2.3.1. Световая микроскопия**

Световая микроскопия препаратов «раздавленная капля» проводилась при помощи светового микроскопа «Micros MC 50 X» (Австрия) с цифровой камерой DCM 130 E и программным обеспечением «ScopePhoto» (Австрия) при увеличении  $\times 1000$  с масляной иммерсией.

### 2.3.2. Окрашивание клеток флуоресцентными красителями.

Для окрашивания клеток флуоресцентными красителями клетки осаждали центрифугированием при 2000 g и дважды промывали PBS.

**Окрашивание MitoTracker™ RED CMXRos.** Для приготовления рабочего раствора с концентрацией 1 мМ краситель MitoTracker™ RED CMXRos («Life Technologies, США») 50 мкг растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Стоковый раствор хранили в течение 6 месяцев при температуре -20°C. Для приготовления рабочего раствора, стоковый раствор разводили 1:1 солевым буфером Хэнка (HBSS). Далее клеточный осадок ресуспендировали в предварительно нагретом до 37°C, рабочем растворе MitoTracker™ RED CMXRos. Затем инкубировали клетки при 37°C в течение 30 мин. После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием при 2000 g, промывали однократно HBSS и наносили на предметное стекло. Микроскопию проводили на флуоресцентном микроскопе «Axioskop 40 FL fluorescence microscope» (Zeiss, Германия) с увеличением 40×10 и 100×10 и фильтрами возбуждения/поглощения 560/645 нм.

**Окрашивание DAPI.** Окрашивание хроматина проводили флуоресцентным красителем DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол), («Sigma-Aldrich», США). Для этого клетки сначала фиксировали в 70% этаноле, после чего высушивали на предметном стекле в течение 30 мин. После этого на зафиксированный препарат наносили каплю PBS, содержащего DAPI в количестве 50 мкг/мл, закрывали покровным стеклом и инкубировали 15-20 мин. в темноте. После этого препарат дважды промывали дистиллированной водой под стеклом при помощи фильтровальной бумаги. Микроскопию проводили на флуоресцентном микроскопе «Axioskop 40 FL fluorescence microscope» (Zeiss, Германия) с увеличением 40×10 и 100×10 и фильтрами возбуждения/поглощения 330/400 нм.

Для двойного окрашивания MitoTracker™ RED CMXRos и DAPI клетки сначала прижизненно окрашивали красителем MitoTracker RED CMXRos в соответствии с приведенной выше методикой, после чего промывали

дистиллированной водой, фиксировали на предметном стекле, как указано выше, а затем окрашивали DAPI.

### **2.3.3. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).**

Препараты для ТЭМ готовили следующим образом: клетки центрифугировали при 2000 g, дважды промывали дистиллированной водой, осажденные клетки переносили для фиксации в 2.5 % раствор глутарового альдегида в PBS и выдерживали в течение часа при 4°C, затем трижды промывали PBS и дополнительно фиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> в PBS в течение 3 ч при 20°C. Затем клетки обезвоживали этанолом и заключали в эпоксидную смолу Epon 812 («Sigma»). Срезы выполняли на ультратоме LKB-8800 с использованием алмазных ножей, монтировали на опорные сеточки, контрастировали в течение 30 мин в 3% растворе уранилацетата в 70% этаноле и дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу [280]. Исследование проводили на электронном микроскопе JEM-100B и U12 (Hitachi, Япония) с увеличением в ×24000 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

### **2.3. Методы определения углеводного и липидного состава клеток.**

Для определения углеводного и липидного спектра клеток, оценки изменений протеома, а также приготовления клеточных экстрактов с целью оценки вклада отдельных компонентов в антиоксидантную защиту клеток биомассу подготавливали следующим образом: культуру *Y. lipolytica* выращивали до стационарной стадии роста, после чего биомассу осаждали при 2000 g, дважды промывали дистиллированной водой, затем обводнённый осадок биомассы отжимали вручную на фильтровальной бумаге, из подсушенного осадка формировали рассыпчатые пеллеты. При необходимости биомассу хранили в замороженном виде при -70°C.

### 2.3.1. Определение углеводного спектра клеток.

Экстракцию сахаров из биомассы проводили кипящей водой в течение 20 мин четырехкратно, из полученного экстракта удаляли белки [281]. Дальнейшую очистку экстракта углеводов от заряженных соединений проводили, используя комбинированную колонку с ионообменными смолами Dowex-1 (ацетатная форма) и Dowex 50W (H<sup>+</sup>), состав углеводов определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), получая из лиофильно высушенного экстракта триметилсилильные производные сахаров [282], В качестве внутреннего стандарта использовали *α*-метил-*D*-маннозид («Merck», США), Хроматографирование проводили на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000,1 (ЗАО «Хроматек», Россия) на капиллярной колонке ZB-5 30 м, 0.32 мм, 0.25 мкм («Phenomenex», США) с применением температурной программы от 130 до 270°C со скоростью 5-6 град/мин. В качестве метчиков использовали глицерин, глюкозу, маннит, арабит, инозит, трегалозу («Sigma», США).

### 2.3.2. Определение липидного состава клеток.

Экстракцию липидов из биомассы дрожжей проводили методом Николса [283]. Навеску клеток (около 1 г) растирали с песком и изопропанолом для дезактивации липаз и выдерживали при 70°C в течение 30 мин, далее остаток повторно растирали с песком и экстрагировали двукратно смесью изопропанол: хлороформ (1 : 1) и (1 : 2) в тех же условиях. Объединенный экстракт упаривали на ротаторном испарителе, липиды растворяли в смеси хлороформ : метанол (1:1), для удаления водорастворимых веществ к экстракту добавляли 2.5 % раствор хлорида натрия. После разделения смеси на вортексе хлороформный слой осушали пропусканием через безводный сульфат натрия, упаривали и досушивали в вакууме до постоянной массы. Полученный остаток растворяли в небольшом количестве смеси хлороформ:метанол (1:1) и хранили при -21°C.

Состав нейтральных липидов анализировали методом восходящей тонкослойной хроматографии ТСХ на стеклянных пластинках с силикагелем 60



(«Merck», Германия), Для разделения нейтральных липидов пользовались системой растворителей гексан:серный эфир:уксусная кислота (85:15:1) [284], разделение фосфолипидов и СФ проводили с помощью двумерной ТСХ на стеклянных пластинах (Merck, Германия) в системе растворителей - хлороформ:метанол:вода (65:25:4) – первое направление, хлороформ:ацетон:метанол:уксусная кислота:вода (50:20:10:10:5) – второе направление [284]. На пластинку наносили 100-200 мкг липидов; гликоцерамиды бычьей сыворотки, использованные в качестве стандарта для СФ, и фосфатидилхолин (ФХ) для фосфолипидов, наносили на хроматограммы перед их пропусканием во втором направлении, СФ наносили в количестве 5 и 10 мкг, ФХ – в количестве 10 и 20 мкг, Хроматограммы опрыскивали 5 % серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием до 180°C до проявления пятен. Для идентификации фосфолипидов использовали индивидуальные метчики и качественные реакции с нингидрином (на наличие аминогруппы), реактивом Драгендорфа (на холин содержащие ФЛ) и  $\alpha$ -нафтолом (на гликолипиды). Для установления СФ природы гликолипидов использовали метод омыления [285]. Нейтральные липиды идентифицировали с помощью индивидуальных метчиков: МАГ, ДАГ и ТАГ, свободных жирных кислот (СЖК), Ст (эргостерина), углеводов («Sigma», США), Количественный анализ липидов проводили с использованием денситометрии и компьютерной программы Dens («Ленхром», Россия) в режиме прямой аппроксимации по калибровочным кривым на основе стандартных растворов ФХ («Sigma», США), гликоцерамидов («Larodan», Швеция), эргостерина («Sigma», США) и ТАГ («Larodan», Швеция),

Для анализа жирнокислотного состава отдельные фосфолипиды выделяли хроматографически с двух пластинок, элюировали в течение ночи в смеси хлороформ:метанол (1:1), супернатант декантировали, выпаривали, добавляли 1 мл толуола и 2 мл 2.5 %  $H_2SO_4$  в метаноле и выдерживали в течение 2 ч при 70°C. Метилвые эфиры жирных кислот экстрагировали гексаном, сушили и анализировали на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000,1 (ЗАО «Хроматек», Россия) на капиллярной колонке Optima-240-0.25 мкм 60м 0.25 мм

(«Macherey-Nagel GmbH&Co», Германия). Для хроматографирования применяли температурную программу от 130 до 240°C, идентификацию проводили с использованием смеси метчиков индивидуальных метиловых эфиров жирных кислот Supelco 37 Component FAME Mix (США).

#### **2.4. Анализ протеома клеток.**

Для анализа изменений протеома клеток замороженную биомассу растирали в ступке с жидким азотом, экстракцию белков проводили лизис-буфером следующего состава (на 100 мл воды): мочевины – 57 г; Triton X-100 – 2 г; меркаптоэтанол – 5 г. Предварительную оценку качества препаратов проводили электрофорезом в пластинах полиакриламидного геля (ПААГ) (200×200×1 мм) с линейным градиентом концентрации акриламида 7.5-25% и в присутствии 0,1% SDS на приборе для вертикального электрофореза фирмы Helicon (Россия). С края каждой пластины формировали карман для нанесения белков-маркеров. Для визуализации белков пластины ПААГ окрашивали кумасси голубым R-250 и затем азотнокислым серебром по методу [286] (в раствор для окрашивания дополнительно вносили тиосульфат натрия до концентрации 0.8%).

##### **2.4.1 Двумерный электрофорез по О'Фарреллу**

Фракционирование в первом направлении представляло собой изоэлектрофокусирование в стеклянных трубках, заполненных 4% ПААГ, приготовленным на 9 М растворе мочевины, содержащем 2% тритона X-100 и 2% смеси амфолинов. В основных экспериментах использовали амфолины рН 5-7, 5-8 и 3.5-10 в соотношении 4:1, а для уточнения распределения белков в краевых зонах в отдельных экспериментах применяли вместо амфолинов рН 5-7 амфолины рН 4-6 или рН 7-9 в том же соотношении. Белковые экстракты (от 100 до 150 мкл) наносили на «кислотный» край геля и проводили изоэлектрофокусирование в приборе фирмы BioRad Model 175 (США), до достижения 2400 вольт/час суммарно на каждую колонку ПААГ. Затем колонки ПААГ с разделенными в ходе изоэлектрофокусирования белками использовали в качестве стартовой зоны при

фракционировании во втором направлении, которое проводили электрофорезом в пластинах ПААГ (200×200×1 мм) с линейным градиентом концентрации акриламида 7.5-25 % и в присутствии 0.1% SDS на приборе для вертикального электрофореза фирмы Helicon (Россия). С края каждой пластины формировали карман для нанесения белков-маркеров. Другие детали использованной модификации двумерного электрофореза по О'Фарреллу выполняли как описано ранее [286; 287, 288]. Для визуализации белков пластины ПААГ окрашивали Кумасси голубым R-250 и затем азотнокислым серебром по модифицированному методу [286]. Гель-документацию полученных двумерных электрофореграмм (а в некоторых случаях и их отдельных фрагментов) проводили методом сканирования на сканере «Epson expression 1680» и с помощью цифровой фотокамеры Nikon 2500, а денситометрию - используя компьютерную программу «Melanie» («GeneBio», Швейцария) по протоколу фирмы-производителя.

Молекулярные массы белковых фракций, полученных двумерным электрофорезом, определяли по их электрофоретической подвижности во втором направлении в сопоставлении с белками-маркерами стандарта [286; 287, 289]. Результаты определения подтверждали и при необходимости корректировали по калибровочной кривой, построенной с использованием набора высокоочищенных рекомбинантных белков с молекулярными массами от 10 до 200 кДа («Fermentas», #SM0661) [290]. Изоэлектрические точки (pI) белковых фракций определяли по их электрофоретической подвижности в первом направлении, как описано ранее [286; 287, 291]. Теоретические значения  $M_m$  и pI рассчитывали с помощью программы библиотеки функций «Biopython» [292] для языка программирования «Python 3.10», используя сведения об аминокислотных последовательностях соответствующих белков по базе данных Swiss-Prot с учетом указаний по удалению при посттрансляционном созревании инициаторного метионинового остатка и/или различных сигнальных последовательностей.

## **2.4.2 Идентификация белков масс-спектрометрией**

Выделение белковых фракций на пластинах ПААГ, гидролиз трипсином и экстракцию пептидов для идентификации белков с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF) проводили согласно протоколам [293] с некоторыми модификациями. Образец (0.5 мкл) смешивали на мишени с таким же объемом раствора 20%-ого ацетонитрила, содержащего 0.1% трифторуксусной кислоты и 20 мг/мл 2,5-дигидроксибензойной кислоты («Sigma», США), и высушивали на воздухе. Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Reflex III («Bruker», США) с УФ –лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500-8000 Да и калибровали их, используя известные внутренние стандарты.

При MS/MS анализе масс-спектры фрагментов регистрировали на MALDI-TOF масс-спектрометре «Bruker Ultraflex» в тандемном (TOF-TOF) режиме при детекции положительных ионов. Фрагментация ионов индуцировалась подачей гелия в область начального участка траектории свободного дрейфа ионов (давление инертного газа  $2 \times 10^{-7}$  Па). Погрешность измерения масс фрагментов не превышала 0.05 %. На масс-спектре присутствовали только сигналы C - концевых фрагментов белков, претерпевших разрыв по пептидной связи (y-ионы).

Идентификацию белков проводили с помощью программы «Mascot», опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США), с точностью определения массы  $MH^+$ , равной 0.01% (допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионинов), и по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI, адрес: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и «Uniprot» (<https://www.uniprot.org>).

## **2.5. Анализ параметров редокс-статуса клеток.**

Активность ферментов измеряли в экстрактах клеток. Для приготовления экстракта биомассу дрожжей осаждали при 2000 g, дважды промывали дистиллированной водой, затем обводнённый осадок биомассы отжимали вручную

на фильтровальной бумаге. Отжатую биомассу растирали в ступке с жидким азотом, после чего ресуспендировали 0.5 М калий-фосфатным буфером с рН 7.2, после чего клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 20000g в течение 20 минут с охлаждением до 4°C. Для дальнейших исследований использовали супернатант.

### **2.5.1. Исследование активности СОД.**

Активность СОД определяли непрямым методом, измеряя ингибирование автоокисления кверцетина при ОП<sub>406</sub> как описано в работе [294]. Кверцетин представляет собой окрашенное соединение с максимумом поглощения при 406 нм, которое автоокисляется в щелочных условиях (рН 10.0). О динамике этого процесса можно судить по падению оптической плотности реакционной смеси при пропускании через неё пучка света с указанной длиной волны. Реакционная смесь для анализа активности СОД содержала 1990 мкл 20 мМ калий-фосфатного буфера с 130 мкМ ЭДТА, рН которого доводили до 10,2 N,N,N,N-тетраметилэтилендиамином («Reagent», Венгрия) и 10 мкл клеточного экстракта. Реакцию запускали добавлением кверцетина («Реахим», СССР) до конечной концентрации 10<sup>-5</sup> М. Измерение оптической плотности реакционной смеси проводили на плейтридере «Stat Fax 2100», («Awareness Technology», США). За 100 %-е автоокисление принимали автоокисление кверцетина в рабочем растворе без добавления клеточного экстракта. Для большей точности реакцию проводили в градиенте разведений клеточного экстракта от 1:5 до 1:100. За единицу ферментативной активности СОД принимали 50%-е ингибирование автоокисления кверцетина за 20 мин протекания реакции. Истинным значением считали такое, при котором достигался ненулевой результат ингибирования автоокисления кверцетина при максимальном разведении клеточного экстракта. Стандартизацию активности фермента проводили по массе белка, содержащегося в клеточном экстракте.

### **2.5.2. Определение суммарной каталазной активности.**

Суммарную каталазную активность определяли по скорости расщепления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [295]. Измерения скорости реакции проводили на спектрофотометре «СФ-

2000» (ОКБ «Спектр», Россия). Реакцию проводили в кварцевой кювете объемом 3 мл в среде, содержащей 20 мМ калий-фосфатный буфер с 130 мкМ ЭДТА, рН 7.0. Падение концентрации перекиси водорода оценивали фотометрическим методом при длине волны 240 нм через каждые 10 с, в течение 1 мин после запуска реакции. Скорости реакции определяли, рассчитывая зависимость оптической плотности при 240 нм от времени реакции на начальном линейном участке кривой падения концентрации  $H_2O_2$ . Каталазную активность выражали в микромолях расщепленной  $H_2O_2$  в мин на 1 мг белка.

### **2.5.3. Получение электрофоретических профилей каталазы и СОД в ПААГ.**

Нативный электрофорез проводили на пластинах размером 11×11см в градиентном ПААГ (5–20% ПААГ) в трис-НСl буфере; рН 8.8, как описано в работе [296].

*Изоформы каталазы* проявляли в реакции  $H_2O_2$  с  $Fe^{3+}$ , как описано в работе [297].

*Изоформы СОД* проявляли следующим образом: гель инкубировали в водном растворе нитросинего тетразолия, («Reagent», Венгрия), (1 мг/мл) в темноте в течение 20 мин, затем дважды промывали водой и переносили в раствор, содержащий 20 мМ калий-фосфатный буфер; рН 10.2, 0.8 мМ ТМДА, 1 мг рибофлавина («Sigma-Aldrich», США) в 100 мл среды, и проявляли на свету в течение 1 ч до проявления светлых полос на темном фоне.

В качестве метчиков ферментативных активностей использовали очищенные ферментные препараты: каталазу из *A. Niger* («Sigma-Aldrich», США), и СОД из эритроцитов быка («Sigma-Aldrich», США).

#### **2.5.4. Исследование содержания в клетках восстановленной и окисленной форм глутатиона.**

Клетки дрожжей разрушали растиранием в жидком азоте, и переносили в 0.1 М калий-фосфатный буфер; рН 8.0, в соотношении 1:5. Белки осаждали внесением равного объема 5% метафосфорной кислоты («Реахим», СССР), выдерживая смесь в течение 20 мин на льду. Далее экстракты центрифугировали (с охлаждением 20 мин, 15 000 g). В полученных супернатантах, разведенных в 10 раз 0.1 М калий-фосфатным буфером; рН 8.0, определяли содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона. Для определения содержания глутатиона в кварцевую кювету объемом 3 мл вносили 100 мкл исследуемого экстракта и ортофталевый альдегид («Fluca analytical», Германия) до конечной концентрации 0.3 мкМ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Глутатион определяли, фиксируя спектр испускания в диапазоне длин волн 350-500 нм при облучении волной длиной 290 нм, на спектрофотометре «Shimadzu RF 5301 PC» («Shimatsu», Япония). О концентрации восстановленной формы глутатиона судили по площади под кривой спектра испускания, которую определяли методом прямоугольников. Определение окисленной формы глутатиона проводили аналогичным образом в 0.1 М NaOH. Исходные экстракты перед измерением были разведены в 10 раз в 0.1 М NaOH с добавлением 1.6 мМ N-этилмалемида («Sigma-Aldrich», США). Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин с целью стабилизации окисленной формы глутатиона. Для измерения концентраций восстановленной и окисленной форм глутатиона в каждой серии экспериментов строили калибровочные кривые с диапазоном концентраций 1-10 мкг/мл, для чего были использованы восстановленная форма глутатиона («Serva», Германия) и окисленная форма глутатиона («Reagent», Венгрия).

Полученные количественные значения стандартизовали относительно сухой биомассы, для этого по 0.5 мл первичного клеточного экстракта (до осаждения белков) вносили в предварительно взвешенные стеклянные бюксы на 5 мл, после чего сушили биомассу до постоянной массы при 90°C, охлаждали бюксы в

эксикаторе и повторно взвешивали. Затем по разнице масс определяли количество сухой биомассы в первичном экстракте или суспензии клеток.

#### **2.5.5. Исследование активности ферментов глутатионовой системы.**

Активность ГЛР определяли по скорости окисления НАДФН, которая регистрировалась спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм на спектрофотометре «СФ-2000» (ОКБ «Спектр», Россия). В спектрофотометрическую кювету с расстоянием между рабочими гранями 10 мм последовательно вносили 2.7 мл 0.2 М калий-фосфатного буфера, содержащего 130 мкМ ЭДТА; рН 7.5, 0.1 мл 0.1 мМ раствора НАДФН («Reagent», Венгрия). Реакцию запускали добавлением в пробу и 0.1 мл 0.5 мМ раствора GSSG («Reagent», Венгрия). Смесь тщательно перемешивали стеклянной палочкой. Изменение оптической плотности регистрировали в течение трёх минут через каждые 15 секунд после внесения окисленного глутатиона. Активность выражали в мМ НАДФН в минуту на 1 мг растворённого белка.

Активность ГПД измеряли по скорости сопряжённой реакции восстановления окисленного глутатиона. Реакционная смесь при этом содержала 0.1 М восстановленного глутатиона, 0.1 М  $H_2O_2$ , 0.1 мМ НАДФН и 28 U ГЛР («Sigma-Aldrich», США). Реакция запускалась внесением НАДФН. В результате реакции GSH окислялся ГПД с образованием окисленной формы, акцептором электронов при этом выступала перекись водорода. Одновременно с этим процессом происходила сопряжённая реакция восстановления окисленной формы избытком ГЛР с использованием НАДФН в качестве донора. Скорость этой реакции измерялась фотометрически, как описано выше [298].

#### **2.5.6. Исследование уровня АФК в клетках.**

Общее содержание АФК в клетках определяли цитометрическим методом с использованием флуоресцентного красителя эфира дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата (ДФХДА,  $H_2DCFDA$ ), («Sigma-Aldrich», США). В клеточную суспензию дрожжей, разведенную PBS-буфером в соотношении 1:2,



добавляли 4 мМ раствор ДФХДА в ДМСО до конечной концентрации 40 мкМ и экспонировали в течение 30 мин в темноте, после чего дважды промывали буфером того же состава. В качестве «положительного контроля» использовались клетки дрожжей, обработанные в 600 мкМ растворе прооксиданта 2,2'-азобис-(2-метилпропионамидин)-дигидрохлорида (АМПА, ААРН), («Sigma», США). Суспензии окрашенных клеток разводили PBS-буфером до ОП > 0.05 и вносили по 200 мкл в лунки 96-луночных планшетов для флуориметрии. Измерения проводили на проточном цитометре «CytoFLEX S» («Beckman Coulter», США) с облучением синим лазером (488 нм) и каналом флуоресценции 525 нм. Об уровне АФК в клетках судили по медианной флуоресценции популяции (в О.Е.Ф./ «эвент») клеток через 45 минут после внесения оксиданта в положительный контроль [299].

#### **2.5.7. Исследование скоростей клеточного дыхания.**

*Скорости потребления клетками кислорода* исследовали полярографическим методом, используя многоканальную микроэлектродную установку с системой сбора информации и программой «Record-4» (рабочий объем ячейки 1.0 мл). Исследования дыхательной и фосфорилирующей активности проводили в среде исследования (конечный объем 1 мл). В ячейку добавляли 1 % глюкозы, 10-20 мкл клеточной суспензии в калий-фосфатном буфере; рН 6.5. Скорость потребления кислорода выражали в нг-атом кислорода/мин на мг сухой биомассы.

*Ингибиторный анализ клеточного дыхания* проводили следующим образом: к дышащей суспензии клеток добавляли ингибитор терминальной цитохромоксидазы - KCN («Реахим», СССР) в концентрации 1-4 мМ. Расчёт % ингибирования проводили в аналитической программе «Analyse Record-4» по отношению к скорости дыхания без KCN. При неполном ингибировании к суспензии добавляли 2 мМ ингибитор АО салицилгидроксамат («Reagent», Венгрия), и высчитывали вклад цианид-нечувствительного дыхания (активность АО в нг-атом кислорода/мин на мг сухой биомассы).

## **2.6. Измерение содержания белка по методу Бредфорд.**

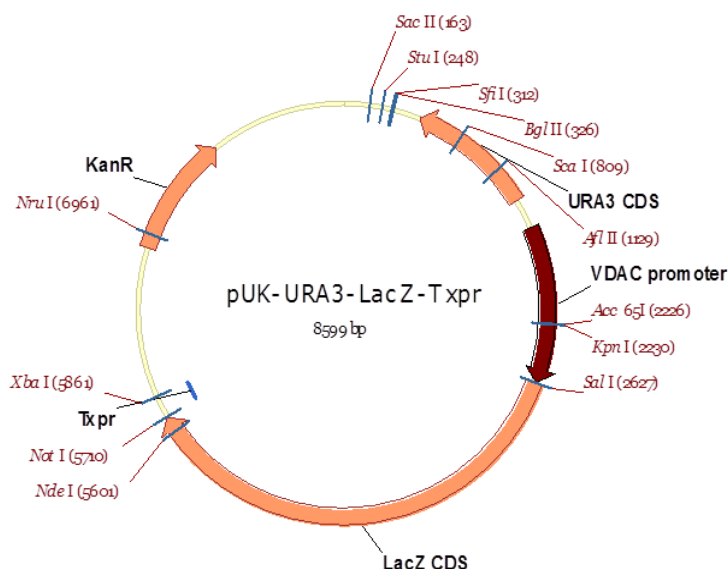
Измерение содержания белка в клеточных экстрактах проводили по методу Бредфорд [300] с Кумасси G-250. Раствор Кумасси готовили растворением 10 мг кумасси G-250 в 5 мл 95% этанола в течение 12 часов, после чего к раствору добавляли два объёма ортофосфорной кислоты, тщательно перемешивали, доводили объём до 100 мл дистиллированной водой и перемешивали еще в течение получаса. Перед использованием раствор фильтровали.

*Для построения калибровочных кривых* в качестве стандарта использовали препарат бычьего сывороточного альбумина высокой степени чистоты («Sigma», США). Для этого альбумин растворяли при 4°C в количестве 1 мг/мл в бидистиллированной воде без интенсивного перемешивания, не допуская образования пузырей. Затем 10 - 75 мкл раствора доводили до 500 мкл водой, после чего к растворам добавляли 4,5 мл раствора Кумасси, тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин. Измерение ОП стандартов проводили на спектрофотометре «Spekol-11» («Carl Zeiss Jena», Германия) при длине волны 595 нм против пробы, содержащей 500 мкл воды и 4.5 мл раствора Кумасси.

*Для исследования содержания белка в экстрактах клеток* проводили протеолиз белка 3% раствором КОН в соотношении 1:1 в течение 3 минут. Концентрацию экстрактов подбирали таким образом, чтобы ОП растворов не выходила за пределы калибровки. Далее к 500 мкл полученного раствора добавляли 4.5 мл раствора Кумасси и инкубировали 10 минут. Измерение ОП проводили так же, как и для калибровочных стандартов. О содержании белка в мг/мл судили по калибровочной кривой.

## **2.7. Изучение экспрессии гена POR1.**

Изучение экспрессии гена POR1 проводили по активности репортёрной β-галактозидазы *E.coli*, модифицированный ген которой находится под контролем промотора POR1. С этой целью была создана генетическая конструкция pUVLT2 (рис. 9).



**Рисунок 9.** Схема генетической конструкции pUVLT2 с геном LacZ под контролем промотора гена, кодирующего VDA C.

Для создания генетической конструкции *pUVLT2* промотор гена митохондриального потенциалзависимого порина VDAC из генома штамма *Y. lipolytica CLIB 122* клонировали с помощью ПЦР с использованием праймеров VDAC-F и VDAC-R2. Продукт размером 1050 п.н.о. обрабатывали рестриктазами Bsp1407/ XhoI и клонировали в конструкцию на базе pUK21, несущую терминатор XPR, ген URA3 и ген *LacZ*, линейаризованную по сайтам KpnI и XhoI. При проведении генно-инженерного конструирования использовали олигонуклеотидные

ДНК-праймеры	следующей	структуры:	Lac-for1	(SalI)
GGGTCGACACCATGATTACGGATTCACTG			Lac-rev1	(HindIII)
GGAAGCTTATTTTTGACACCAGACCAACTG			xprT-R	(XbaI)
ATATCTAGAGCCACCTACAAGCCAG	Txpr-F	(Eco31I,	XmaJI)	
CATAAAATGCGAGACCTAGGTAGGCAATTAACAG			VDAC-F-Bsp1407	
GGTGTACACACATGCATATAGGATACATTT			VDAC-R-Sal	
GGGTCGACTGGGTTAGTACGTGTTGCGTGT			VDAC-R2-XhoI	
GGCTCGAGGGATCCCATGTCGACTGGGTTAGTACGTGT.				

Полученная конструкция pUVLT2 при введении в штамм *Y. lipolytica W29* обеспечивала получение трансформантов, обладающих воспроизводимо определяемой активностью  $\beta$ -галактозидазы в клеточных лизатах, зависимой от условий культивирования. Клетки трансформанта выращивали до стационарной стадии

роста в различных условиях и в присутствии различных концентраций прооксидантов, после чего подготавливали как описано в разделе 2.3.

**Определение активности  $\beta$ -галактозидазы** проводили с использованием хромогенного субстрата 5-бром-4-хлор-3-индолил-b-D-галактопиранозида (X-Gal). Реакцию проводили в ячейках 96-луночного плоскодонного иммунологического планшета Costar. Реакционная смесь общим объемом 100 мкл содержала: гомогенат клеток культуры – 20 мкл, 25 мМ трис-HCl буфер; pH 8.3, 0.2 М глицин - 79 мкл, X-gal-1 мкл (вносился в виде свежеприготовленного стокового раствора в диметилформамиде с концентрацией 500 мМ объемом 5 мкл на реакцию смесь). Реакцию проводили в течение 1 ч при 37°C. Сигнал (голубое окрашивание) измеряли на микропланшетном фотометре «STAT FAX 2100» (США) при длине волны 630 нм, учитывая результат при попадании измеряемого значения  $A_{630}$  в диапазон от 0.1 до 1.0 ед. ОП. За единицу активности фермента принимали изменение оптической плотности, вызывающую увеличение поглощения при 630 нм на 1 ед. ОП после инкубации с субстратом в течение 1 ч при 37°C, соотнесенную к содержанию белка.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ РОСТА И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КУЛЬТУРЫ *Y. LIPOLYTICA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

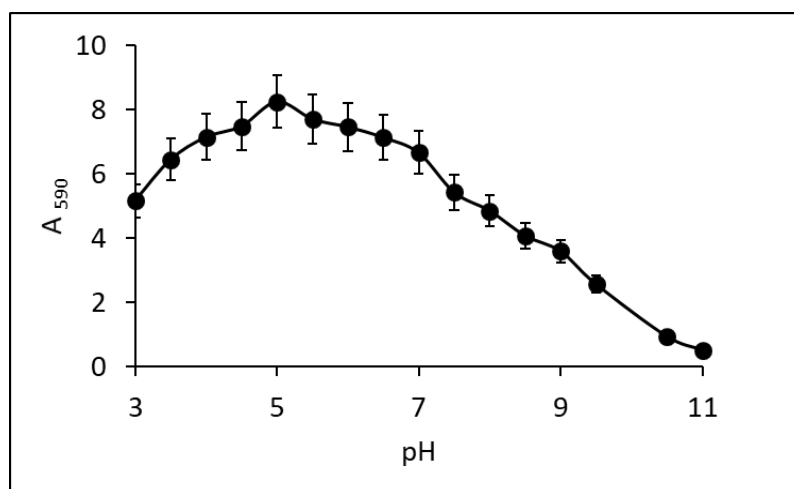
Изменение параметров культивирования приводит к изменениям метаболической активности клеток, создавая таким образом значительные сдвиги различных параметров роста культуры. Наиболее показательными из них являются динамика роста (накопления биомассы), дыхательная активность и ультраструктура клеток. Долгое время считалось, что стрессовые воздействия негативно сказываются на динамике роста дрожжевых клеток, приводя тем самым к замедлению скорости роста. АФК, генерируемые в результате стрессового воздействия, повреждают дыхательную цепь митохондрий, что вызывает гипоксию и запускает ряд сигнальных событий, приводящих к ингибированию роста [301]. Однако, в последнее десятилетие было показано, что контролируемый стресс в нелетальных дозах приводит к мобилизации резервов клетки и может оказывать положительное влияние на ростовые характеристики культуры [302]. Кроме того, показано, что нелетальные дозы стрессовых воздействий приводят к индукции ряда сигнальных путей, что позволяет увеличить хронологическую продолжительность роста культуры [303].

Исходя из этих предпосылок, на первом этапе работы были проведены подбор стрессовых и оптимальных условий и исследование кинетики накопления биомассы, а также оценка скорости дыхания клеток, их морфологии и ультраструктуры, позволяющие выявить характерные особенности физиологии дрожжевых клеток в условиях стрессовых воздействий различной природы.

#### 3.1.1. Параметры роста культуры *Y. lipolytica*

Так как *Y. lipolytica* устойчива в широком диапазоне рН, было принято решение уточнить экстремальные и оптимальные значения рН культивирования. С

этой целью культуры *Y. lipolytica* выращивали при оптимальной температуре (29°C) на средах со значениями pH от 2 до 11 в течение 30 часов (рис. 10).



**Рисунок 10.** Зависимость оптической плотности культуры *Y. lipolytica* W29 от pH культивирования при 29°C через 30 часов роста.

Было показано, что *Y. lipolytica* W29 имеет широкий pH-оптимум роста (от 4.0 до 7.0), поэтому в качестве оптимального значения pH было выбрано типичное для дрожжей значение pH 5.5, а для моделирования щелочного стресса (ЩС) было выбрано значение pH 9.0, лежащее за пределами оптимума. В качестве температурного оптимума было выбрано типичное для дрожжей значение 29°C, а в качестве условий теплового стресса (ТС) - 38°C.

Таким образом, для дальнейших экспериментов были выбраны следующие условия культивирования дрожжей: pH 5.5, 29°C - оптимум (контроль); pH 9.0, 29°C – ЩС; pH 5.5, 38°C - ТС; pH 9.0, 38°C – комбинированный стресс (КС).

### **3.1.1.1 Исследование кинетики накопления биомассы в суспензионной культуре дрожжей *Y. lipolytica* в различных условиях.**

Для всех выбранных условий были получены кривые роста культур (рис. 11) и оценены основные параметры накопления биомассы.

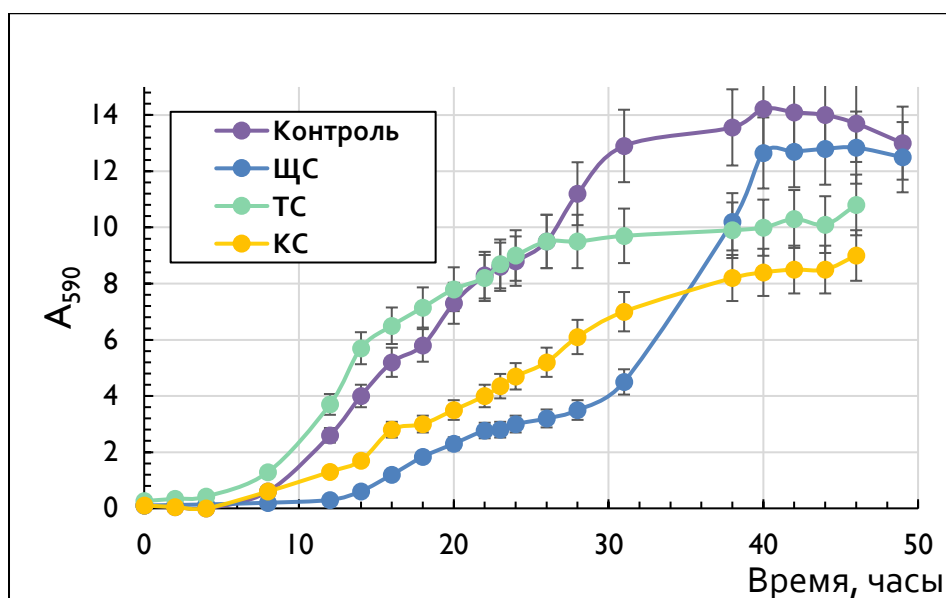


Рисунок 11. Кривые роста *Y. lipolytica* W29 в различных условиях.

Было показано, что в оптимальных условиях лаг-фаза длилась не более 8 часов, а стационарная стадия наступала через 30 часов роста. Щелочные условия приводили к удлинению лаг-фазы до 12 часов, а стационарная стадия наступала через 36-38 часов. При оптимальной температуре культивирования в обоих случаях ОП<sub>590</sub> стационарной стадии составила 13±2. ТС приводил к снижению ОП<sub>590</sub> стационарной стадии роста до 10±1, но не к снижению скорости роста, а при КС происходило удлинение стадии накопления биомассы, и стационарная стадия достигалась через 40-45 часов роста. ОП<sub>590</sub> стационарной стадии принимала минимальное значение при ОП<sub>590</sub> 8.5±1.

Таблица 1. Удельные скорости роста культур *Y. lipolytica* W29 (ч<sup>-1</sup>) 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

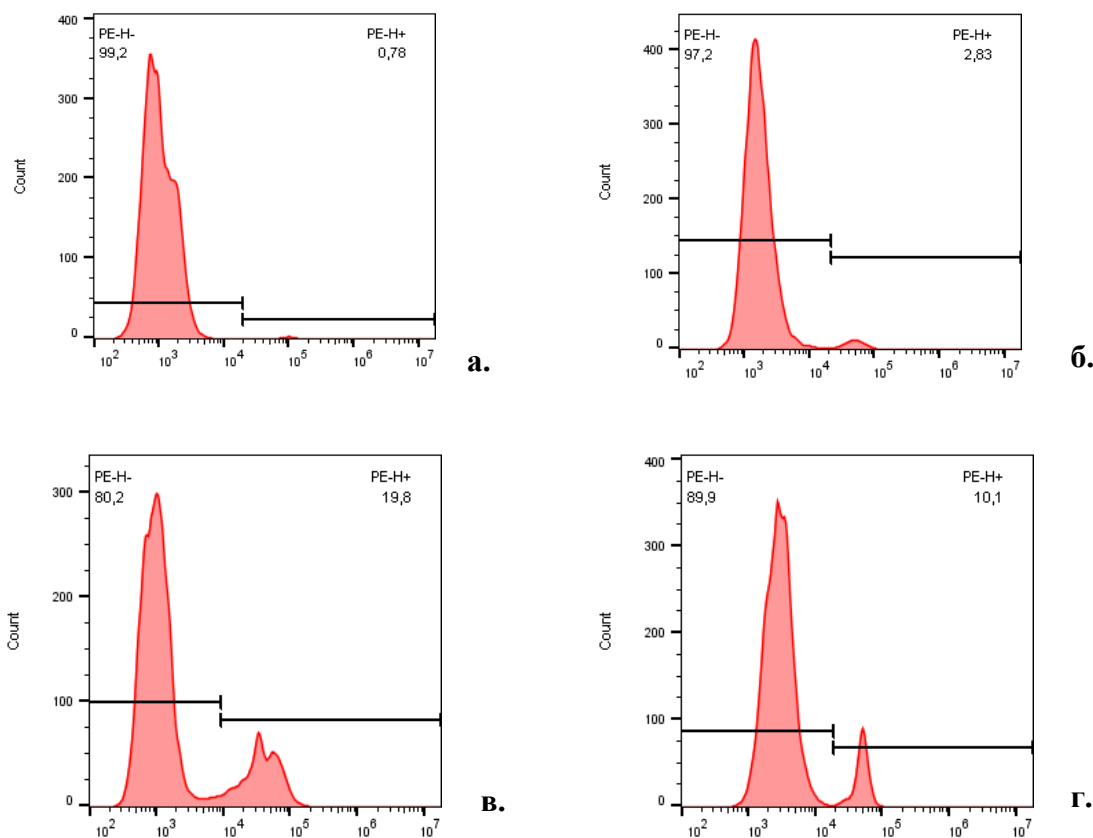
Расчет удельных скоростей роста (табл. 1) показал, что в оптимальных условиях и при ТС этот параметр практически не различался. В то же время ЩС приводил к снижению этого показателя на 27%. Наиболее заметное угнетающее

действие на скорость роста оказывал КС, приводя к ее снижению более, чем на 40 % (табл. 1).

Таким образом, можно предположить, что ТС и ЩС являются мягкими стрессовыми условиями, в то время как КС представляет выраженное стрессовое воздействие, приводящее как к снижению скорости роста, так и к снижению ОП<sub>590</sub> стационарной стадии.

### 3.1.2. Выживаемость клеток *Y. lipolytica*, выращенных при различных значениях рН и в условиях ТШ.

Оценка выживаемости клеток в различных условиях проводилась двумя различными методами – проточной цитометрией с окрашиванием PI, а также методом Коха на плотной среде. Первичная оценка выживаемости клеток культур в стационарной стадии роста проводилась методом проточной цитометрии (рис. 12)



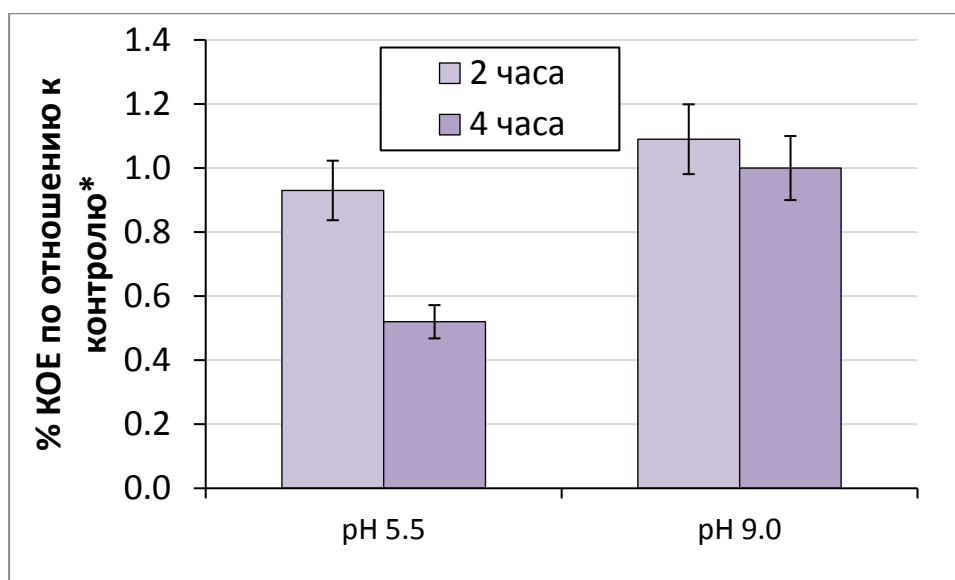
**Рисунок 12.** Гистограммы распределения клеток *Y. lipolytica*, окрашенных PI, в стационарной стадии роста в зависимости от уровня АФК, при культивировании в различных условиях: контроль – а; ЩС – б; ТС – в; КС – г.



В оптимальных условиях выживаемость клеток стационарной стадии роста составляла >99 % (рис. 12, а). При этом любое стрессовое воздействие приводило к появлению на гистограмме флуоресценции выраженного дополнительного пика, соответствующего мёртвым клеткам (рис. 12). ЩС понижал выживаемость до ~97% (рис. 12, б), ТС – до ~80% (рис. 12, в), в то время как в условиях КС выживаемость составляла ~90% (рис. 12, г), что могло свидетельствовать о возникновении перекрёстной адаптации.

Перекрёстная адаптация – явление, при котором предварительная обработка клеток одним стрессором приводит к усилению резистентности к другому и наоборот. В случае одновременного воздействия двух стрессоров перекрёстная адаптация выражается в том, что суммарный эффект от воздействия двух стрессоров не равен сумме эффектов адаптации к каждому из факторов по отдельности [153]. В качестве причины возникновения этого явления называют т.н. эффект «клеточной памяти», при котором цитопротекторные соединения после ответа на первый стрессор какое-то время сохраняются в клетках до наступления второго стресса в случае последовательных стрессовых воздействий. В случае комбинированного стрессового воздействия перекрёстная адаптация может объясняться частичным или полным пересечением сигнальных путей, активируемых в ответ на один из видов стресса, с сигнальными путями, активируемыми в ответ на другой вид стресса [153].

Чтобы показать возможность перекрёстной адаптации дрожжей в условиях ЩС и ТС был проведен эксперимент по определению выживаемости клеток, выращенных в оптимальных условиях и условиях ЩС, после 2-х и 4-х часовой инкубации клеток в условиях повышенной температуры (рис. 13). Выживаемость определяли методом Коха на плотной среде. Высев проводился трижды: перед началом инкубации (контроль\*), через 2 часа и 4 часа инкубации.



**Рисунок 13.** % КОЕ культуры *Y. lipolytica* через 2 и 4 часа инкубации при 37°C по отношению к контролю.

Следует отметить, что определение выживаемости методом Коха дает представление не о количестве живых и мертвых клеток, а о количестве клеток, сохранивших либо утративших способность к размножению в результате стресс-индуцированной остановки клеточного цикла. Эксперимент показал, что среди клеток, выращенных в оптимальных условиях, через 2 часа инкубации способность к размножению сохранили  $93 \pm 10$  % клеток (рис. 13). Через 4 часа температурной экспозиции этот параметр составлял лишь  $52 \pm 5$ % (рис. 13). В то же время, клетки, выращенные в условиях ЩС, в течение 2 часов инкубации при 37°C продолжили расти, а выживаемость по отношению к контролю составила  $109 \pm 12$ % (рис. 13).

Через 4 часа инкубации выживаемость составила  $100 \pm 9$ %. Результаты данного эксперимента позволяют сделать вывод о наличии перекрёстной адаптации клеток *Y. lipolytica*, выращенных в щелочных условиях и при умеренно повышенной температуре, как минимум, на уровне остановки клеточного цикла. Полученные данные позволяют дополнить сведения, полученные ранее в работе [304], и свидетельствуют о том, что зависимость выживаемости клеток *Y. lipolytica* при ТШ от pH среды культивирования не линейна, а адаптация к умеренному тепловому воздействию более эффективна в щелочных условиях.

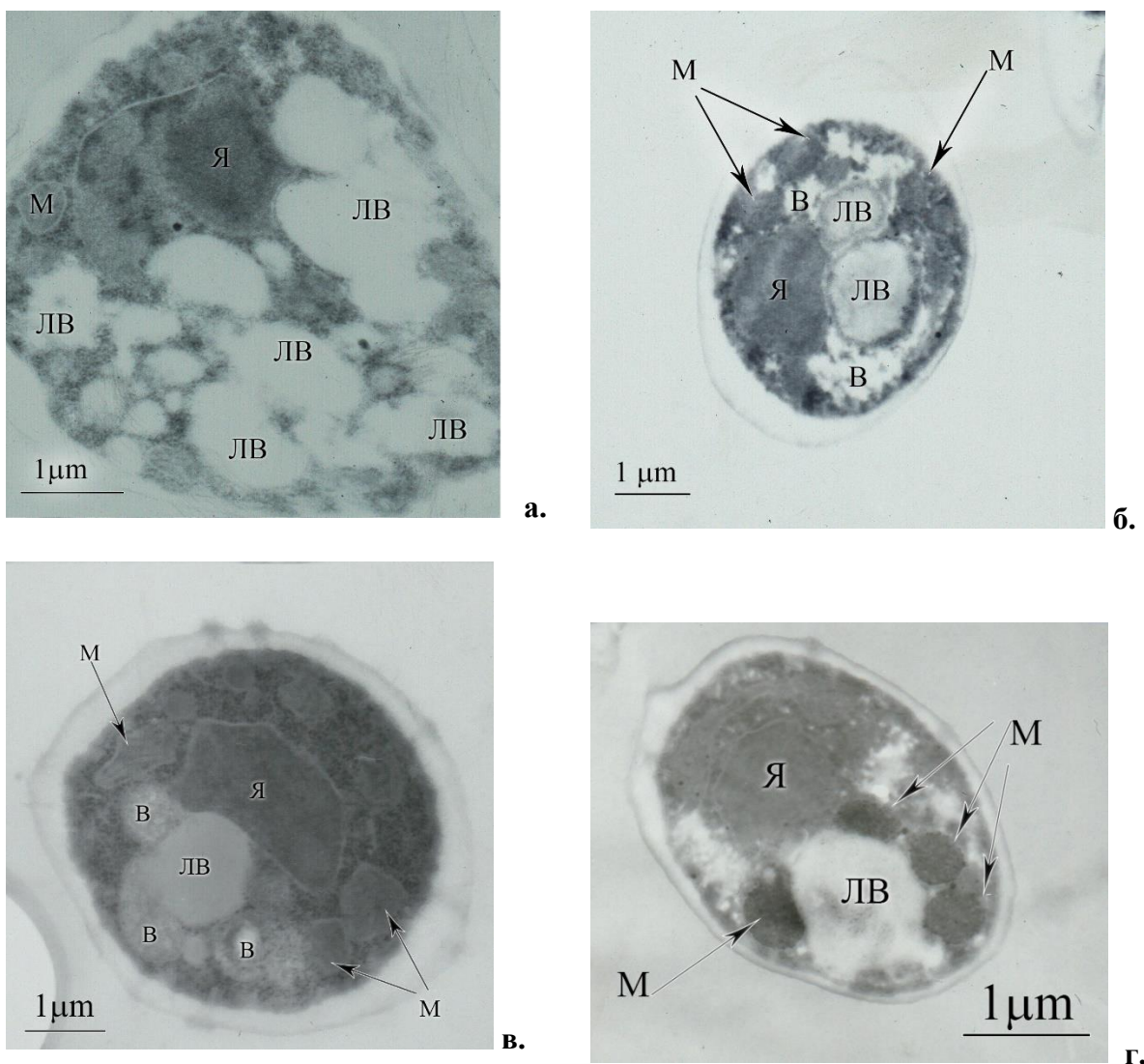
### **3.1.3. Изучение ультраструктуры клеток *Y. lipolytica*, выращенных при различных значениях pH и температурных режимах.**

Стрессовые воздействия на клетку приводят не только к изменениям ростовых характеристик и выживаемости клеток, но и к различным обратимым и необратимым изменениям клеточной ультраструктуры, связанным главным образом с изменениями мембранных структур клетки, которые могут служить надежными маркерами физиологического состояния клетки или свидетельствовать о переходе клетки к апоптозу. Исходя из этого, на следующем этапе работ методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) была исследована ультраструктура клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях. Электронные микрофотографии клеток приведены на рис. 14.

Исследование ультраструктуры клеток *Y. lipolytica* показало, что во всех случаях чётко визуализировались ядро, митохондрии и липидные включения. При этом клетки, выращенные в оптимальных условиях (рис. 14, а), отличались бóльшим размером (7-10  $\mu\text{м}$ ) по отношению к клеткам, выращенным при ЩС (рис. 14, б) и ТС (рис. 14, в). Клетки, выращенные в оптимальных условиях характеризовались большим количеством липидных капель с низкой электронплотностью (рис. 14, а). Клетки, выращенные в оптимальных условиях, отличались тонкой клеточной стенкой и минимальной вакуолизацией.

Иная картина наблюдалась у клеток, выращенных в условиях ЩС: клетки имели хорошо различимые ядра правильной формы, часто ассоциированные с небольшими липидными включениями, небольшие округлые митохондрии на периферии клеток и наиболее выраженную вакуолизацию (рис. 14, б). Вакуоли дрожжей являются сложными органеллами, участвующими как в ферментативной деградации белков, так и в гомеостазе растворимых соединений, таких как ионы, сахароспирты и аминокислоты [305]. Особый интерес представляет способность дрожжевых клеток накапливать в своих вакуолях большое количество пролина – аминокислоты, способной защищать клетки от различных стрессовых воздействий, таких как ТШ, обезвоживание и окислительный стресс [305]. Пролин способен стабилизировать мембранные структуры и препятствовать дегидратации при

замораживании. Кроме того, для данной аминокислоты показана функция регуляции температуры плавления ДНК и перехвата АФК. В работе [306] была показана протекторная функция вакуолей как клеточных депо пролина при различных стрессовых воздействиях на клетки *S. cerevisiae*. Мутанты *S. cerevisiae*, утратившие способность к накоплению пролина в вакуолях были менее устойчивы к ТШ [305]. Возможно, что при росте клеток в щелочных условиях при оптимальной температуре низкомолекулярные протекторные компоненты, растворённые в вакуолях, приобретают особое значение для предотвращения окислительного стресса.

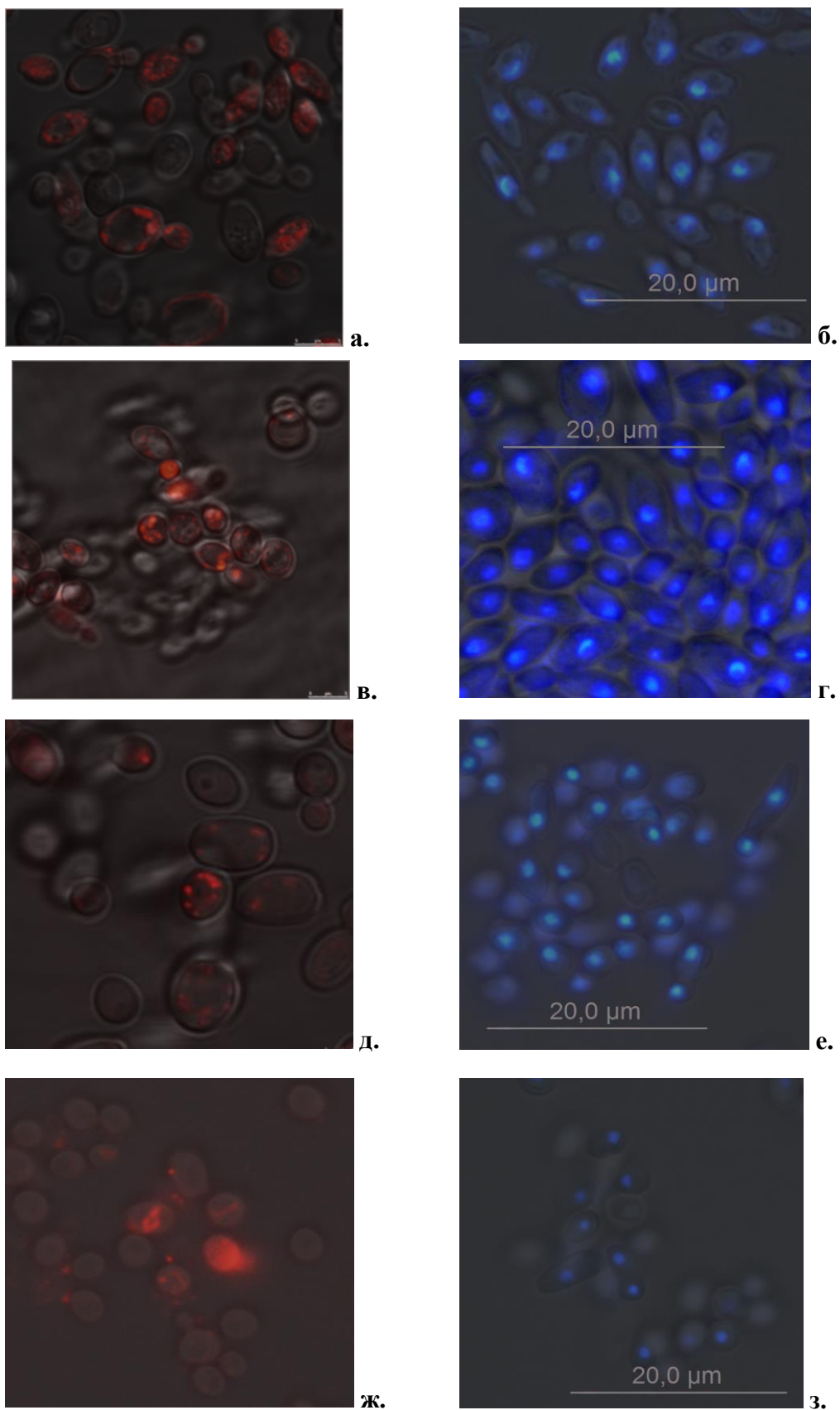


**Рисунок 14.** ТЭМ клеток *Y. lipolytica* W29, выращенных в различных условиях: контроль – а, ЩС – б, ТС – в, КС – г, В – вакуоль; ЛВ – липидное включение; М – митохондрия; Я – ядро.

ЩС, ТС и КС приводили к 1.5-2-кратному уменьшению размера клеток (рис. 14, 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. 14, г) с крайне плотной структурой. Размер самих клеток при этом уменьшался до 3-5  $\mu\text{m}$ . Липидные вкрапления играют ключевую роль в метаболизме липидов и поддержании энергетического гомеостаза клетки, а также в циркуляции белка. В работе [307] сообщалось о стресс-индуцированном метаболическом сдвиге от ферментации к дыханию, включающем индукцию пероксисомного  $\beta$ -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 дрожжевой модели этот механизм также имеет место. Способность ядер клеток образовывать контакты с липидными включениями хорошо известное явление. Например, для клеток *S. cerevisiae*, апоптоз в которых был инициирован внесением в среду амиодарона [308]. В работе [309], было показано, что ассоциация ядра с липидными каплями необходима для включения в ядро внутриядерных липидных капель, роль которых в настоящее время обсуждается. В частности, высказаны гипотезы, что эти внутриядерные капли могут содержать жирорастворимые транскрипционные факторы, регулирующие синтез липидов, быть источником липидов при формировании ядерных пор, а также для ряда бактерий показана способность липидных вкраплений осуществлять механическую защиту ДНК при стрессе [309].

#### **3.1.4 Флуоресцентное окрашивание клеток *Y. lipolytica*, выращенных при различных значениях pH и температурных режимах.**

Флуоресцентное окрашивание позволяет визуализировать отдельные органеллы клеток, что даёт возможность более детально оценить их изменения в зависимости от условий окружающей среды. В данном блоке исследований мы использовали комбинированное окрашивание клеток красителями MytoTracker™ Red – для визуализации митохондрий и DAPI – для визуализации ядер (рис. 15).



**Рисунок 15.** Клетки *Y.lipolytica*, выращенные в различных условиях, окрашенные MitoTracker™ Red (а, в, д, ж) и DAPI (б, г, е, ж), наложение на световую микроскопию клеток: контроль – а, б; ЩС – в, г; ТС – д, е; КС – ж, з.

Потенциометрическое окрашивание клеток красителем MitoTracker™ Red продемонстрировало высокую степень активации митохондрий дрожжей как в оптимальных (рис. 15, а), так и в стрессовых условиях, а именно при ЩС (рис. 15, в) и ТС (рис. 14, д). При КС активные митохондрии обнаруживались лишь в немногочисленных клетках, что согласовалось с данными о пониженной скорости накопления биомассы в этих условиях (табл. 1).

Во всех случаях клетки обладали хорошо визуализируемыми ядрами с четкими контурами. При оптимальной температуре выращивания в обоих случаях наблюдались ядра неправильной формы (формы полумесяца). Такие различия геометрии ядерного хроматина, окрашиваемого DAPI, свидетельствовали о том, что культура является асинхронной, то есть в ней присутствуют клетки, находящиеся на разных стадиях клеточного цикла [310]. В то же время, ядра округлой формы, наблюдаемые у клеток, выращенных при 37°C, свидетельствовали о том, что клетки в данных условиях находились в фазе клеточного цикла G<sub>0</sub>, то есть перестали делиться.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие заключения:

- Повышение температуры культивирования приводит к снижению ОП<sub>590</sub> стационарной стадии, а pH среды – к снижению скорости роста дрожжевой культуры. Выращивание в условиях КС приводит к снижению скорости роста и ОП<sub>590</sub> стационарной стадии;
- При адаптации клеток к тепловому и щелочному стрессорам наблюдается эффект перекрестной адаптации, который воспроизводится и в случае острого, и в случае хронического стрессов.
- В оптимальных условиях клетки дрожжей накапливают большое количество липидных вкраплений, в то время как любой из исследуемых стрессоров приводит к снижению объема клеток, занимаемого липидными вкраплениями и образованию комплекса ядро + липидное вкрапление + митохондрии.

- Повышенная температура культивирования приводит к изменению геометрии ядерного хроматина в клетках стационарной стадии роста, характерному для остановки клеточного цикла.
- В клетках, выращенных в условиях КС, наблюдается снижение энергетического статуса в стационарной стадии роста.

### 3.2. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС КУЛЬТУРЫ *Y. LIPOLYTICA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Скорость потребления кислорода рассматривается как параметр, позволяющий оценивать общий уровень метаболической активности и энергетического статуса аэробных клеток. В общее потребление кислорода клетками ряда эукариот (дрожжей, грибов и растений) вносят вклад 2 основных блока ферментных комплексов, отвечающих за перенос электронов во внутренней мембране митохондрий – основной (цитохромный путь) и альтернативный (цианид-резистентный путь) [311]. Нами было показано замедление скорости роста и деэнергизация митохондрий в условиях КС (глава 3.1.). Следующим шагом работы стало изучение скорости потребления кислорода и вклада АО в клетках *Y.lipolytica*, культивируемых в условиях повышенной температуры и щелочных рН.

Вклад АО в общую скорость клеточного дыхания можно расценивать как один из маркеров окислительного стресса, т.к. известно, что АФК вызывают перекисное окисление КЛ, необходимого для функционирования цитохромоксидазы, аналогично тому, что достигается при обработке клеток KCN. Таким образом, клетка вынуждена переходить на альтернативный путь окисления [312; 102].

Данные о скорости дыхания клеток и вкладе в него АО приведены в табл. 2.

Наиболее интенсивное дыхание наблюдалось при ЩС, а при ТС этот параметр мало отличался от контроля. (табл. 2) 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 (табл. 2). В совокупности со сниженным значением  $\mu$  в этих условиях (табл. 1), это может говорить о



выраженном окислительном стрессе и пониженной метаболической активности культуры.

**Таблица 2. Скорости потребления кислорода клетками суспензионной культуры *Y. lipolytica*, выращенными при различных условиях.**

Экспериментальная модель	Контроль	ЩС	ТС	КС
Скорость дыхания, нг-атом×мин <sup>-1</sup> ×мг биомассы <sup>-1</sup>	27.0±0.5	59.3±2.4	32.10±7.8	19.75±2.7
Вклад АО в потребление O <sub>2</sub> , % от контроля*	25.1%	66.8%	53.2%	96.5%

\*Оценка вклада АО проводилась в присутствии 4 мМ KCN.

Стоит отметить, что увеличение скорости дыхания вместе с увеличением вклада АО – хорошо известное явление для *Y. lipolytica*, которое впервые было показано в 1999 г. в работе [313]. Переход дыхания на альтернативный путь переноса электронов менее эффективен в отношении синтеза АТФ, но не в отношении потребления кислорода. С учетом того, что для *Y. lipolytica* известны 7 генов АО, кодирующие не менее 9 вариантов белка [314], индукция АО в стрессовых условиях или при ингибировании основного пути переноса электронов может происходить достаточно быстро для того, чтобы не только не снижать скорость потребления кислорода, но и в ряде случаев его увеличивать [315].

При ТС потребление кислорода в значительной мере переходит на более безопасный альтернативный путь, роста потребления кислорода при этом не происходит.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- ЩС приводит к заметному усилению скорости дыхания одновременно с увеличением вклада АО в потребление кислорода.

- ТС не приводит к росту потребления кислорода, а вклад АО возрастает вдвое.
- КС приводит к ингибированию потребления кислорода, дыхание при этом полностью переходит на альтернативный путь.

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

Окислительно-восстановительный статус клеток – это интегральный показатель, включающий в себя такие параметры как уровень АФК, активности антиоксидантных ферментов, а также соотношение восстановленной и окисленной форм редокс-пар, в данном случае - глутатиона.

#### 3.3.1. Исследование уровня АФК в клетках *Y. lipolytica*, выращенных при разных условиях.

Уровень АФК измеряли методом проточной цитометрии с окрашиванием флуоресцентным зондом  $H_2DCF-DA$ . В качестве положительного контроля использовали клетки, окислительный стресс в которых был инициирован введением 600 мкМ АМПА (рис. 16).

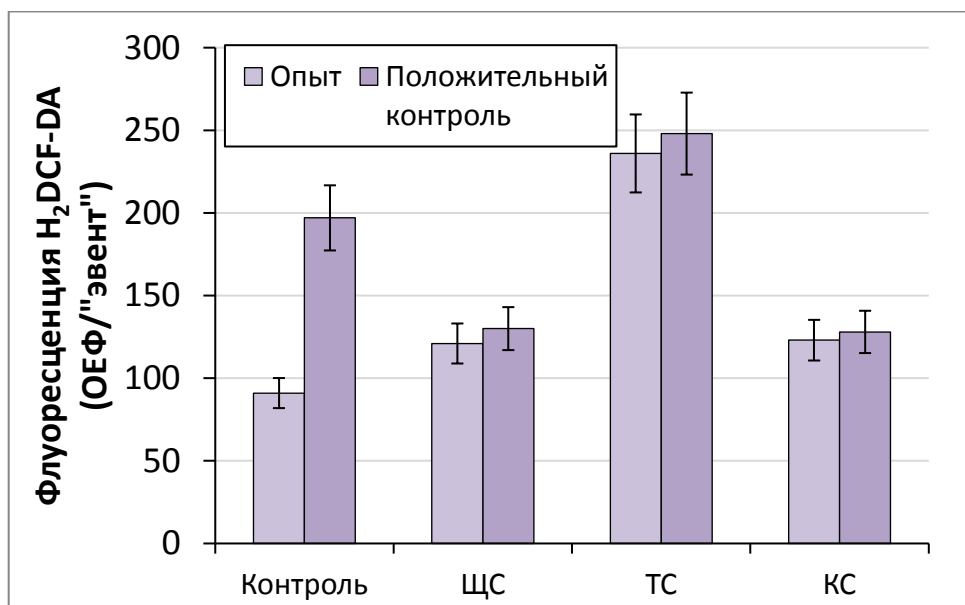


Рисунок 16. Уровень флуоресценции  $H_2DCF-DA$  в окрашенных клетках *Y. lipolytica* через 45 минут после внесения 600 мкМ АМПА в положительный контроль.

Минимальный уровень АФК отмечался в контроле, причем, индукция окислительного стресса 600 мкМ АМПА приводила к росту уровня АФК более, чем вдвое. ЩС приводил к росту уровня АФК по отношению к контролю на 30%, причем индукция окислительного стресса в присутствии 600 мкМ АМПА не приводила к заметному увеличению уровня АФК, то есть уровень АФК в данных условиях был максимально возможным (рис. 16).

ТС приводил к росту уровня АФК более, чем в 2.5 раза по отношению к контролю, при этом уровень АФК в положительном контроле заметно не отличался от экспериментальной точки. КС приводил к росту уровня АФК относительно контроля на 30%, а уровень АФК в положительном контроле не отличался от экспериментальной точки. Это наблюдение подтверждало наличие эффекта перекрёстной адаптации между ТС и ЩС, показанное на уровне выживаемости клеток.

### 3.3.2. Изменения активности ферментов первой линии защиты

#### 3.3.2.1 Изменения активности СОД

Изменения активности СОД в зависимости от условий культивирования приведены на рис. 17.

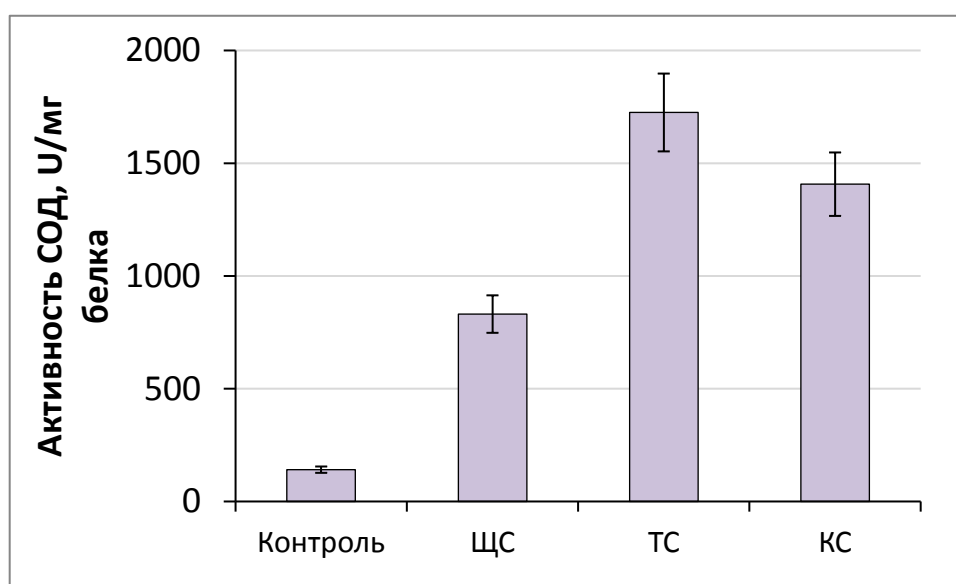


Рисунок 17. Изменения активности СОД в клетках *Y. lipolytica* зависимости от условий культивирования.

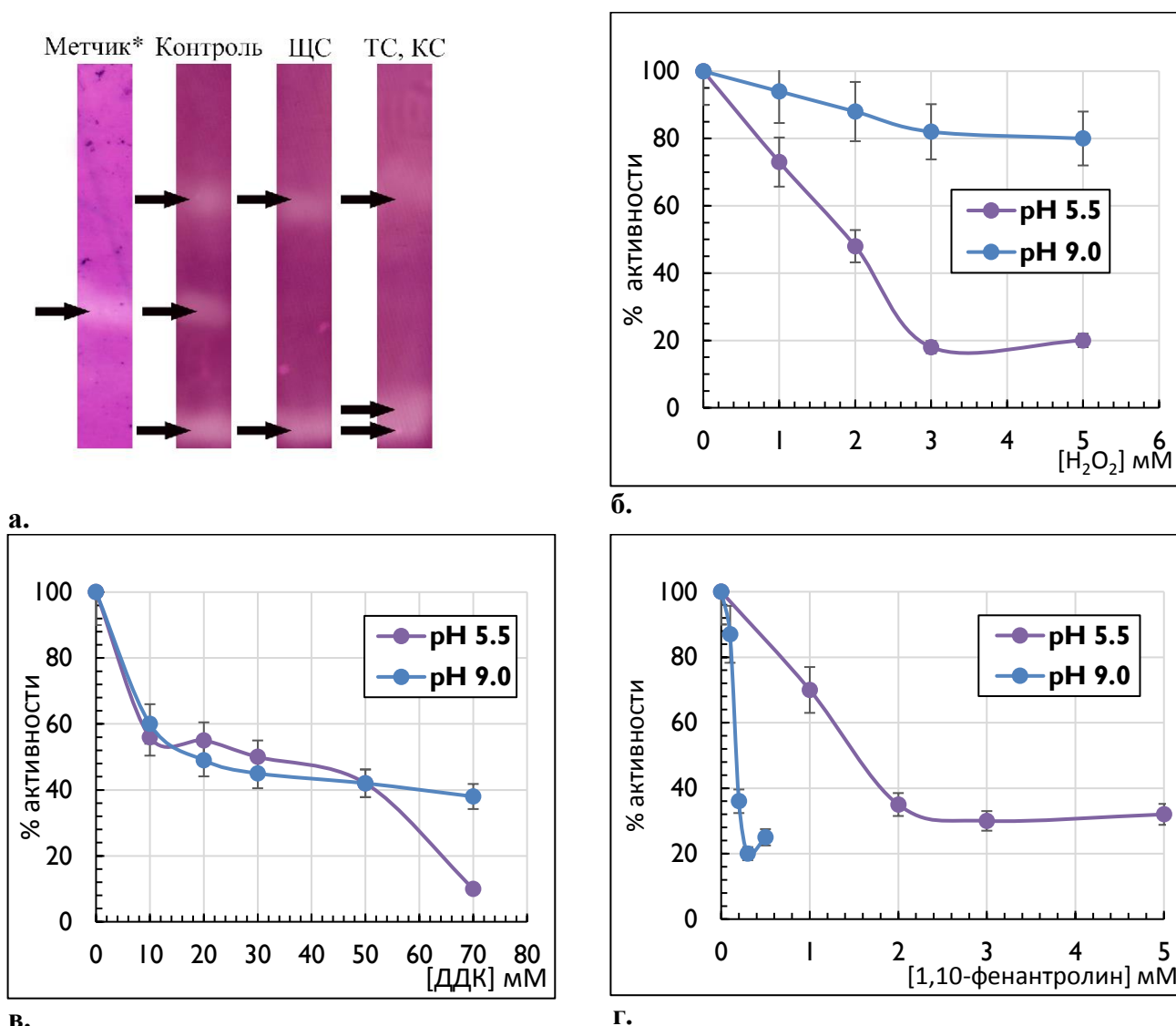
ЩС приводил к росту активности СОД более, чем в 5 раз, а ТС – более, чем в 12 раз по отношению к контролю. В то же время КС обуславливал рост активности СОД в 10 раз (рис. 17). Незначительное снижение активности СОД в условиях КС по отношению к таковому при ТС может являться признаком перекрёстной адаптации. Для более детальной оценки СОД *Y. lipolytica*, экспрессируемой в различных условиях, был проведен анализ электрофоретических профилей и ингибиторный анализ фермента. Результаты экспериментов представлены на рис. 18.

Было показано, что в оптимальных условиях на электрофореграмме присутствовали 3 фракции, обладающие активностью СОД, причем расположение одной из них соответствовало Cu/Zn СОД эритроцитов быка (1.15.1.1, «Merck», Германия), кроме того, обнаруживались более высокомолекулярная и низкомолекулярная фракции (рис. 18, а). В условиях ЩС высокомолекулярная и низкомолекулярная фракции сохранялись, однако, фракция, соответствующая Cu/Zn СОД эритроцитов быка, отсутствовала (рис. 18, а). Такая же картина сохранялась в условиях ТС и КС, однако, в этих случаях появлялась дополнительная низкомолекулярная фракция фермента (рис. 18, а).

Для *Y. lipolytica* описаны 2 варианта цитоплазматической Cu/Zn СОД массой 15.8 кДа, а также 10 вариантов митохондриальной Mn/Fe СОД массой 22.6-32.2 кДа. Кроме того, описана низкомолекулярная Cu/Zn СОД массой 13.6 кДа [314]. Имеются данные об активности самых разных низкомолекулярных соединений в отношении супероксид-аниона: так, способность к дисмутации этой АФК была установлена для Mn(III)-порфирина [316] и волютина (полифосфатных гранул) [317].

Для того, чтобы лучше понять природу высоко- и низкомолекулярных фракций, проявляющих активность СОД, был проведён ингибиторный анализ клеток, выращенных в оптимальных условиях и при ЩС. Ингибирование активности СОД 1-5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> показало, что у клеток, выращенных в условиях ЩС активность СОД ингибировалась не более, чем на 20% (рис. 18, б). В то же время у клеток, выращенных в оптимальных условиях, активность СОД ингибировалась

более, чем на 80% (рис. 18, б)  $H_2O_2$  является для СОД продуктом реакции, а следовательно, ингибирование связано с кинетическим эффектом ингибирования продуктом. Менее выраженное ингибирование фермента из экстрактов клеток, выращенных при ЩС, связано скорее с участием в дисмутации супероксида низкомолекулярных компонентов или других ферментов [318], чем с влиянием каталазы, выполняющей роль «отвода» продукта реакции, так как активности каталазы в данных условиях практически не различались (Глава 3.3.2.2.).



**в.** Рисунок 18. а – электрофоретические профили СОД экстрактов клеток *Y. lipolytica*, \*в качестве метчика была использована Cu/Zn СОД эритроцитов быка (1.15.1.1, «Merck», Германия); б – динамика ингибирования суммарной активности СОД в присутствии 1-5 мМ  $H_2O_2$ ; в – динамика ингибирования суммарной активности СОД в 10-70 мМ диэтилдитиокарбамата натрия (ДДК); г – динамика ингибирования суммарной активности СОД 0.1 - 5 мМ 1,10-фенантролином.

Ингибиторный анализ с использованием диэтилдитиокарбамата натрия (ДДК) – классического ингибитора Cu/Zn СОД – показало, что при использовании 70 мМ концентрации оставалось не более 10% активности СОД у клеток, выращенных в оптимальных условиях и не менее 40% у клеток, выращенных в условиях ЩС (рис. 18, в). Таким образом, можно заключить, что у клеток, выращенных в оптимальных условиях, основная активность приходится на Cu/Zn СОД.

Ингибирование активности СОД хелатором металлов 1,10-фенантролином приводило к резкому падению активности у клеток, выращенных в условиях ЩС – в этом случае ингибирование активности СОД на 80% достигалось при концентрации меньше 1 мМ (рис. 18, г). Для клеток, выращенных в оптимальных условиях, такой эффект достигался при 3 мМ концентрации (рис. 18, г).

Таким образом, можно предположить, что у клеток, выращенных в условиях ЩС, наибольший вклад в активность СОД вносят металлоферменты, отличные от Cu/Zn СОД (возможно, Mn/Fe СОД) или ионы металлов.

### 3.3.2.2 Изменения активности каталазы

Изменения активности каталазы в зависимости от условий культивирования приведены на рис. 19.

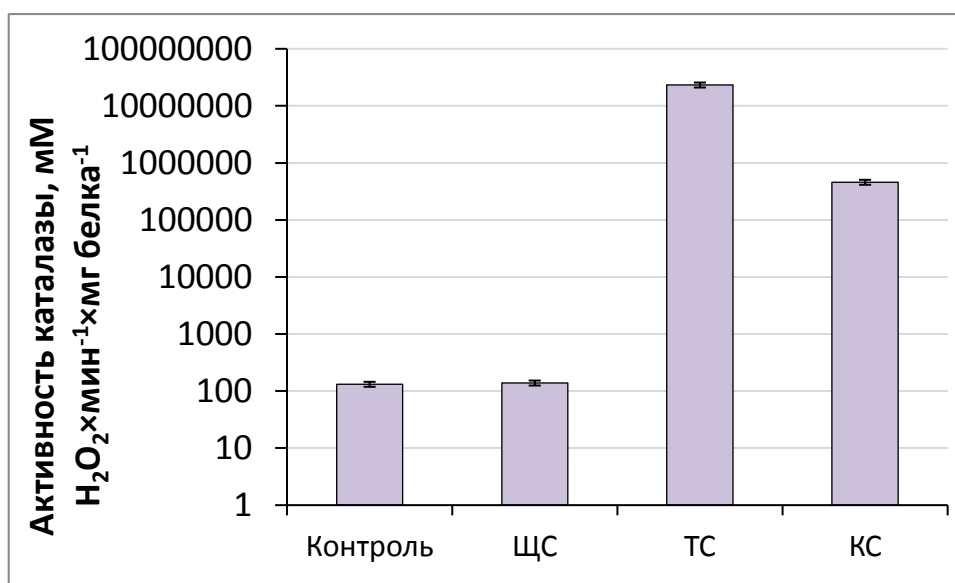
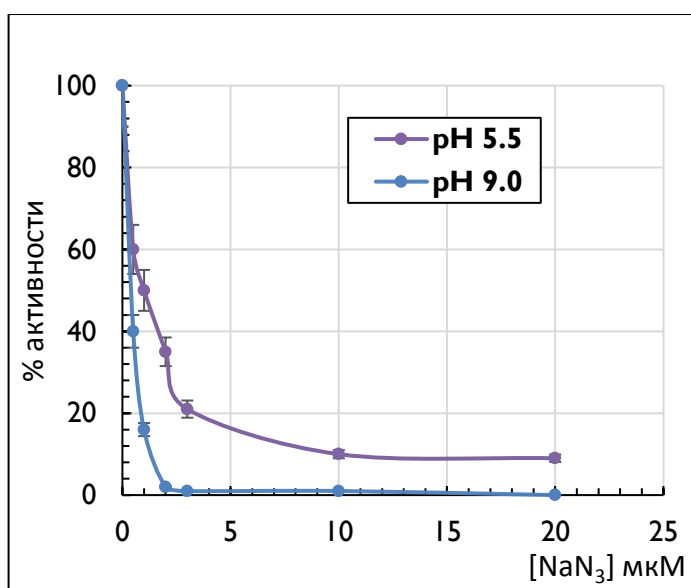


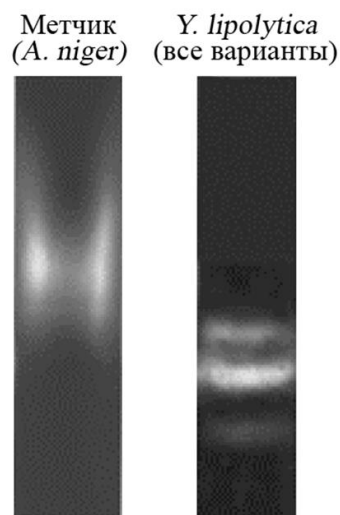
Рисунок 19. Активность каталазы в экстрактах клеток *Y. Lipolytica* в зависимости от условий культивирования.

Активность каталазы в клетках, выращенных в оптимальных условиях и условиях ЩС, практически не различалась и составляла  $132$  и  $139 \text{ мМ H}_2\text{O}_2 \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг белка}^{-1}$ , соответственно (рис. 19). Повышенная температура культивирования приводила к взрывному росту активности каталазы – в условиях ТС этот параметр составлял  $2.8 \times 10^7 \text{ H}_2\text{O}_2 \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг белка}^{-1}$ . В клетках, выращенных в условиях КС, активность каталазы была несколько ниже, но превышала значение контроля на порядки и составляла  $4.6 \times 10^5 \text{ H}_2\text{O}_2 \times \text{мин}^{-1} \times \text{мг белка}^{-1}$  (рис. 19).

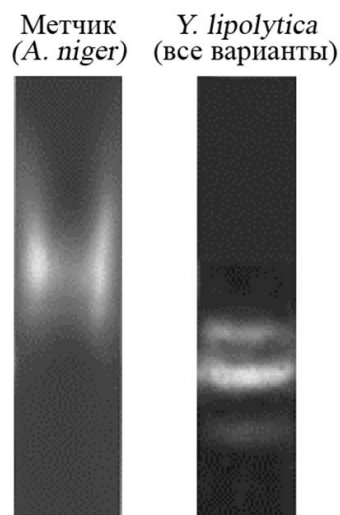
Для более детальной характеристики активности каталазы был проведен анализ электрофоретических профилей и ингибиторный анализ фермента (рис. 20).



а.



б.



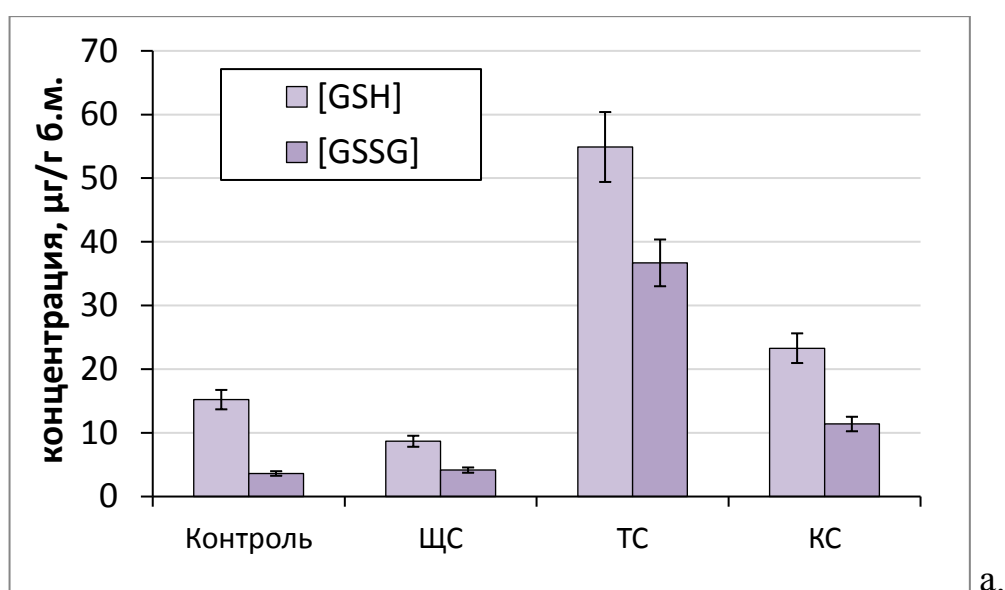
в.

**Рисунок 20.** а – динамика ингибирования суммарной активности каталазы  $0.5 - 20 \text{ мкМ NaN}_3$ ; б – динамика ингибирования суммарной активности каталазы  $1 - 5 \text{ мМ}$  аминотриазолом (АТЗ); в – электрофоретические профили каталазы экстрактов клеток *Y. lipolytica*. В качестве метчика использовалась каталаза *A. niger* (1.11.1.6, «Merck», Германия).

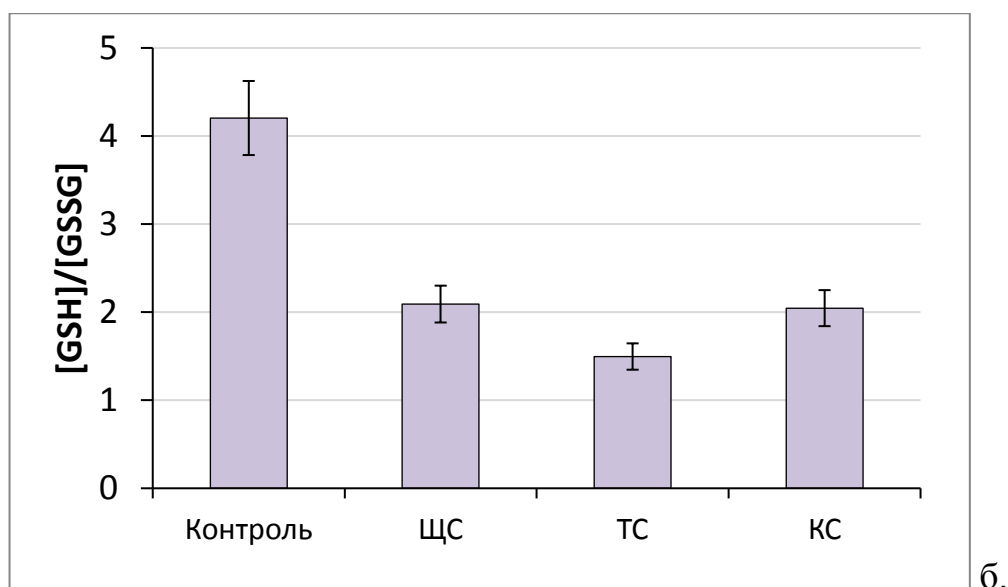
Во всех исследованных экстрактах обнаруживались три близко идущих фракции с активностью каталазы – две мажорных и одна минорная (рис. 20, в). Положение фракций приблизительно соответствовало 250 кДа метчику – очищенной каталазе из *A. niger* (1.11.1.6, «Merck», Германия). Ингибиторный анализ показал высокую чувствительность фермента к  $\text{NaN}_3$ , как в случае клеток, выращенных в оптимальных условиях, так и в случае ЩС (рис. 20, а). Использование классического ингибитора каталазы – АТЗ - показало, что чувствительность к данному ингибитору проявляла лишь каталаза клеток, выращенных при ЩС (рис. 20, б). Таким образом, можно предположить, что в оптимальных условиях функцию защиты клеток от  $\text{H}_2\text{O}_2$  выполняет не собственно каталаза, а глутатионпероксидаза, ингибируемая  $\text{NaN}_3$  [319]. При стрессе происходит индукция каталазы, чувствительной к АТЗ.

### 3.3.3. Изучение соотношения восстановленного и окисленного глутатиона в клетках.

Восстановленная и окисленная формы глутатиона (GSH и GSSG) образуют редокс-пару, а соотношение концентраций этих форм является важным параметром редокс-статуса клеток [320]. Результаты измерения концентраций GSH и GSSG, а также их соотношений, приведены на рис. 21.







**Рисунок 21.** Содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона в клетках *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях: концентрации – а; соотношение концентраций – б.

В оптимальных условиях количество восстановленного глутатиона составило 15.2  $\mu\text{г}/\text{мг}$  биомассы, а окисленного – 3.62  $\mu\text{г}/\text{мг}$  биомассы (рис. 21, а), что вполне соответствует характерным для дрожжей значениям [320]. При этом соотношение восстановленной и окисленной форм в данном случае принимало максимальное значение – 4.2 (рис. 21, б). ЩС приводил к снижению количества восстановленного глутатиона до 8.7  $\mu\text{г}/\text{мг}$ , в то время как количество окисленной формы возрастало до 4.1  $\mu\text{г}/\text{мг}$  (рис. 21, а), вследствие чего соотношение восстановленной и окисленной форм снижалось вдвое по отношению к контролю (рис. 21, б). ТС приводил к резкому росту уровня глутатиона в клетках – содержание восстановленной формы возрастало более, чем втрое, а окисленной - в 10 раз. При этом достигалось минимальное соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона – 1.5 (рис. 21, б). При КС концентрации глутатиона также были значительно выше, чем в контроле – содержание GSH повышалось на 50 %, а GSSG – более, чем на 200 %, при этом соотношение [GSH]/[GSSG] было таким же, как в случае ЩС (рис. 21, б).

В недавней работе [321] было показано, что гиперпродукция глутатиона и его экскреция позволяют клеткам *S. cerevisiae* избегать остановки клеточного цикла при ТШ. Этим эффектом может объясняться тот факт, что рост в условиях повышенной

температуры приводит к заметному росту содержания глутатиона в клетках. Стоит добавить, что и в отношении глутатиона сохранялась закономерность, свидетельствующая о перекрёстной адаптации между тепловым и щелочным стрессорами: в случае КС содержание глутатиона было значительно выше, чем в контроле, а соотношение  $[GSH]/[GSSG]$  – заметно ниже. Тем не менее, содержание глутатиона было ниже, чем при ТС, а соотношение  $[GSH]/[GSSG]$ , соответственно, ниже.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

- Максимальный уровень АФК наблюдался в условиях ТС. При ЩС и КС уровень АФК был более, чем на 30% выше, чем в контроле.
- Все стрессовые воздействия приводили к росту активности СОД, максимальное значение которой достигалось при ТС.
- ТС и КС обуславливали многократный рост активности каталазы, максимальное значение которой достигалось при ТС.
- ЩС обеспечивал снижение содержания глутатиона в клетках, а ТС и КС – значительное повышение параметра, наиболее выраженное при ТС.
- Соотношение  $[GSH]/[GSSG]$  снижалось при любом стрессовом воздействии, однако наиболее значительное снижение отмечалось при ТС.
- Различия редокс-статуса клеток в разных условиях культивирования позволяют сделать вывод о наличии перекрёстной адаптации между тепловым и щелочным стрессорами.

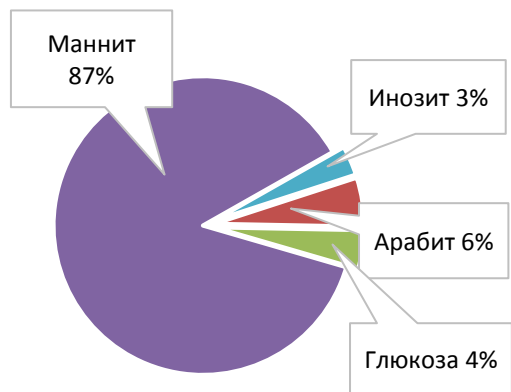
### 3.4. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ОТВЕТ КУЛЬТУРЫ *Y. LIPOLYTICA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

#### 3.4.1. Спектр соединений углеводной природы цитозоля клеток *Y. lipolytica*, выращенных в разных условиях

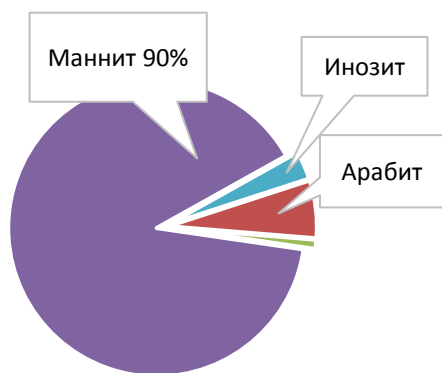
Качественные и количественные изменения в составе углеводов цитозоля могут отражать защитную реакцию на стресс [322]. Поэтому следующим шагом работы стала оценка этих изменений в различных условиях культивирования. Результаты изучения состава соединений углеводной природы цитозоля приведены на рис.22.

При оптимальных условиях роста содержание углеводных соединений составляло почти 5% от сухого веса клеток (рис. 22, а). ЩС снижал количество соединений углеводной природы на 25%. При оптимальной температуре среди соединений углеводной природы цитозоля доминировал маннит, количество которого достигало 87-89% от общего количества соединений углеводной природы при обоих значениях рН (рис. 22, б). Совместное содержание D-арабита, инозита и глюкозы в этих условиях не превышало 6% от общего количества. ЩС не вызывал резких колебаний состава соединений углеводной природы цитозоля. Тем не менее он приводил к увеличению доли арабита на 20%, в то время как уровень глюкозы снижался почти в четыре раза (рис. 22, б). При оптимальной температуре в спектре соединений углеводной природы цитозоля не было обнаружено ни используемого субстрата роста глицерина, ни “стрессового” углевода трегалозы.

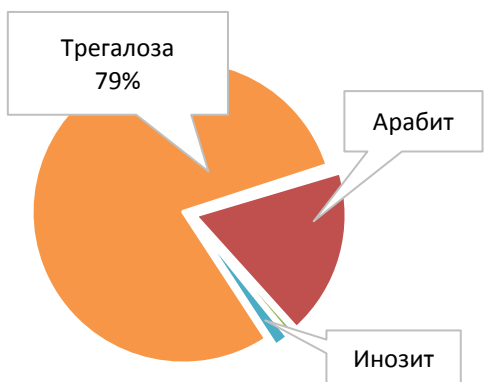
Повышение температуры культивирования вызвало наиболее заметные изменения в составе углеводов. ТС и, особенно, КС приводили к значительному увеличению общего содержания углеводов цитозоля, включая 10-кратное увеличение фракции арабита (рис. 22, в-г). Наблюдалось некоторое количество глицерина (около 5% от общего содержания). Наиболее важным отличием клеток, выращенных при повышенной температуре, стало появление в большом количестве трегалозы (65-70%), и D-арабита (20-25%), в то время как маннит исчезал, а количество второстепенных соединений углеводной природы снижалось еще значительнее (рис. 22, в-г).



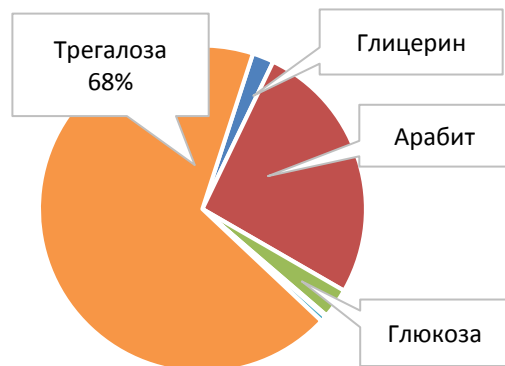
а.



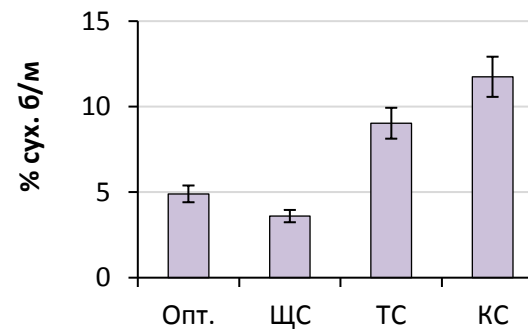
б.



в.



г.



д.

**Рисунок 22.** Спектр растворимых углеводов соединений цитозоля клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях: оптимум (контроль) – а; ЩС – б; ТС – в; КС – г; общее содержание углеводов цитозоля – д.

Анализ соединений углеводной природы цитозоля показал, что маннит является основным запасным соединением углеводной природы при оптимальной температуре культивирования. Известно, что этот полиол доминирует в оптимальных условиях не только у *Y. lipolytica*, но также и у *Yarrowia divulgata*, *Candida hollandica*, и *Candida oslonensis* [323]. Более того, маннит составляет более половины от суммы соединений углеводной природы цитозоля у ряда алкалотолерантных грибов: *Acrostalagmus luteoalbus*, *Chordomyces antarcticus*, и алкалофильных штаммов *Sodiomyces magadii* и *S. alkalinus* [322]. Уровень маннита в клетках *Y. lipolytica* также повышался в условиях повышенной концентрации NaCl [324]. Недавно стало известно, что маннит участвует в обезвреживании АФК, как *in vitro*, так и *in vivo* [325; 326].

Цитопротекторный эффект маннита и механизмы, лежащие в его основе, в настоящий момент являются предметом обсуждения. В соответствии с одной из основных гипотез, маннит функционирует как так называемое «совместимое» соединение, которое накапливается в цитозоле в больших количествах, если клетка оказывается в стрессовых условиях [327]. Совместимые соединения, такие как углеводы, полиолы, аминокислоты и их производные, выполняют важную осмопротекторную функцию в осмоотолерантных дрожжах и [325]. В соответствии с другой гипотезой, маннит выполняет непосредственную антиоксидантную функцию [325]. Некоторые исследователи рассматривают маннит как эффективный «гаситель» гидроксильных радикалов (НО<sup>•</sup>) в связи с его высокой реакционной способностью в экспериментах *in vitro* [326]. Вероятно, обе гипотезы верны, и маннит может накапливаться в клетках в специфических областях с повышенной генерацией НО<sup>•</sup> или вблизи молекул-мишеней НО<sup>•</sup> [326].

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 (рис. 23) [328].

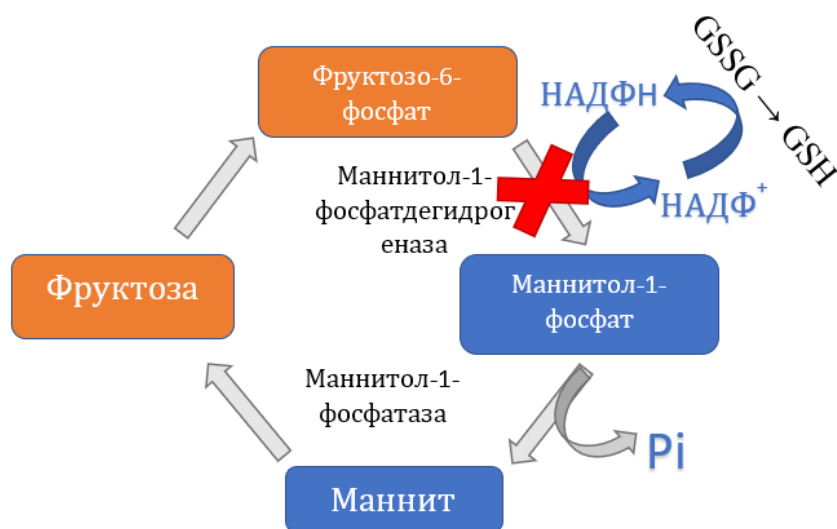


Рисунок 23.

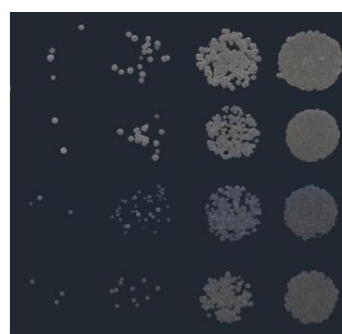
Цикл маннита: маннитол-1-фосфат образуется из фруктозо-6-фосфата при участии маннитол-1-фосфатдегидрогеназы. При этом происходит восстановление  $\text{НАДФ}^+$  до  $\text{НАДФН}$ . Ингибитор этого фермента нитрофенид (НФ) фактически является ингибитором синтеза маннита.

Таблица 3. 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 $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]^*$	4,21 → 4,52	2,09 → 16,00

\* Перед знаком «→» приведены значения без обработки НФ (см. рис. 21-22), после знака – значение после 6 часов экспозиции с 200 мкМ НФ, внесенных в экспоненциальной стадии роста.

10<sup>-6</sup> 10<sup>-5</sup> 10<sup>-4</sup> 10<sup>-3</sup>



Оптimum, контроль

Оптimum + 200 мкМ НФ

ЩС, контроль

ЩС + 200 мкМ НФ

Рисунок 24. Влияние 6-часовой экспозиции с 200 мкМ НФ на жизнеспособность дрожжей *Y. lipolytica* в условиях культивирования при различных рН среды.

Чтобы выяснить, может ли конститутивно высокое содержание маннита в клетках *Y. lipolytica* при оптимальной температуре культивирования обеспечивать устойчивость в широком диапазоне рН, был проведён ряд экспериментов с введением в среду культивирования нитрофенида (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. 3. и на рис. 23.

Как видно, 6-часовая инкубация оказывала существенное ингибирующее действие на содержание маннита в контроле (табл. 3), что подтвердило действие НФ на синтез маннита *de novo*. Однако, необходимо заметить, что НФ не оказывал воздействия на уровень маннита при ЩС. После 6 часов инкубации с НФ выживаемость снижалась до 86% при ЩС. В контроле выживаемость клеток составляла 100%. При этом соотношение [GSH]/[GSSG] в условиях ЩС заметно возрастало, в то время как в контроле оставалось практически неизменным (табл. 3, рис. 24).

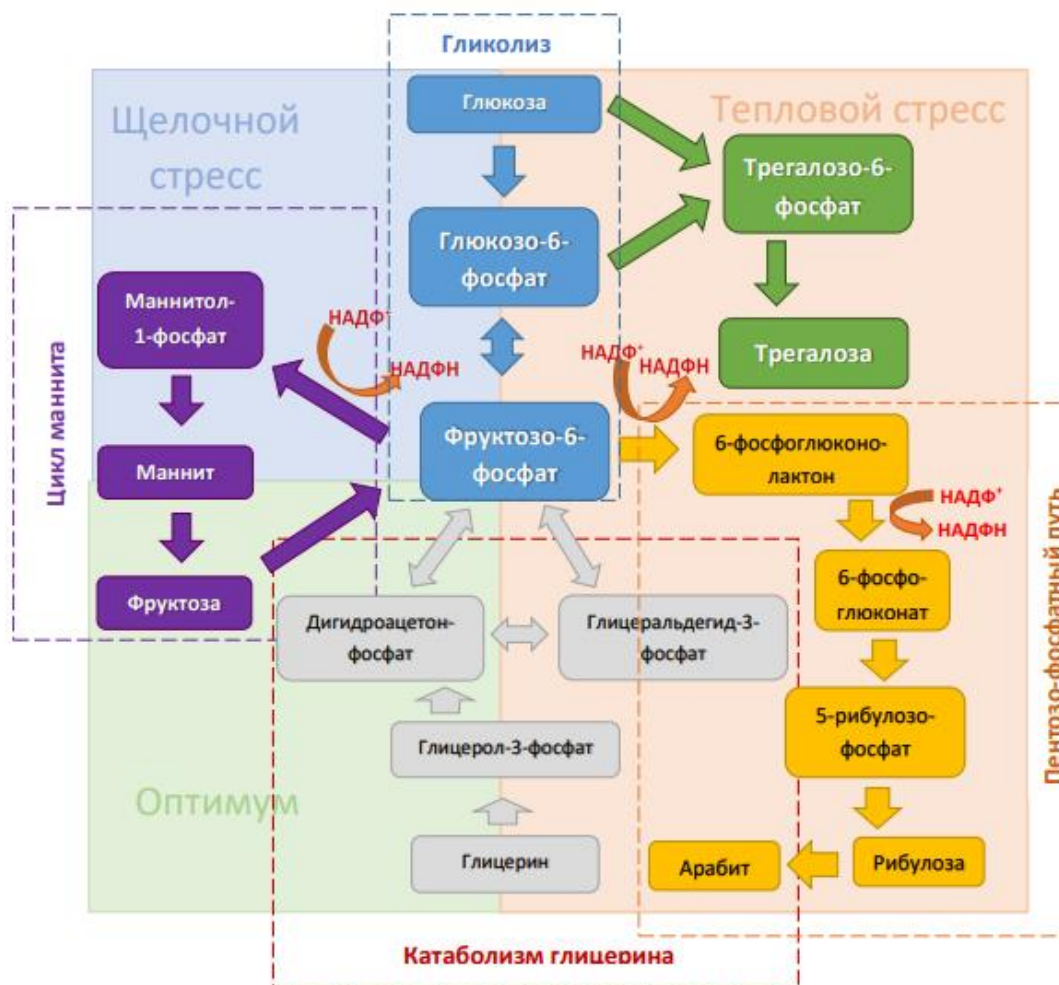
Из этого можно заключить, что в щелочных условиях маннит оказывает косвенное цитопротекторное действие за счет восстановления резерва НАДФН в ходе его синтеза. НАДФН затем используется как восстановитель в регенерации GSSG, а ингибирование синтеза маннита *de novo* приводит к торможению работы глутатионовой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

Повышенная температура культивирования, как при оптимальном, так и при щелочном значении pH приводила к значительным изменениям профиля соединений углеводной природы цитозоля. Повышение общего содержания соединений углеводной природы сопровождалось замещением доминирующего углевода – маннита - трегалозой, а также значительным увеличением содержания арабита при полном исчезновении маннита и глюкозы (рис. 22, в-г). Это позволяет предположить, что трегалоза была синтезирована *de novo* из глюкозы с использованием резерва маннита для синтеза фруктозы [328], рис. 24.

Известно, что трегалоза является эффективным цитопротектором при повышении температуры благодаря своей способности стабилизировать липиды и белки в составе мембран [329; 330]. В недавней работе [331]. с использованием *S. cerevisiae* была показана роль первого фермента пути синтеза трегалозы, трегалозо-

б-фосфатсинтазы, в регуляции процессов дыхания и брожения. Мутант *S. cerevisiae tps1* с нарушением синтеза этанола, продемонстрировал снижение активации  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны и изменение клеточного рН-гомеостаза [331]. Известно, что гены, кодирующие синтез трегалозы, также присутствуют в геноме *Y. lipolytica*, но содержание трегалозы в клетках, использующих глицерин либо глюкозу в качестве источников углерода при росте, обычно ниже 1 нмоль/мг сухого веса, что может быть объяснено низкой активностью пути синтеза углевода и высокой активностью трегалазы [332]. Однако синтез трегалозы увеличивался при нарушении гена, кодирующего трегалазу, или после ТШ [333]. ТШ вызывал повышение уровня трегалозы у нескольких видов дрожжей [334]. У *Y. lipolytica* ТШ, моделируемый при 40 °С в течение 2 ч, увеличивал содержание трегалозы, в пределах от 7 до 20 нМ/мг сухого веса у разных штаммов [334]. Таким образом, при повышении температуры культивирования до 38 °С, происходило критическое изменения профиля соединений углеводной природы цитозоля. Тем не менее, трегалоза, видимо, не является универсальным цитопротекторным компонентом, содержание которого увеличивается в ответ на любое стрессовое воздействие. Хотя ЩС негативно влияет на клетки *Y. lipolytica*, что подтверждается увеличением генерации супероксид-анионов и антиоксидантных ферментов в данных условиях, ЩС не провоцировал появления трегалозы в клетках. Также было показано увеличение уровня арабита при всех исследуемых стрессовых воздействиях (рис. 22, б-г). Накопление D-арабита было показано для грибов родов *Debaryomyces* и *Geotrichum* [335], а также дрожжей *Kluveromyces lactis* [336] и *S. albicans* [337] под воздействием теплового, окислительного и осмотического стрессоров. В эукариотических клетках D-арабит является побочным продуктом пентозофосфатного пути, накопление которого приводит к восполнению резерва НАДФН. В этом контексте арабит можно считать аналогом маннита, синтез которого из фруктозы также приводит к восстановлению НАДФ до НАДФН [338], который, в свою очередь, участвует в восстановлении GSSG (рис. 25).





**Рисунок 25.** Гипотетическая схема метаболизма углеводов в различных условиях культивирования.

Стоит отметить, что все изученные виды стресса приводили к значительному снижению соотношения  $[GSH]/[GSSG]$  по отношению к контролю. Полученные данные указывают на то, что в стрессовых условиях дрожжи *Y. lipolytica* могут поддерживать это соотношение  $>1$ . Под действием различных стрессоров клетки дрожжей могут генерировать дополнительный объем GSH, который участвует в защите клеток от воздействия АФК. Повышенный уровень GSH при ТС и ЩС может рассматриваться как маркер острого окислительного стресса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в оптимальных условиях маннит, синтез которого ответвляется от пути гликолиза на стадии глюкозо-6-фосфата, играет важную роль как в качестве непосредственного антиоксиданта, так и как фактор поддержания резерва восстановительных эквивалентов в клетках *Y. lipolytica* [338]. В условиях ТС клеткам необходимо в первую очередь поддерживать

структуру мембран для обеспечения работы мембранных транспортёров, что обеспечивается накоплением большого количества трегалозы в клетках. Так как в данных условиях трегалоза накапливается в больших количествах, но никак не расходуется [329], мы предположили, что пентозофосфатный путь в этих условиях используется клетками для восполнения резерва восстановительных эквивалентов, что приводит к накоплению D-арабита [335], (рис. 25).

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

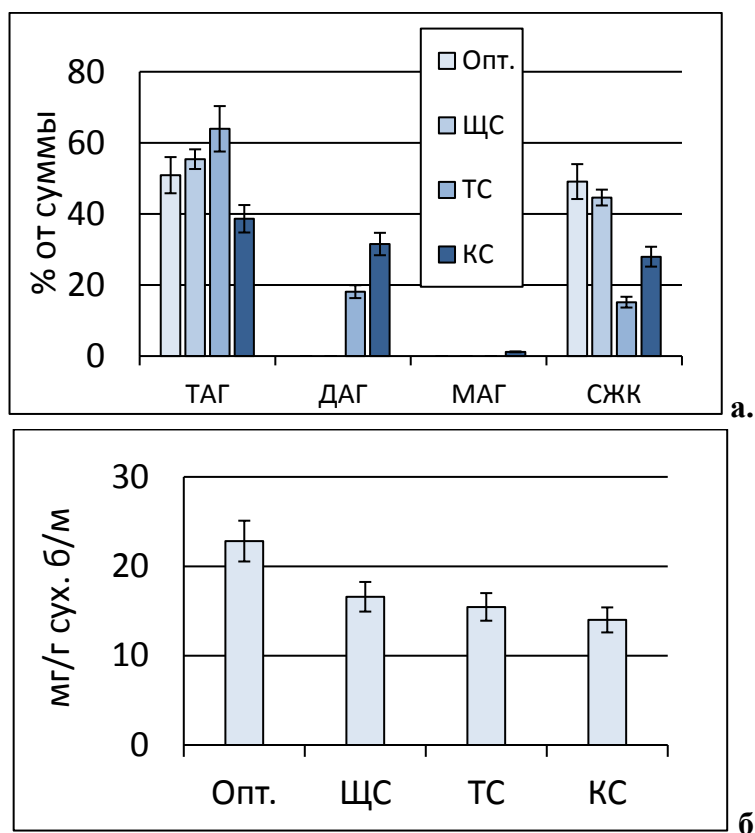
Липидный состав клеток является крайне важным физиологическим параметром. Избыток запасных липидов может быть источником стресса как сам по себе, так и усугубляющим фактором при адаптации к внешнему стрессовому воздействию [339]. Клеточные мембраны становятся одним из первых барьеров. Защищающих клетку от внешних стрессовых воздействий; их структура и свойства создают условия для работы трансмембранных белков, вовлеченных в гомеостаз клеток [340]. В данном разделе будут рассмотрены изменения качественного и количественного состава липидов в условиях ЩС, ТС и КС по сравнению с контролем.

#### **3.4.2.1. Запасные липиды.**

Результаты исследования показали, что при росте на глицерине дрожжи *Y. lipolytica* накапливают большое количество запасных липидов, что вполне согласовывалось с работами [341; 342], в которых был показан высокий выход внутриклеточного синтеза липидов при метаболизации глицерина дрожжами родов *Rodotorula* и *Sporobolomyces*. Глицерин часто используется в биотехнологии как субстрат, способствующий накоплению липидов клетками дрожжей благодаря своей способности легко проникать в клетки и превращаться в соединения липидной природы [343].

При оптимальной температуре культивирования запасные липиды были представлены, в основном, ТАГ и СЖК в равной пропорции, а изменение рН

культивирования не влияло на это соотношение. При этом в условиях ЩС количество запасных липидов снижалось на 27 % (рис. 26, б). Похожий эффект адаптации к ЩС наблюдался у аскомицета *Sodiomyces tronii* [340].



**Рисунок 26.** Спектр запасных липидов клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях: а – состав запасных липидов; б – общее содержание запасных липидов.

Повышение температуры культивирования до 38°C снижало содержание запасных липидов на 35 % (рис. 26, б), а фракция СЖК при этом снижалась в 4.8 и 1.9 раз при ТС и КС, соответственно. В условиях ЩС содержание ТАГ возрастало до 63 %, в то время как КС приводил к снижению этого параметра до 37 % от общего содержания запасных липидов (рис. 26, а). В условиях ТС в липидном профиле появлялись ДАГ, доля которых составляла 18 % от общего содержания запасных липидов (рис. 26, а), в то время как при КС содержание ДАГ составляло 31.5% (рис. 26, а).

В обоих случаях повышение температуры культивирования приводило к появлению эфиров Ст в составе запасных липидов. Полученные данные хорошо согласуются с результатами изучения ультраструктуры клеток методом ТЭМ (см. главу 3.1.3.). Наибольшее количество запасных липидов в виде ЛВ наблюдалось в оптимальных условиях (рис. 14, а). Любое из исследуемых стрессовых воздействий

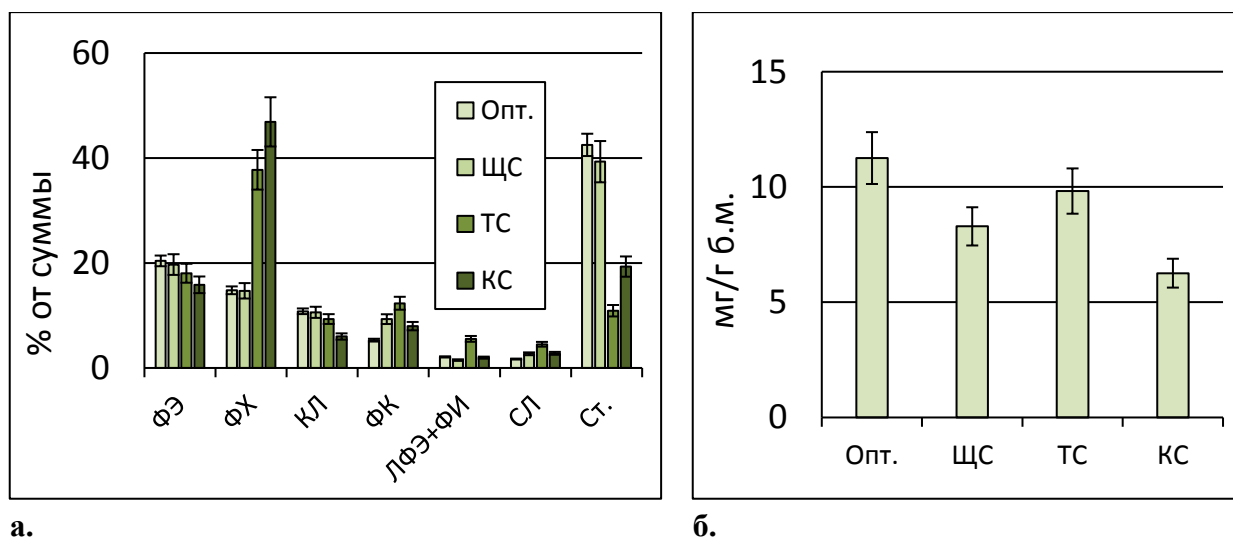
приводило к снижению содержания запасных липидов и, соответственно, объёму ЛВ в клетках. Возникновение в составе клеток структурных комплексов ядро + ЛВ + митохондрии (рис. 14, б-г) может свидетельствовать об активной миграции липидов между органеллами. Известно, что основной функцией ЛВ является накопление и высвобождение питательных веществ, являющихся для клеток дрожжей источником энергии [344; 345]. Кроме того, запасённые в них липиды могут использоваться для синтеза мембранных липидов. Наряду с другими органеллами, ЛВ играют ключевую роль в метаболизме липидов и энергетическом гомеостазе клетки. Кроме того, накопление ЛВ может способствовать более эффективной адаптации к усвоению гидрофобных субстратов, таких как n-алканы, жирные кислоты и триглицериды [344; 345]. В недавней работе [307] сообщалось о стресс-индуцированном метаболическом сдвиге от ферментации к дыханию, включающем индукцию  $\beta$ -окисления жирных кислот в пероксисомах. Он заключается в стимуляции митохондриального дыхания с помощью альтернативных источников углерода и активации ретроградной сигнализации для уменьшения повреждения митохондрий [307]. Вероятно, в случае адаптации дрожжей *Y.lipolytica* к экстремальным значениям pH и повышенным температурам может сработать аналогичный механизм.

#### 3.4.2.2. Мембранные липиды

Количество мембранных липидов достигало максимума в 12.98 мг/г сухого веса при оптимальных условиях (рис. 27, б). ЩС приводил к снижению содержания мембранных липидов на 36 % (рис. 27, б). Липидный состав мембран клеток, выращенных при 29°C, был одинаковым при обоих значениях pH. В нем преобладали фосфолипиды (около 50 %) и Ст (45 %), СФ были представлены в минорной фракции. Основными фосфолипидами были фосфатидилэтаноламины (ФЭ, 16-20 %), фосфатидилхолины (ФХ, 15 %) и КЛ (7-9 %) (рис. 27, а). Содержание ФК варьировало от 5 % при pH 5,5 до 9 % при pH 9,0 (рис. 27, а). Также в небольшом количестве были представлены лизофосфатидилэтаноламины (ЛФЭ), лизофосфатидилхолины (ЛФХ) и фосфатидилинозитолы (ФИ).

ТС провоцировал снижение общего количества мембранных липидов почти на 30 % (рис. 27, б), в том числе из-за более чем трехкратного снижения уровня Ст (с 45 % до 11 %). Однако доля ФЭ оставалась на том же уровне, в то время как доли ФХ и ФК увеличивались в 2,0-2,5 раза (рис. 27, а). Минорные фракции оставались неизменными, за исключением фракции СЛ, которая в условиях ТС увеличивалась в 4 раза.

КС вызывал наиболее значительные изменения как в качественном, так и в количественном составе мембранных липидов, что приводило к более чем 3-кратному и 1,5-кратному увеличению фракций ФХ и ФК, соответственно. Доля КЛ при этом уменьшалась на 40 % а Ст – до 19 % (рис. 27, а).



**Рисунок 27.** Спектр мембранных липидов клеток *Y. lipolytica*, выращенных в различных условиях: а – состав мембранных липидов; б – общее содержание мембранных липидов.

Спектр мембранных липидов в условиях ЩС изменялся по отношению к контролю незначительно, однако, условия КС вызвали двукратное снижение фракции КЛ по сравнению с оптимальными условиями (рис. 27, а). Известно, что КЛ, накапливаемый в митохондриальных мембранах в большом количестве, функционирует как «ловушка» протонов, поскольку он содержит четыре ацильных остатка и два остатка ортофосфорной кислоты, каждый из которых способен связывать один протон [346]. Это позволяет КЛ создавать градиент протонов как на внутренней, так и на внешней мембране митохондрий. КЛ играет ключевую роль в

функционировании митохондрий и биогенезе этих органелл, взаимодействуя с широким спектром митохондриальных белков как посредством гидрофобных и электростатических взаимодействий, так и путем стабилизации белков дыхательной цепи [347]. В 2012 году Ростовцева и Безруков [348] показали, что богатые КЛ участки наружной мембраны митохондрий повышают активность митохондриального порина VDAC, который участвует в обезвреживании и супероксидного радикала и его выведении из митохондрий.

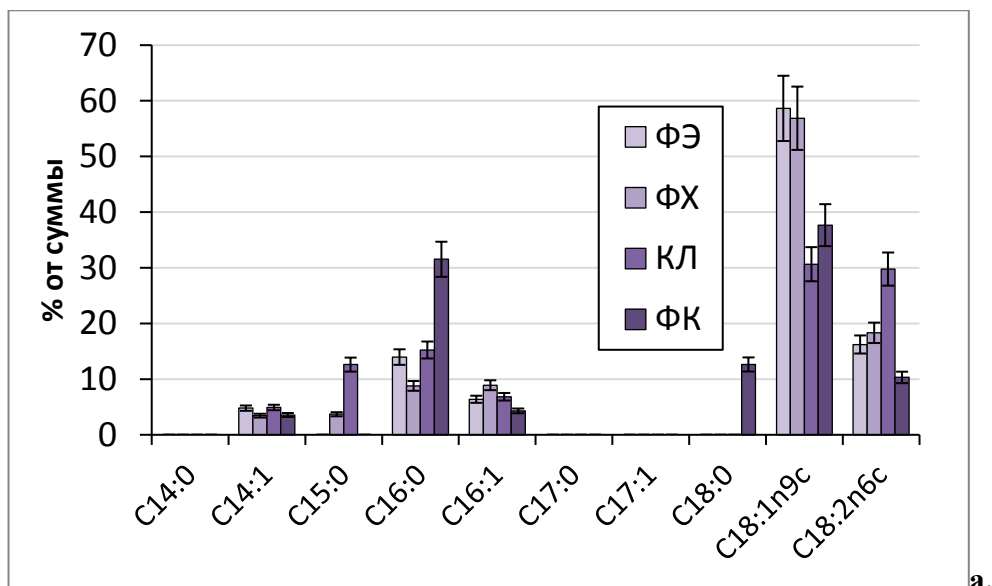
Повышение температуры культивирования приводило в обоих случаях к значительному увеличению фракции ФХ и снижению фракции Ст в мембранных липидах. ФХ синтезируются из ФЭ в эндоплазматическом ретикулуме в соответствии с путём Кеннеди [349]. Гомеостатическое равновесие между двумя классами фосфолипидов имеет большое значение как для реализации функции митохондрий, так и для защиты от окислительного стресса, что было показано для *S. albicans*. Также сообщалось о повышении уровня ФХ у *S. cerevisiae* в условиях стресса, вызванного обработкой детергентом р-НРСД [350]. ФХ в составе липидного бислоя обеспечивают стабильность структуры мембраны [351]. Вероятно, в данном случае как увеличение фракции ФХ, так и уменьшение Ст могли компенсировать снижение ненасыщенности ацильных цепей мембранных липидов (см. далее).

Наблюдалось также некоторое увеличение доли ФК в составе мембранных липидов как при ТС, так и при КС (рис. 27, а). Данные хорошо согласуются с результатами, полученными в работе [240], где авторы на модели *A. niger* показали, что различные стрессовые факторы (тепловой и холодовой шок, окислительный и осмотический стресс) приводили к значительному повышению уровня ФК в мембранах. Они предположили, что ФК принимают участие в адаптационных реакциях путем повышения стабильности клеточных мембран и усиления везикулярного транспорта, а также эндо- и экзоцитоза. Вероятно, в случае адаптации к ТС и ЩС у *Y. lipolytica* может иметь место аналогичный механизм.

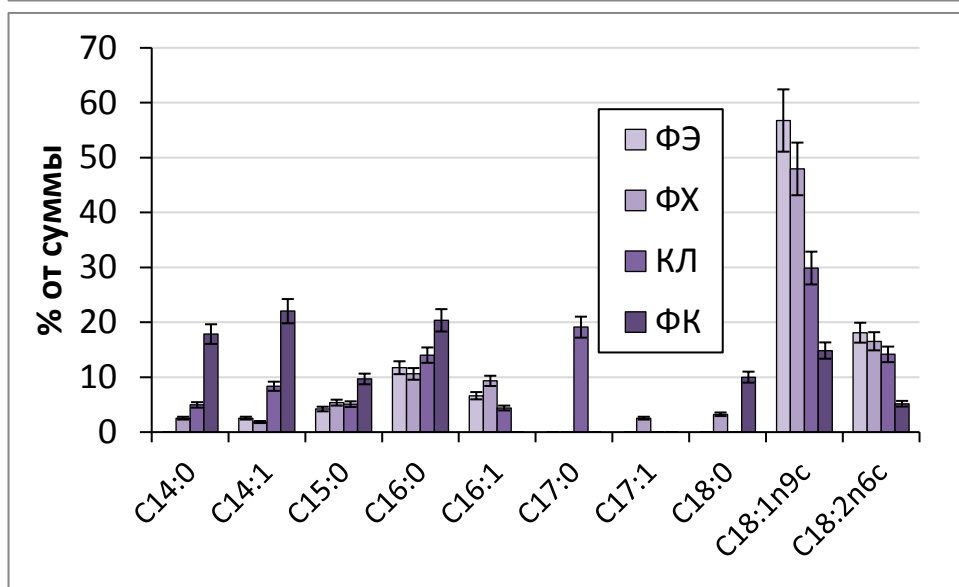
Степень ненасыщенности ацильных остатков в фосфолипидах определяет текучесть липидного бислоя мембран, что, в свою очередь, может влиять на

выживаемость дрожжей и адаптацию к стрессам. Таким образом, было выделено четыре основных класса фосфолипидов, доля которых составляла более 6 %, и проанализирован их жирнокислотный состав (рис. 28). Доминирующими жирными кислотами основных мембранных фосфолипидов были стеариновая (C18:0), олеиновая (C18:1) и линолевая (C18:2). Фракция ФЭ с показателем дефицита водорода 1,5 содержала много олеиновой (C18:1 n9 c) и линолевой (C18:2) кислот (рис. 28). При различных условиях общая степень ненасыщенности ацильных остатков изменялась из-за изменений ненасыщенности некоторых мембранных фосфолипидов. Следует отметить, что ЩС приводил к некоторому (в 1,3 раза) снижению уровня дефицита водорода в ЖК фракций КЛ и ФК (рис. 28, б). Во фракции ФЭ наблюдался довольно высокий уровень насыщенных ЖК, в особенности пальмитиновой (C16:0) (6-12 %). В клетках, выращенных в условиях ТС, отсутствовала миристиновая кислота (C14:0), которая снова появлялась во фракциях ФХ и КЛ в условиях КС. Наиболее значительные изменения происходили в жирнокислотном составе фракции КЛ. В условиях ЩС содержание маргариновой кислоты (C17:0) достигало 14 %, в то время как в оптимальных условиях она не была обнаружена.

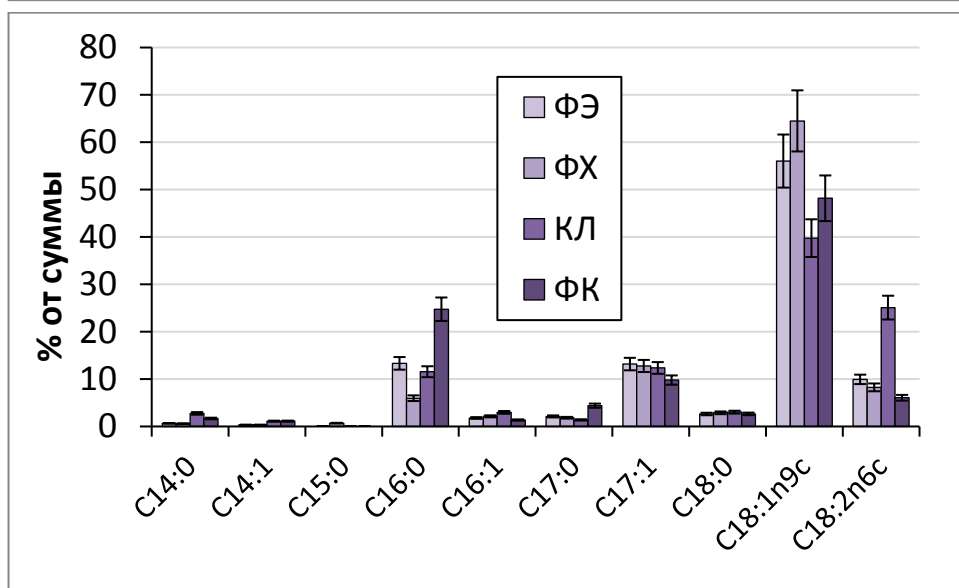
Фракции лауриновой, миристиновой, пентадекановой и пальмитиновой кислот значительно уменьшались (рис. 28, б). Ранее Марек Килишек [345] показал увеличение уровней маргариновой и гептадекановой (C17:1) кислот у *Candida utilis*, выращенных либо с использованием 5% глицерина в качестве источника углерода в два раза, либо при обогащении селеном (20 мг/л) на 25% [345]. Кроме того, обильное появление маргариновой (12.19 %) и гептадекановой (9.31 %) ЖК были обнаружены при культивировании *Y. lipolytica* в ферментёрах с использованием глицерина в качестве источника углерода [344]. Вероятно, увеличение содержания насыщенных ЖК фракции КЛ митохондрий при стрессе обеспечивает целостность и жесткость клеточных мембран в соответствии с гомеовязкой адаптацией, которая включает изменение липидного профиля клеточных мембран, обеспечивая им необходимую текучесть [193].



а.

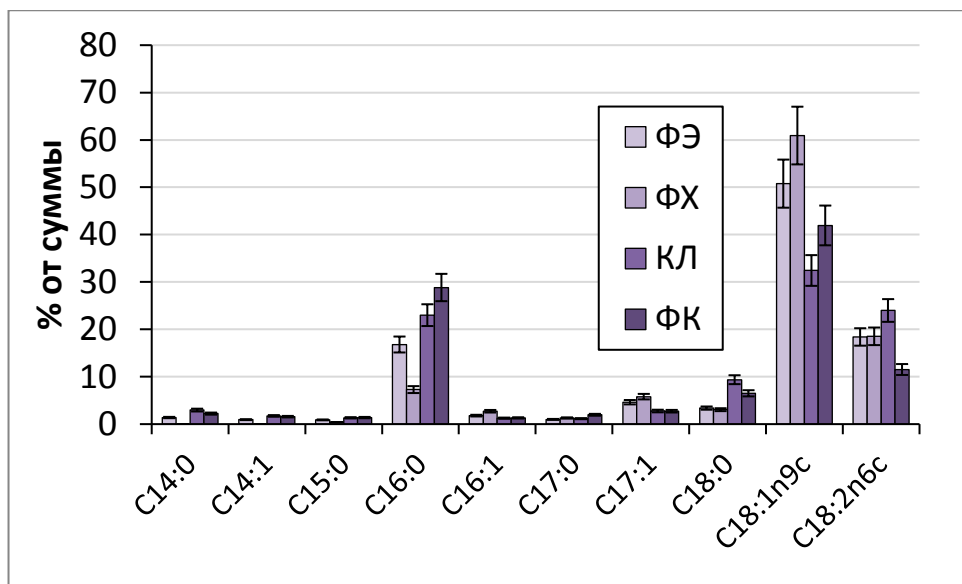


б.

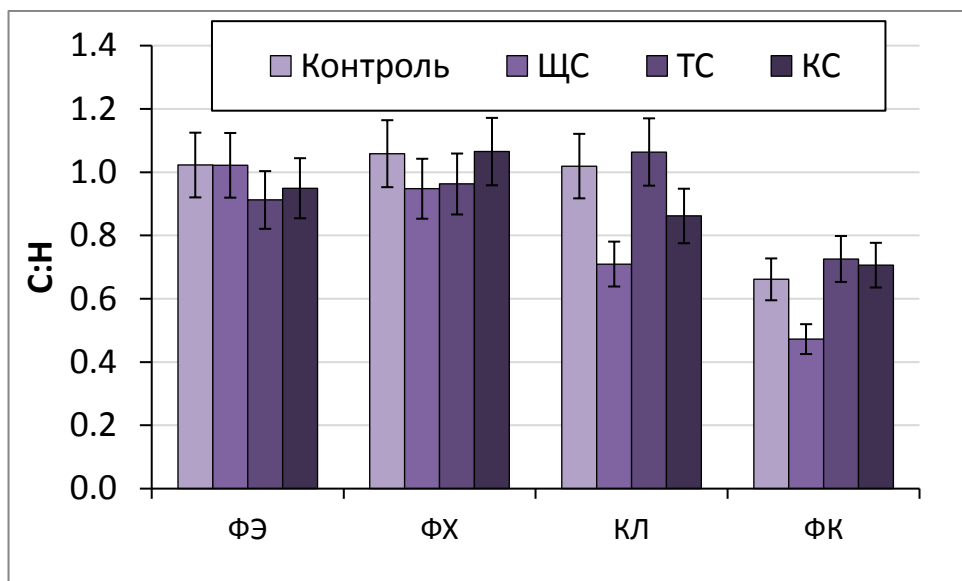


в.





г.



д.

**Рисунок 28. Жирнокислотный состав основных мембранных фосфолипидов *Y. lipolytica* W29 (% от общего количества): контроль – а, ЩС – б, ТС – в, КС – г, степень ненасыщенности – д.**

Культивирование дрожжей при повышенной температуре в обоих случаях сопровождалось снижением индекса дефицита водорода ЖК мембранных липидов (рис. 28, д), что было в основном, связано с уменьшением содержания линолевой кислоты и увеличением содержания олеиновой кислоты. Следует также отметить, что при повышенной температуре все основные мембранные фосфолипиды содержали маргариновую (C17:0) и гептадекановую (C17:1) кислоты, которые отсутствовали в липидном профиле при оптимальных условиях. Кроме того, ТС провоцировал увеличение содержания стеариновой кислоты (C18:0) в основных

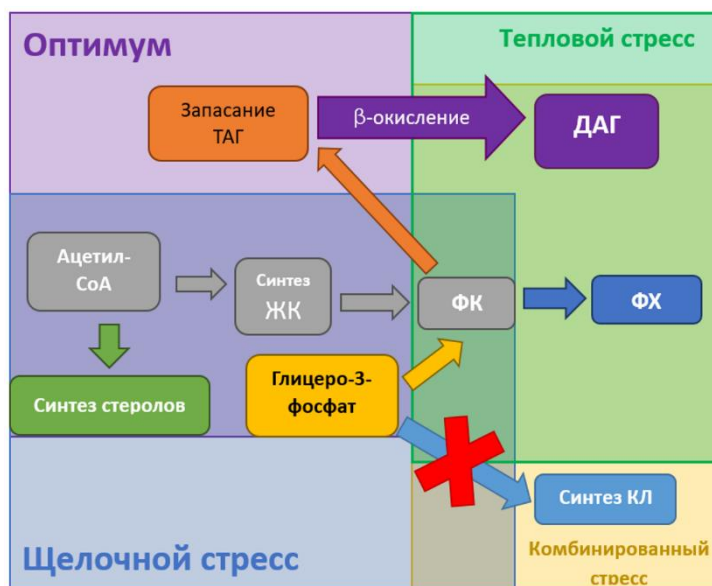
мембранных фосфолипидах и значительное снижение или исчезновение уровня короткоцепочечных (С13-С15) жирных кислот в мембранных липидах (рис. 28, в-г).

КС вызывал полную перестройку жирнокислотного состава доминирующих мембранных фосфолипидов (рис. 28, г). Помимо обилия маргариновой (С17:0) и гептадекановой (С17:1) кислот в культурах, выращенных при повышенной температуре при обоих значениях рН, основные изменения в спектре жирных кислот касались соотношения С18-ненасыщенных жирных кислот (рис. 28, в-г). В отличие культуры, выращенной в условиях ТС, в клетках, находящихся в условиях КС, наблюдалось значительное увеличение содержания линолевой (С18:2) кислоты во фракциях ФЭ и ФХ.

В работе [352] авторы показали, что увеличение температуры культивирования приводило к возрастанию степени ненасыщенности ЖК, а также к укорочению их цепей. Общее снижение индекса дефицита водорода ацильных цепей при повышенной температуре может быть объяснено тем фактом, что более высокая степень ненасыщенности приводит к более низкой температуре плавления мембраны. Это означает, что клетке становится намного сложнее поддерживать структурную организацию и функционирование мембранных белков. Аналогичные экспериментальные результаты были получены с использованием *S. pombe*, подвергнутых краткосрочному температурному стрессу [193]. Полученные данные свидетельствуют об увеличении доли насыщенных ЖК мембранах. Любопытно, что КС приводил как к качественным, так и к количественным изменениям профиля мембранных липидов в клетках *Y. lipolytica*. Причем в ходе адаптации к КС повышение температуры приводило к более выраженным перестройкам метаболизма липидов *Y. lipolytica*, чем изменение рН.

Исходя из полученных данных, стратегия адаптации *Y. lipolytica* к стрессовым воздействиям на уровне метаболизма липидов может быть представлена следующим образом (рис. 29): при оптимальной температуре синтезируемый в клетках ацетил-СоА расходуется на синтез Ст с одной стороны, и накопление СЖК - с другой, а также запасанию ТАГ. Повышение температуры культивирования в обоих случаях приводит к метаболическому сдвигу, который заключается в замещении Ст в составе

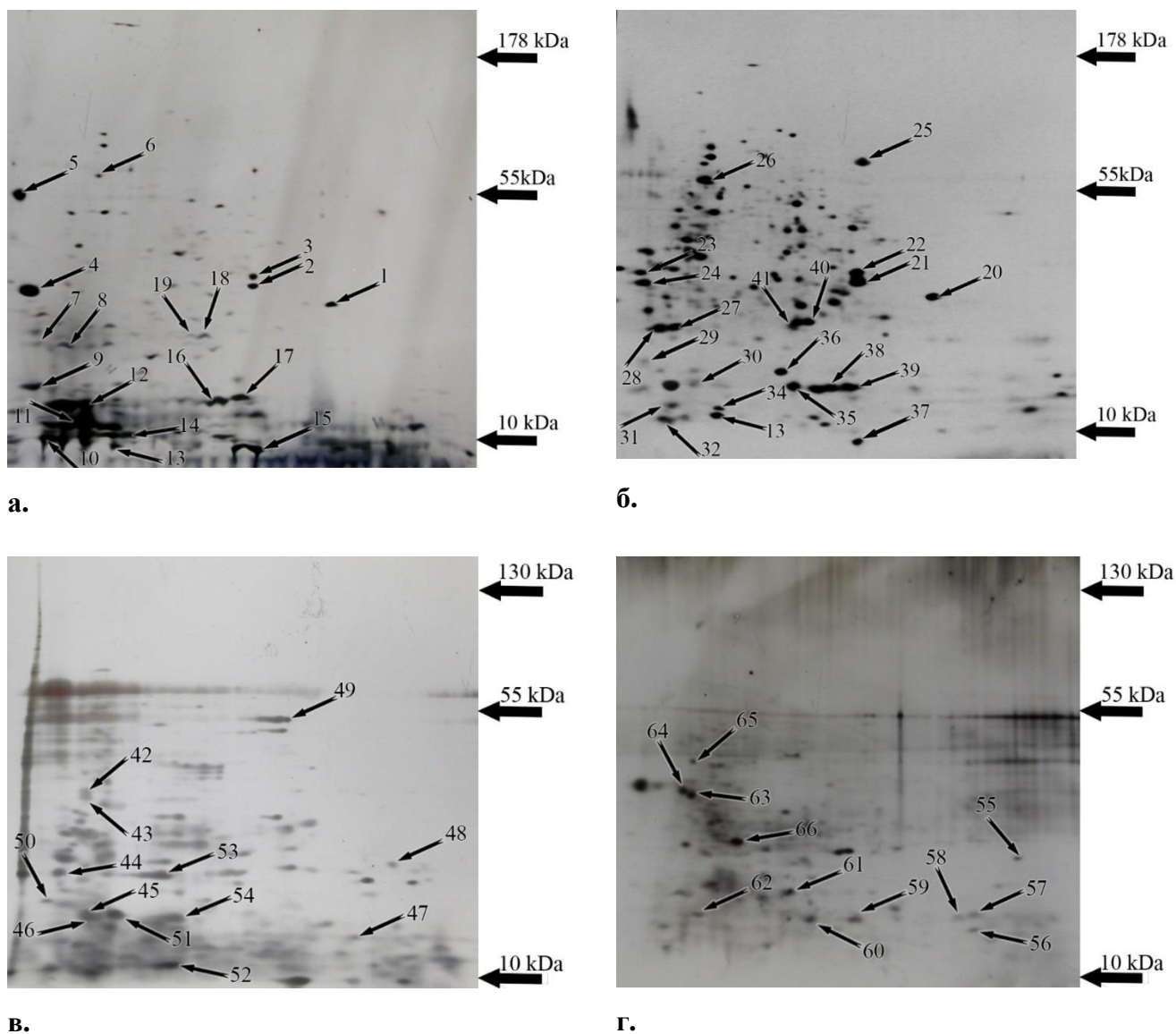
мембран ФХ, переходу катаболизма на  $\beta$ -окисление запасённых ТАГ, а также прекращении синтеза КЛ в случае КС.



**Рисунок 29.** Гипотетическая схема изменений метаболизма липидов *Y. lipolytica* при оптимальной температуре, в условиях ЩС, ТС и КС при утилизации глицерина.

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

Способность живых организмов адаптироваться к действию стрессорных факторов сопряжена с изменениями профиля экспрессии генов и, как следствие, изменениями на молекулярном и биохимическом уровнях. Механизмы адаптации к изменению температурных и осмотических параметров среды культивирования дрожжей, помимо изменения состава липидов мембран и накопления в цитозоле различных осмолитов и протекторных агентов, включает, главным образом, адаптивный синтез ряда стрессорных белков и общую перестройку клеточного метаболизма [353].



**Рисунок 30.** Карты двумерного электрофореза белковых экстрактов клеток *Y. lipolytica*, выращенных в разных условиях: а – оптимальные; б – ЩС, в – ТС, г – КС.

С целью изучения изменений протеома экстракты клеток, выращенных в оптимальных и стрессовых условиях, были разделены методом двумерного электрофореза белков по О'Фареллу, а затем пятна, интенсивность которых значительно различалась в различных условиях, были идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения дифференциально экспрессирующихся белков. Всего было идентифицировано 66 пятен, содержание которых в разных условиях заметно различалось. Наборы белков, характерных для различных условий культивирования, были сопоставлены между собой. Результаты сравнения этих наборов приведены на рис. 30, полный перечень белков представлен в приложении.

Было показано, что для оптимальных условий характерны 6 уникальных белков (табл. 4). Среди них один белок окислительного фосфорилирования –  $\alpha$ -субъединица АТФ-синтазы (YALI0F03179p, пятно 10); два структурных белка – маннопротеин клеточной стенки Pir1 (YALI0B20306p, пятно 5) и профилин (YALI0B07183p, пятно 13), а также тиол-специфичная пероксидаза (YALI0A19426p, пятно 19), необходимая для поддержания редокс-гомеостаза клетки. Такой набор белков может быть ассоциирован с активными процессами роста и деления клеток.

**Таблица 4. Белки, дифференциально экспрессируемые в оптимальных условиях**

№	Название белка	Код в базах NCBI или UniProt	S / M/ C *	Мм/pI	Мм/pI
				(Эксп.)**	(Расч.)**
5	YALI0B20306p (Маннопротеин клеточной стенки (Pir1))	Q6CDY2	169/5/15	50/4	29.7/4.2
7	YALI0F25289p (70 кДа БТШ)	Q6C0E9	96/9/14	21/4.2	70.4/4.6
9	YALI0F03179p ( $\alpha$ -субъединица АТФсинтазы)	Q6C326	149/16/16	12/4.5	58/4.8
13	YALI0B07183p (Профилин)	W0TYP0	108/7/70	9/5.8	13.4/5.7
14	YALI0B10450p (Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза)	Q6CF41	215/12/85	11/6.1	11.6/6.0
19	YALI0A19426p (тиол-специфичная пероксидаза)	Q6CGH1	118/7/42	23/6.7	24.6/5.9

\* S / M/ C - традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score - показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides - количество совпавших пептидов; Coverage - % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\* Мм/pI (эксп.) – полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/pI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности.

Результаты масс-спектрометрической идентификации белков, выделенных из клеток, выращенных в условиях ЩС, представлены в табл. 5. Для щелочных условий оказались уникальны 12 белков: 2 белка, связанных с процессом убиквитинирования: SCF-субъединица комплекса убиквитинлигазы E3 (YALI0A10879p, пятно 29) и активатор эндопептидазы (YALI0B09339, пятно 24),

другими уникальными для щелочных условий белками стали представители семейства HSP - малый 20-кДа HSP (YALI0C03443p, пятно 35) и представитель 70-кДа БТШ шаперон SSA1 (YALI0C17347p, пятно 34), а также  $\beta$ -субъединица незрелого полипептид-ассоциированного комплекса (YALIOF08393p, пятно 36), НАДФН-дегидрогеназа (YALIOB07007p, пятно 27), вовлеченная в метаболизм пуринов, бис(5'-аденозил)-трифосфатаза (YALIOE32736p, пятно 30), цепь IV цитохром-с-оксидазы (YALIOE19723p, пятно 27) и легкая цепь миозина (YALIOE03388p, пятно 31) (табл. 5).

**Таблица 5. Белки, индуцируемые при ЩС.**

№	Название белка	Код в базах NCBI или UniProt	S / M/ C *	Мм/pI (expt.)**	Мм/pI (calc.)**
24‡	YALIOB09339p (Активатор эндопептидазы)	Q6CF86	79/7/43	31.0/4.6	31.1/4.5
25	YALIOD00451p (Неохарактеризованный белок)	Q6CAS0	178/13/21	57.0/7.7	57.1/6.6
27‡	YALIOB07007p (НАДФН-дегидрогеназа)	Q6CFH1	81/12/87	22.0/4.8	20.2/5.30
27‡	YALIOD08184p (SSA4 – белок семейства 70 кДа БТШ, фрагмент)	Q6C9V0	115/27/28	21/4.8	70.3/4.9
28	YALIOF08327p (Неохарактеризованный белок)	Q6C2F6	111/7/51	22.0/4.6	14.7/4.6
29‡	YALIOA10879p (E3 субъединица SCF комплекса убиквитин-лигазы)	XP_499961	84/4/43	18.5/0/4.6	18.3/4.4
30‡	YALIOE32736p (Бис(5'-аденозил)-трифосфатаза)	XP_002143095.1	163/13/69	17.7/5.1	18.7/5.2
31‡	YALIOE03388p (Кальций-связывающий белок, легкая цепь миозина)	Q6C765	162/15/79	17.0/4.7	16.8/4.8
34	YALIOA10747p, (Предполагаемый белок созревания рибосом)	Q6CHA5	193/10/78	13.0/5.5	13.1/5.2
35‡	YALIOC03443p (Малый 20-кДа БТШ)	Q6CD64	135/13/79	17.5/6.2	17.3/5.6

36	YALIOF08393p (β- субъединица незрелого полипептид- ассоциированного комплекса)	XP_505159.1	279/20/92	18.3/5.50	17.3/5.5
41	YALIOC17347p, SSC1 (70-кДа БТШ, фрагмент)	Q6CBM2	148/15/28	22.5/6.2	70.0/5.4

\* S / M/ C - традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score - показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides - количество совпавших пептидов; Coverage - % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\* Мм/pI (эксп.) – полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/pI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности.

Кроме того, в числе индуцированных при щелочном стрессе белков оказались неохарактеризованный белок YALIOD00451p (пятно 25) и 70-кДа БТШ SSC1 (YALIOC17347p, пятно 41).

В процессе сравнительного анализа 2-D – гелей было выявлено 9 белков, для которых отмечалось увеличение экспрессии в условиях щелочного стресса (Табл. 6). Среди белков, содержание которых возрастало в щелочных условиях, - три белка фолдинга: пептидил-пролил-цис-транс-изомераза (YALIOC10230p, пятно 39) и 60-кДа БТШ-шаперон (YALIOF02805p, пятно 26), фрагмент белка SSA4 из семейства 70-кДа БТШ (YALIOD08184p, пятно 27), два белка гликолиза: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (YALIOC06369p, пятно 22) и триозофосфатизомераза (YALIOF05214p, пятно 40), митохондриальные белки: – VDAC (YALIOF17314p, пятно 20) и малатдегидрогеназа (YALIOD16753p, пятно 21), рибосомальный белок (A0A1H6Q0M6, пятно 33) и участник синтеза нуклеотидов (YALIOF09229p, пятно 35). Также повышалось содержание тропомиозина (YALIOF27049p, пятно 27). Среди белков, содержание которых снижалось при ЩС (табл. 7), были отмечены три белка окислительного фосфорилирования: δ-субъединица АТФ-синтазы (YALIOD22022p, пятно 29), цепь IV цитохром-с-оксидазы (YALIOE19723p, пятно 30) и VI субъединица цитохром-с-оксидазы (YALIOE10144p, пятно 31). Также уменьшалось содержание белка синтеза клеточной стенки (YALIOB03564p, пятно 23), 60-S рибосомального убиквитина (пятно 37) и тиоредоксина (YALIOF01496p, пятно 32).

**Таблица 6. Белки, экспрессия которых увеличивалась в условиях ШС**

№	Название белка	Код в базах NCBI или UniProt	S / M/ C *	Мм/pI (expt.)**	Мм/pI (calc.)**
20	YALI0E12134p (VDAC)	Q6C1D2	505/37/96	27.0/8.9	27/8.8
21	YALI0D16753p (Малатдегидрогеназа)	Q6C8V3	568/42/89	31.0/8.5	35.8/8.5
22	YALI0C06369p, Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (331 а.о.)	Q6CHQ6	325/28/68	32.0/8.5	35.8/6.6
26	YALI0F02805p, шаперон, 60-кДа БТШ (574 а.о.)	Q6C342	532/53/66	57.0/5.4	60.5/6.6
27‡	YALI0F27049p, Тропомииозин (161 а.о.)	Q6C081	300/30/91	22.5/4.8	18.6/4.9
33	A0A1H6Q0M6, 40S рибосомальный белок S14	A0A1H6Q0M6	287/14/72	9/5.8	15.4/5.7
35‡	YALI0F09229p, Нуклеозиддифосфаткиназа	Q6CF90	76/7/56	16/5.9	17.2/6.3
38	YALI0E12133p	Q6C662	200/14/91	15/6.7	15.9/5.9
39	YALI0C10230p, Пептидил-пролил цис-транс-изомераза	Q6CCD9	108/10/77	15/6.7	17.8/6.9
40	YALI0F05214p, Триозефосфатизомераза	Q6C2T9	401/28/91	23/6.5	26.7/6.3

**Таблица 7. Белки, экспрессия которых снижается при ШС.**

№	Название белка	Код в базах NCBI или UniProt	S / M/ C*	Мм/pI (expt.)*	Мм/pI (calc.)**
23	YALI0B03564p, проявляет активность 1,3-бета-глюканозилтрансферазы	Q6CFU7	302/23/68	33/4	34.1/4.5
29‡	YALI0D2202, δ-субъединица АТФ-синтазы	Q6C877	84/4/73	16/4	14.8/4.4
30‡	YALI0E19723p, IV цепь цитохром-с оксидазы	Q6C5A3	116/10/72	15/5	17.6/5.2
31‡	YALI0E10144p, субъединица VI цитохром-с оксидазы	Q6C6E6	93/15/45	12/4.5	17/4.8
32	YALI0F01496p, Тиоредоксин	Q6C399	162/16/81	10/4.2	11.5/4.6

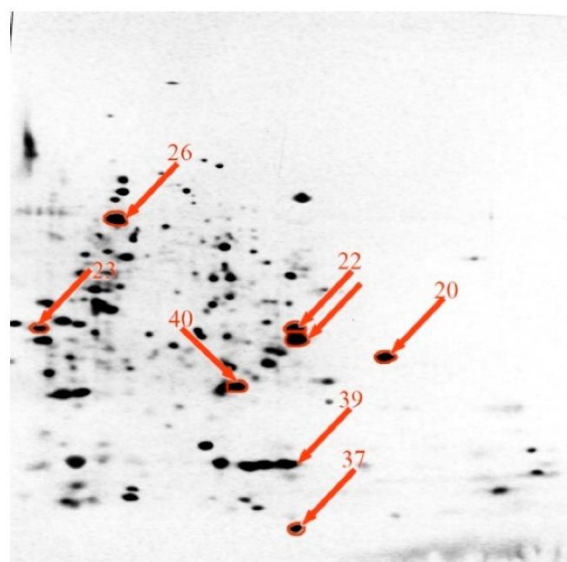


37	60S рибосомный белок L40, убиквитин	Q6C2D7	91/22/53	9/7	14.8/9.8
----	--	--------	----------	-----	----------

\* S / M/ C - традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score - показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides - количество совпавших пептидов; Coverage - % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\* Мм/рI (эксп.) – полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/рI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности.

При этом увеличение интенсивности пятен в 1,7 и более раз наблюдалось для 6 белков (рис. 31), среди которых VDAC, малатдегидрогеназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа пептидил-пролил-цис-транс-изомераза, и триозофосфатизомераза. Максимальное увеличение экспрессии наблюдалось для белков 40, 22 и 26 – в 3.3, 3.5 и 3.9 раз, соответственно. Для 1,3-бета-глюканозилтрансферазы (пятно 23) и убиквитина (пятно 37) наблюдалось снижение интенсивности на электрофореграмме в 0.4 и 0.68 раз, соответственно. Единственным белком, содержание которого заметно не изменялось, стала Cu/Zn СОД (YALI0E12133p, пятно 16).



а.

б.

**Рисунок 31. Сравнительный протеомный анализ влияния ЩС на экспрессию белков. Стрелками отмечены белки *Y. lipolytica*, уровни экспрессии которых наиболее заметно отличались при оптимальных условиях – а; условиях ЩС – б. Белки, экспрессия которых усиливалась в оптимальных условиях, отмечены синими стрелками, в условиях ЩС – красными.**

Одним из белков, характерных для оптимальных условий, являлся структурный белок YALI0B20306p (маннопротеин клеточной стенки). Известно, что клеточная стенка дрожжей является основным барьером, обеспечивающим осмотическую стабильность клетки и защищающим ее от щелочной среды. Ее состав главным образом представлен нейтральными углеводами (70%), аминосохарами (7%), белками (15%), липидами (5%), фосфатами (0.8%). В качестве основных структурных и запасующих полисахаридов стенки *Y. lipolytica* обычно содержат маннан,  $\beta$ -глюкан и хитин, причем маннаны подвергаются щелочному гидролизу в отличие от глюканов и хитина [354; 355; 356]. Маннаны обычно присутствуют в наружной части стенки, тогда как внутренняя поверхность представлена хитинами и глюканами. Маннопротеины ковалентно связаны с маннанами клеточной стенки через N-гликозидные или O-гликозидные связи, причем последние более лабильны в щелочной среде [356]. Возможно, обнаружение маннопротеина YALI0B20306p только в образцах дрожжей, выращенных в оптимальных условиях, связано именно с нестабильностью этого белка при ЩС, а также при температуре 37°C.

Наибольшую роль в поддержании нативной конформации белков в условиях осмотического стресса играют шапероны. В условиях щелочных pH отмечено значительное (в 9.6 раза) возрастание доли 60 кДа БТШ YALI0F02805p, относящегося к семейству БТШ-шаперонов, поддерживающих синтез и конформацию митохондриальных белков. Как было показано ранее, шапероны семейства 60 кДа БТШ, участвуют в фолдинге и посттрансляционных изменениях белков митохондриальных мультиферментных комплексов и импортируемых белков, синтезируемых на внутренней мембране митохондрий [357]. Данные STRING database (<http://string-db.org/>) показывают взаимодействие YALI0F02805p с шаперонами семейства 70 кДа БТШ и шаперонинами семейства GroES, а также с  $\beta$ -субъединицей АТФ-синтазы у *Y. lipolytica* (рис. 32, а). По-видимому, при адаптации к щелочным условиям возрастает роль шаперонов семейства 60 кДа БТШ для поддержания конформации белков. При pH 9,0 отмечено также появление белка

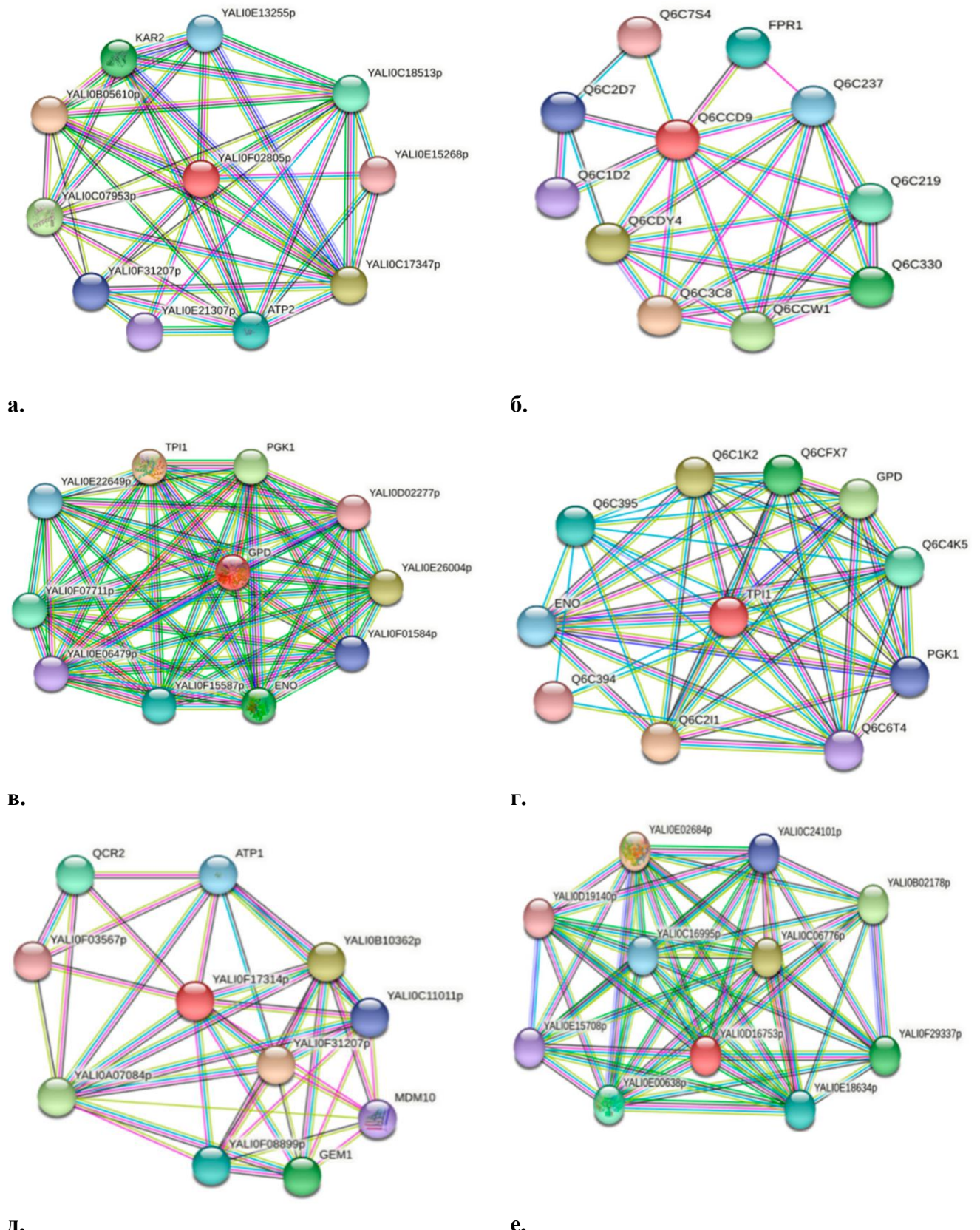


Рисунок 32. Анализ функциональных взаимосвязей и/ или взаимодействий белков, экспрессия которых возрастает при ИС: шаперон семейства 60 кДа БТШ (YALIOF02805p) – а; пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы (YALIOC10230p) – б; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (YALIOC06369p) – в; триозофосфатизомеразы (YALIOF05214p) – г; VDAC (YALIOF17314p) – д; малатдегидрогеназа (YALIOD16753p) – е.

семейства 70 кДа БТШ SSC1 (LI0C17347p), взаимодействующего с 60 кДа БТШ, и малым 20 кДа БТШ (YALI0C03443p).

Наряду с этим, отмечено увеличение доли пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы YALI0C10230g, облегчающей фолдинг цитоплазматических белков. По данным базы STRING, белок YALI0C10230g имеет тесные взаимодействия с системой деацетилирования гистонов (белками YALI0B20262p и гистоновой деацетилаза), которая регулирует транскрипционные процессы в этих условиях [358]. Уменьшение доли 60S-рибосомального убиквитина (пятно 37), контролирующего сборку рибосом и появление 26S-рибосомальной регуляторной единицы YALI0B09339p (пятно 24) также указывают на некоторые нарушения в сборке рибосом при росте в щелочной среде.

Одним из белков, индукция которого активировалась при щелочных pH среды, являлась глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа YALI0C06369p (пятно 22). Важную роль в адаптации *Y. lipolytica* к росту на глицерине при щелочных pH играет изменение углеводного обмена. Ранее было отмечено, что при росте в щелочных условиях наблюдалось некоторое снижение накопления запасящих липидов на 25-27% и растворимых углеводов цитозоля при снижении доли глюкозы в 1.6 раза. Маннит при этом оставался основным углеводом, в то время как глюкоза составляла не более 5.5% пула растворимых углеводов. Согласно данным [359], рост на глицерине у *Y. lipolytica* сопряжен с более высоким потреблением кислорода по сравнению с ростом на глюкозе, что предполагает вовлечение глицерина в центральный метаболизм углерода с участием глицерол-3-дегидрогеназы, связанной с митохондриальной мембраной. Это предположение подтверждается тем, что белок тесно взаимодействует с ферментами гликолиза фосфоглицераткиназой, глюкозо-6-фосфатизомеразой и триозофосфатизомеразой. Глицеральдегид-3-фосфатизомераза взаимодействует с триозофосфатизомеразой (YALI0F05214p, пятно 40) - еще одним ферментом, экспрессия которого возрастает в 3.3 раза в щелочных условиях. Ранее это было отмечено в работе [360]. Выявленная в ходе исследования активация триозофосфатизомеразы и сдвигом превращения образовавшегося дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат и далее в глицерат-1,3-

бисфосфат с образованием NADH на фоне активации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. При этом можно ожидать некоторого снижения направления метаболитов на глюконеогенез, но сохранения общей схемы образования углеводов (маннита) и липидов, показанной нами ранее (см. разд. 3.4.1. и 3.4.2.). Физиологическая функция триозофосфатизомеразы заключается в регулировании быстрого равновесия между дигидроксиацетонфосфатом и глицеральдегид-3-фосфатом, образующимся альдолазой при гликолизе, который связан с пентозофосфатным путем и метаболизмом липидов.

В протеоме клеток, выращенных в условиях щелочного стресса, было выявлено увеличение содержания митохондриального порина VDAC (YALI0E12134p, пятно 20) в 2.2 раза, что согласуется с предыдущими исследованиями нашего коллектива, выполненными на штамме *Yarrowia lipolytica* Polf [360]. Известно, что VDAC относится к консервативным митохондриальным белкам, регулирующим транспорт метаболитов между митохондриями и цитоплазмой как в физиологических, так и стрессовых условиях [361]. VDAC также вовлечен в регуляцию дыхания, гомеостаз АФК, стрессотолерантность дрожжей. Мутанты *S. cerevisiae* по гену, кодирующему митохондриальный порин, гиперчувствительны к росту на несбраживаемых субстратах (глицерин) из-за снижения дыхательной активности [362]. Была показана положительная роль VDAC в передаче сигналов углерод-энергетического стресса путем обеспечения ядерной локализации факторов трансдукции сигнала AMPK/Snf1. Протеинкиназа Snf1 относится к семейству АМФ-активируемых протеинкиназ (АМПК). Положительная регуляция AMPK/Snf1 с участием VDAC была установлена на дрожжах *S. cerevisiae*, однако консервативность этих белков у эукариот позволяет предположить, что выявленная закономерность распространяется и на другие организмы [363].

VDAC обеспечивает также синтез КЛ и ФЭ на внутренней мембране митохондрий, осуществляя транспорт их предшественников – ФК и ФС [364]. Увеличение содержания VDAC при росте культуры в условиях ЩС сопровождается с ростом доли ФК в мембранных липидах в 1,6 раза (см. главу 3.4.2.2.). Порин

находится в тесном взаимодействии с белками YALI0F31207p, YALI0B10362p и YALI0A07084p (рис. 32), обладающими пориновой активностью и способностью к импорту белков в митохондрии, а также с митохондриальной ГТФ-азой и АТФ-азой митохондрий.

При росте в условиях ЩС у дрожжей наблюдалось повышение доли митохондриального белка малатдегидрогеназы YALI0D16753p (пятно 21), участвующего в углеводном обмене. Малатдегидрогеназа является митохондриальным белком, катализирующим превращение малата в оксалоацетат в ЦТК с образованием НАДН [365]. Для белка YALI0D16753p было показано увеличение экспрессии в 2.9 раза при росте в условиях ЩС. Активация малатдегидрогеназы может способствовать ускорению образования цитрата и его направления на синтез липидов. Эти предположения подтверждаются данными STRING о тесной взаимосвязи фермента с цитратсинтазами YALI0E02684p и YALI0E00638p и фумаратгидратазой YALI0C06776p (рис. 32). Наряду с подтверждением роли VDAC в адаптации к ЩС, активация малатдегидрогеназы указывает на важную роль митохондрий в метаболической адаптации к этим условиям.

Повышение температуры культивирования от 29°C до 38°C сопровождалось изменением протеомного состава клеток, причем, как и в случае роста дрожжей в условиях ЩС, происходило исчезновение белков YALI0B20306p (пятно 5) YALI0B03564p (пятно 23). Возможно, эти изменения связаны с термолабильностью гликозидных связей в этих условиях. Наблюдалось также исчезновение VDAC. ТС индуцировал синтез 12 уникальных белков (табл. 8), что сопровождалось замещением одних белков с шаперонными свойствами на другие.



**Таблица 8. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS / MS) фракций белков клеток *Y. lipolytica*, дифференциально экспрессирующихся по отношению к контролю в условиях ТС.**

№	Название белка	Код в базах NCBI или UniProt	S / M/ C *	Мм/pI (expt.)**	Мм/pI (calc.)**
42	YALI0D22352p, SSA4, БТШ	Q6C864	112/4/9	34/5.0	70.1/5.1
43	CPAR2_700380, 70-кДа БТШ	G8BL45	141/10/27	36/5.0	61.2/5.0
43	CPAR2_106080, Митохондриальный импортер, транслоказа внутренней мембраны TIM 40	G8B7Y8	129/7/18.5	36/5.0	33/5.2
44	YAL10E35046p, SSA4, БТШ	Q6C3G5	84/5/9	23/4.5	70.1/5.0
45	YAL10F20856p, Кофилин	Q6C0Y0	83/2/10	18/5	17.02/5.3
46	CPAR2_203450, Формиатдегидрогеназа	G8BFR8	127/5/15	17/5.0	15.0/5.7
47	CPAR2_401230, Фруктозо-бисфосфатальдолаза	G8BI56	137/4/13	17/8.0	39.8/5.4
48	Q0ZIC1_CANPA, ГТФаза, цитоплазматический фактор элонгации 1 $\alpha$	Q0ZIC1	148/6/33	23/8.7	27.4/8.5
49	CPAR2_802980	G8BC83	250/15/27	20/4.0	56.4/6.5
50, 51	YALI0B22506p, Формиатдегидрогеназа	Q6CDN8	86/5/18	20/5.3	40.3/6.5
52	CPAR2_200490, Тиоредоксин	G8BEL7	172/4/50	11/6.5	11.3/5.3
53	YALI0D22352p, SSA4, БТШ	Q6C864	173/18/31	23/62	70.5/5.1
54	CPAR2_500390, Cu/Zn СОД	G8BH89	201/12/68	16/6.5	16.2/5.4

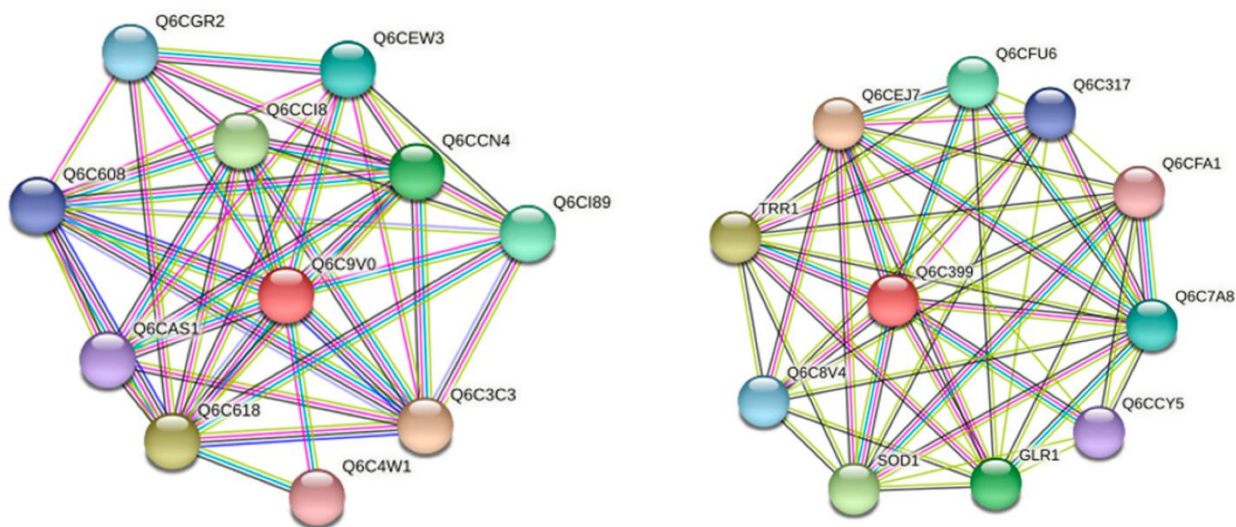
\* S / M/ C - традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score - показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides - количество совпавших пептидов; Coverage - % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\* Мм/pI (эксп.) – полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/pI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности.

Знаком † отмечены белки, которые входят в состав смесей, образующих белковые пятна.

Так, было отмечено появление следующих белков: SSA4 из семейства 70-кДа БТШ (YALI0D22352p, YAL10E35046p и YALI0D22352p, пятна 42, 44 и 53, соответственно), 70 кДа БТШ (CPAR2\_700380, пятно 43). Согласно данным базы STRING (рис. 33), белок YALI0D22352p находится во взаимодействии с белками с шаперонными свойствами YAL10F00880p и YAL10C07953p, вовлеченными в ответ

на ТС (рис 33, а). Кроме того, в сети взаимодействий находятся БТШ YALI0C08987p и YALI0A00594p, также отвечающие за структурную и функциональную целостность белков клетки. Также в составе взаимодействующих белков был выявлен клатрин, участвующий в клатрин-опосредованном эндоцитозе, необходимом для поглощения веществ в ходе эндоцитоза и регуляцию активности трансмембранных переносчиков аминокислот, глюкозы, ионов и т. д. [366].



а.

б.

**Рисунок 33. Анализ функциональных взаимосвязей и/ или взаимодействий белков, экспрессия которых возрастает при ТС: 70 кДа БТШ SSA4 (YALI0D08184p, YALI0D22352p) – а; тиоредоксин (SPAR2\_200490) – б.**

ТС приводил к появлению в протеоме новых белков, отвечающих за рибосомальный синтез: фактор  $\alpha$ -1 элонгации цитоплазматической ГТФ-азы (Q0ZIC1\_CANPA, пятно 48), а также белков, поддерживающих структурную организацию клетки, в частности, кофилина, взаимодействующего с актином (YALI0F20856p, пятно 45), белков антиоксидантной защиты – тиоредоксина (SPAR2\_200490, пятно 52), а также трех формилдегидрогеназ - SPAR2\_203450 (пятно 46), YALI0B22506p (пятно 50, фрагмент) и SPAR2\_203450 (пятно 51). Семейство кофилинов включает важнейшие актин-связывающие белки, имеющие высокую степень консервативности от низших эукариот до млекопитающих, являясь основными регуляторами динамики актина [367; 368]. Возможно, в условиях ТС происходит существенная перестройка цитоскелета. Известно, что на



активность кофилина влияют окислительно-восстановительные модификации остатков цистеина через дисульфидные связи, S-глутатионилирование и S-нитрозилирования [368]. Окисленный кофилин дефосфорилируется по Ser-3, что, в свою очередь, ухудшает его актин-деполимеризирующую функцию. Следовательно, кофилины играют многогранную роль в клетках, находящихся в различных патологических условиях, которые имеют место при высоких температурах. Была отмечена также индукция фруктозо-бифосфатаальдозы (CPAR2\_401230, пятно 47), участвующей в гликолизе и глюконеогенезе, и неохарактеризованного белка CPAR2\_802980 (пятно 49). По-видимому, в условиях ТС роль рибосомального убиквитина играют появляющиеся шапероны.

В условиях ТС основным углеводом цитозоля является трегалоза. Как показано в работе [369], трегалоза необходима *Y. lipolytica* для выживания в условиях повышенной температуры. Такие изменения в составе углеводов цитозоля находят отражение в протеомном профиле. Появление в протеоме фруктозобифосфат-альдозы (CPAR2\_401230, пятно 47) в протеоме растущих на глицерине дрожжей свидетельствует об активации глюконеогенеза, необходимого для синтеза трегалозы. Следует отметить, что хотя трегалоза оказывает ингибирующее действие на активность целого ряда гликолитических ферментов *in vitro*, наблюдающаяся ассоциация ферментов в условиях окислительного стресса этот эффект снимает [370]. Вероятно, снижение экспрессии антиоксидантных ферментов в этих условиях может частично компенсироваться трегалозой, проявляющей антиоксидантные свойства.

Появление тиоредоксина (CPAR2\_200490, пятно 52) в клетках *Y. lipolytica*, культивируемых в условиях ТС является, по-видимому, следствием антиоксидантного клеточного ответа. Тиоредоксиновая система включает три взаимодействующих окислительно-восстановительных белка: тиоредоксин, тиоредоксинредуктазу, тиоредоксинпероксидазу и НАДФН в качестве источника протонов [371]. По данным STRING, тиоредоксин, помимо участников тиоредоксина системы, взаимодействует с глутатионредуктазой,

сульфиредоксином и Cu/Zn СОД, что подтверждает высокий адаптивный ответ клеток на окислительный стресс в этих условиях.

Появление НАД<sup>+</sup>-зависимых формиадегидрогеназ и других представителей дегидрогеназ D-2-гидроксикислот, по-видимому, связано с усилением катаболических процессов и активацией метаболизма одноуглеродных остатков. Появление формальдегида в клетках предположительно может происходить при деметилировании ДНК, катаболизме серина, метионина, пуриновых оснований [372]. Формиадегидрогеназы широко распространены в природе. Формальдегид является одним из продуктов метаболизма одноуглеродных молекул и может образовываться в ходе катаболизма серина, метионина, пуриновых оснований. Появлению формальдегида или метанола, субстратов формиадегидрогеназы, способствуют реакции деметилирования ДНК. Функционируя в совокупности с НАД<sup>+</sup>-зависимой формальдегиддегидрогеназой и НАД<sup>+</sup>-зависимой алкогольдегидрогеназой, эти ферменты вносят большой вклад в производство НАДН путем окисления соответствующих субстратов: формиаата, формальдегида и метанола [373]. В свою очередь, можно предположить, что восполнение пула восстановительных эквивалентов может быть использовано в реакциях глюконеогенеза, необходимого для синтеза трегалозы.

Список белков, экспрессия которых индуцируется в условиях КС приведены в табл. 9.

**Таблица 9. Белки, индуцируемые при КС.**

№	Название белка	Код в базах NCBI или UniProt	S/M/C*	Мм/pI (expt.)**	Мм/pI (calc.)**
55	CPAR2_503440 (субъединица 5 АТФ-синтазы)	G8BGX1	141/3/27	20/9.5	23.1/9.7
56	CPCR1 (Карбонилредуктаза)	H9DXW0	92/3/15	14/8.7	37.1/6.3
57	CPAR2_207060 (Фактор α-1 элонгации цитоплазматической ГТФ-азы)	G8BCR8	125/3/7	14/8.5	50/9.1
58	CPCR1 (Карбонилредуктаза)	H9DXW0	99/6/16	12/8.7	37.1/6.3
59	CPAR2_101390 (Нуклеозид-дифосфаткиназа)	G8B6L9	142/9/39	13/7	16.8/8.6

60	CPAR2_808670 (Глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназа)	G8BB94	114/7/30	13/6.5	36.1/6.2
61	CPAR2_500390 (Cu/Zn СОД)	G8BH89	148/7/61	16/6.9	16/5.4
62	CPAR2_406210 (Белок, содержащий SBDS-домен)	G8BJK2	82/4/30	13/5.3	12.5/4.8
63, 64	CPAR2_700380 (70-кДа БТШ)	G8BL45	146/13/26	30/5	61/5.0
65	CPAR2_402950 (Компонент $\beta$ - субъединицы E1 пируватдегидрогеназы)	G8BIM8	142/3/10	40/5	42.1/5.0
66	Шаперон семейства 70-кДа БТШ	H8X9S4	132/9/38	23/5	22.7/5.7

\* S / M / C - традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score - показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides - количество совпавших пептидов; Coverage - % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.

\*\* Мм/pI (эксп.) – полученные оценки по результатам электрофоретической подвижности на ДЭ, а Мм/pI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности.

Общими для ТС и КС оказались следующие белки: (Cu/Zn СОД (CPAR2\_500390, пятна 54 и 61) и 30-кДа фрагменты белка, относящегося к семейству 70-кДа БТШ (CPAR2\_700380, пятна 63, 64 и 43). При комбинированном стрессовом воздействии индуцировался синтез 9 уникальных белков. Среди них два белка, связанных с процессом трансляции: это фактор элонгации (CPAR2\_20706, пятно 57), а также необходимый для сборки рибосом белок, содержащий SBDS-домен (CPAR2\_406210, пятно 62). Среди белков энергетического метаболизма появлялась субъединица АТФ-азы (CPAR2\_503440, пятно 55) и субъединица пируватдегидрогеназы (CPAR2\_402950, пятно 65). При этом обнаруживался 12 кДа фрагмент 36 кДа глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (CPAR2\_808670, пятно 60). Также были идентифицированы два 12-кДа фрагмента двух разных карбонилредуктаз CPCR1 и CPAR2\_502580 (пятна 56 и 58). Ещё два уникальных белка, обнаруженных в неизменном виде, – нуклеозиддифосфаткиназа (CPAR2\_101390, пятно 59) и 22 кДа шаперон семейства 70 кДа БТШ Ssa2 (пятно 66).

Важно отметить, что изменения протеома, характерные для условий КС, заметно отличались как от изменений, индуцируемых ЩС, так и при ТС. Это выражалось в изменении состава шаперонов: пятна 63, 64 и 66 были характерны для условий КС, однако отсутствовали характерные для ЩС пятна 26, 27, 35, 41 (табл.

5) и характерные для ТС пятна 43, 44, 53 (табл. 8). Все появившиеся в условиях КС шапероны относились к семейству 70 кДа БТШ.

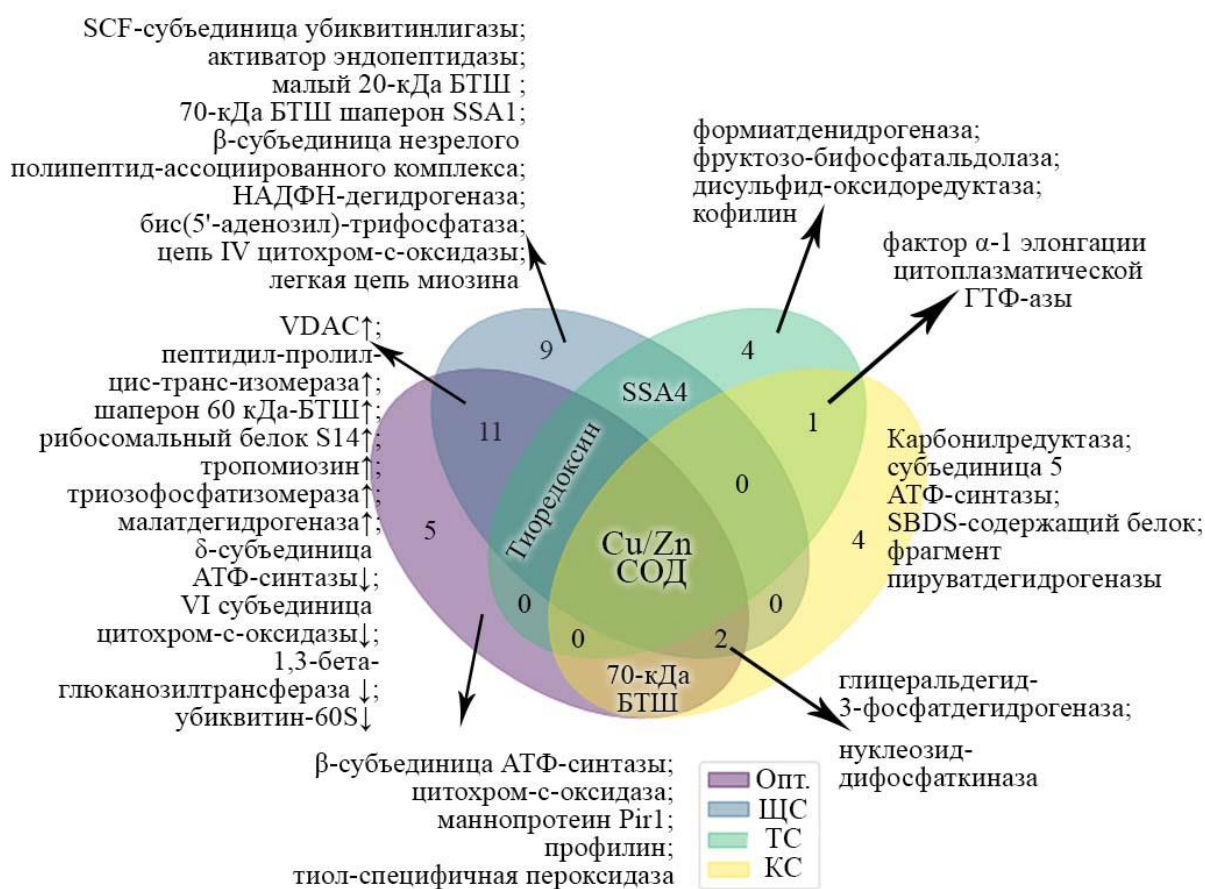
Уникальными для КС белками стали карбонилредуктазы (пятна 56 и 58), принадлежащие к обширному семейству алкогольдегидрогеназ. Их специфическая функция состоит в асимметричном восстановлении ряда алифатических и ароматических кетонов и дикетонов, кетокислот, эфиров и амидов. Карбонилредуктазы крайне стереоспецифичны, а в качестве кофактора предпочтительно используют НАДН, но не НАДФН [374], так как последний является более термолабильным. В отличие от большинства ферментов, карбонилредуктазы очень стабильны в присутствии низкомолекулярных спиртов, таких как изопропанол. Так, например, карбонилредуктаза *C. parapsilosis* (CPCR; EC 1.1.1.1) способна катализировать асимметричное восстановление алифатических и ароматических кетонов и дикетонов [375]. Обнаружение в условиях КС пятен, соответствующих карбонилредуктазам, указывает на индукцию катаболических процессов, связанных с обезвреживанием повреждённых в условиях КС белков и липидов.

Восстановление ДНК и поддержание функции аппарата синтеза белка играет важную роль в обеспечении жизнеспособности клеток в условиях КС. Это, по-видимому, приводит к увеличению содержания белка, содержащего SBDS-домен (пятно 62), фактора элонгации 1 (пятно 57), и нуклеозиддифосфаткиназы (пятно 59), табл. 9.

Рост при повышенном значении рН и/или повышенной температуре приводит к изменению индукции ферментов гликолиза/гликонеогенеза, вовлеченных в переключение путей катаболизма источников углерода, вызывая изменение углеводного состава клеток. В условиях КС количество белков-участников метаболизма углеводов также изменялось. Увеличение экспрессии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (пятно 60) и пируватдегидрогеназы (пятно 65) (Табл. 9) может быть связано с необходимостью перенаправления пирувата на синтез ЖК. Как было показано ранее (см. главу 3.4.2.1.), в условиях КС количество запасных липидов снижается, а ТАГ в их составе частично замещаются на ДАГ и МАГ. Это

может происходить из-за того, что в условиях КС клетки испытывают большую потребность в энергии для синтеза белка. Увеличенная экспрессия 5 субъединицы АТФ-синтазы 5 (пятно 55) (Таблица 9) также согласуется с данной гипотезой [376].

Так как для некоторых условий культивирования не было обнаружено общих белков, дифференциально экспрессируемых по отношению к контролю, был проведен сравнительный анализ наборов белков, характерных для ШС, ТС и КС в зависимости от их функции. Некоторые белковые пятна содержали смесь нескольких белков, а также короткие фрагменты известных белков. Примечательно, что белки SPAR2, согласно базе данных Matrix Science, классифицируются как принадлежащие дрожжам *C. parapsilosis*. В условиях стресса культура *Y lipolytica*, вероятно, синтезируют некоторые неизвестные формы этих белков, более близкие к формам *C. parapsilosis*.



**Рисунок 34. Сравнение профилей экспрессии белков клетками *Y.lipolytica*, выращенными в разных условиях.**

На рис. 34 представлен результат сравнения функций белков в виде диаграммы Вьенна. Среди белков, идентифицированных для оптимальных условий, уникальной функцией обладали четыре. Среди них  $\beta$ -субъединица АТР-синтазы (YALI0F03179p), два структурных белка – маннопротеин Pir1 (YALI0B20306p) и профилин (YALI0B07183p); тиол-специфичная пероксидаза (YALI0A19426p), необходимая для поддержания редокс-статуса клетки. Такой набор белков может быть ассоциирован с активным ростом и делением клеток.

Уникальные для ЩС белки были вовлечены в процессы убиквитинирования, SCF-субъединица комплекса убиквитинлигазы (YALI0A10879p) и активатор эндопептидазы (YALI0B09339); также было отмечено несколько БТШ - малый 20 кДа HSP34 и шаперон семейства 70 кДа БТШ SSA1 (YALI0C17347p); также была обнаружена  $\beta$ -субъединица незрелого полипептид-ассоциированного комплекса (YALI0F08393p). Все эти белки участвуют в системе контроля качества белка, синтезируемого *de novo* [377], что необходимо для продолжительного выживания культур клеток в условиях окислительного стресса. НАДФН-дегидрогеназа (YALI0B07007p), участвующая в метаболизме пуринов бис-(5'-аденозил)-триозофосфатаза (YALI0E32736p), цепь IV цитохром-с-оксидазы (YALI0E19723p), и лёгкая цепь миозина (YALI0E0E033) – четыре остальных белка, необходимых при ЩС (рис. 34). Девять функций белков оказались характерны для оптимальных условий и ЩС. Экспрессия четырёх из них снижалась в условиях ЩС. Два из этих четырёх – белки окислительного фосфорилирования -  $\delta$ -субъединица АТФ-синтазы (YALI0D22022p) и субъединица VI цитохром-с-оксидазного комплекса (YALI0E10144p). 1,3- $\beta$ -глюканозилтрансфераза (YALI0B03564p) и убиквитин-60S, вовлеченные в метаболизм углеводов, также снижали свою экспрессию в условиях ЩС.

Экспрессия семи белков увеличивалась в условиях ЩС (рис. 34). Это митохондриальный порин VDAC (YALI0F17314p), два белка фолдинга – пептидил-пролил-цис-транс-изомераза (YALI0C10230p), и 60 кДа БТШ-шаперон (YALI0F02805p). Также ЩС приводил к увеличению экспрессии 40S-

рибосомального белка S14 (A0A1H6Q0M6), тропомиозина (YALI0F27049p), необходимого для клеточного транспорта и деления, фермента гликолиза триозофосфатизомеразы (YALI0F05214p) и малатдегидрогеназы (YALI0D16753p) – фермента ЦТК (рис. 34). Изменения протеомного профиля клеток в условиях ЩС ограничены ключевыми потребностями клетки: с одной стороны, это снижение повреждающего действия АФК при помощи регуляции цитохром-с-оксидазы через субъединицы IV и VI [378], или при помощи переключения энергетического метаболизма на гликолиз и  $\beta$ -окисление липидов. Стоит отметить, что VDAC играет ключевую роль в регуляции переключения между различными субстратами [379]. С другой стороны, для роста в стрессовых условиях клеткам необходимо контролировать качество белка, синтезируемого *de novo*, на разных уровнях структурной организации, что позволяет клеткам дрожжей избегать репликативного старения в неблагоприятных условиях [253].

Для ТС уникальными становятся 4 функции белков. Это формиатдегидрогеназа (обнаруженная в виде двух различных фрагментов белка YALI0B22506p и целого белка SPAR2\_203450), фруктозобифосфатаальдолаза (SPAR2\_401230), дисульфидоксидоредуктаза (SPAR2\_106080), и кофилин (YALI0F20856p). Формиатдегидрогеназа окисляет формиат до  $\text{CO}_2$ , одновременно восстанавливая  $\text{НАД}^+$  до НАДН. Значение этого процесса для защиты клеток против окислительного стресса было показано для некоторых видов дрожжей и растений [253]. Дисульфидоксидоредуктаза, а также усиление роли гликолиза также могут снижать повреждающее воздействие АФК. Белки семейства 70 кДа БТШ также могут выполнять некоторые цитопротекторные функции: фолдинг, дезагрегация, деградация повреждённых белков.

Как в условиях ТС, так и в условиях ЩС появлялись 70 кДа БТШ семейства SSA4. При этом в условиях ЩС был выявлен белок YALI0D08184p, в то время как в условиях ТС – фрагменты белков YALI0D22352p и YALI0E35046p. Кроме того, и в условиях ТС, и ЩС были обнаружены неохарактеризованные белки: YALI0D00451p, YALI0F08327p им YALI0A10747p при ТС; а также SPAR2\_802980 при ЩС.

Общими для ТС и ЩС оказались 70 кДа 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, YALIOF08327p и YALI0A10747p при ЩС, а также SPAR2\_802980 при ТС.

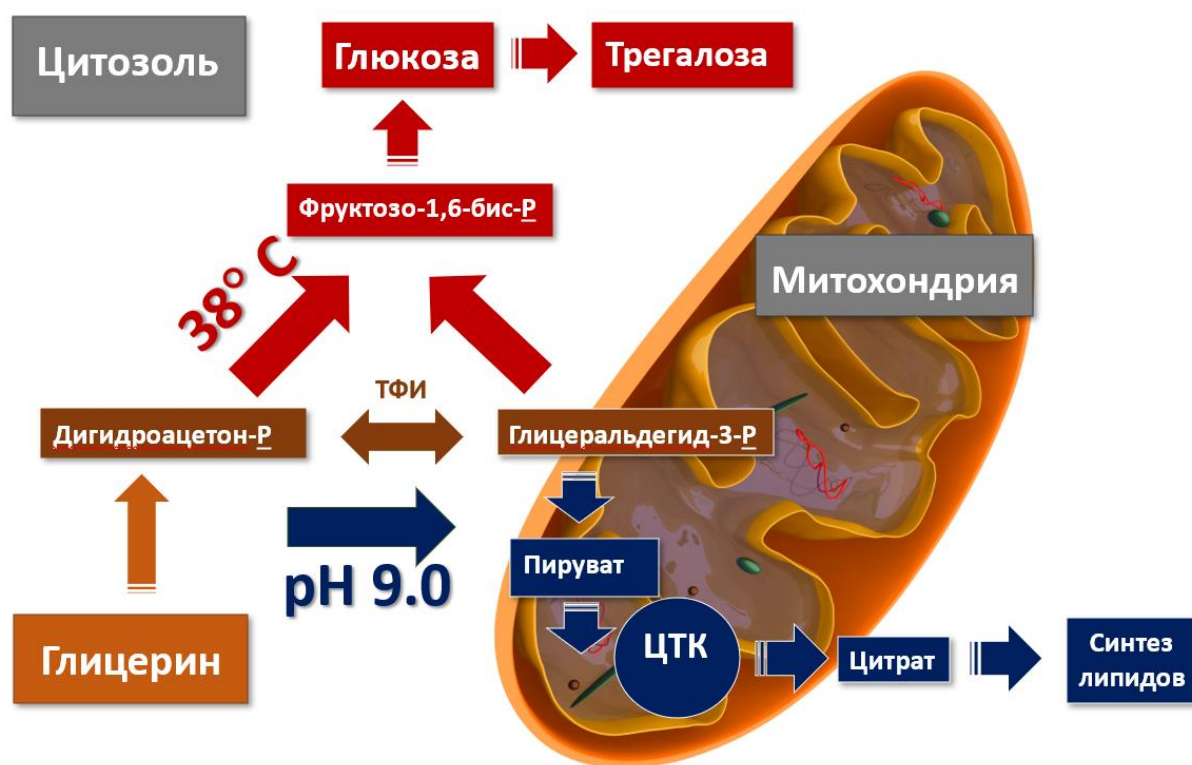
В условиях КС было отмечено 4 уникальных белковых функции. Во-первых, были обнаружены две карбонилредуктазы: CPCR1 (в виде фрагмента) и SPAR2\_502580. Известно, что эти ферменты необходимы для обезвреживания цитотоксичных продуктов перекисного окисления липидов [381; 382]. Субъединица 5 АТФ-азы SPAR2\_503440, содержащий SBDS-домен белок SPAR2\_406210, участвующий в генерации рибосом, и фрагмент пируватдегидрогеназы SPAR2\_402950 составили оставшиеся уникальные для КС белки.

Фактор элонгации  $\alpha$ -1 цитоплазматической ГТФазы оказался единственным белком, характерным как для КС, так и для ТС. В условиях ТС это был белок Q0ZIC1\_CANPA, в то время как в условиях КС – фрагмент SPAR2\_207060. Примечательно, что для ЩС и КС не было обнаружено белков с общими функциями. БТШ семейства SSA4, характерные как для ЩС, так и для ТС, не были отмечены для условий КС. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (YALIOC06369p в оптимальных условиях и при ЩС и SPAR2\_808670 в условиях КС), также как нуклеозид-дифосфаткиназа (YALIOF09229p в оптимальных и щелочных условиях и фрагмент SPAR2-101390) были обнаружены в оптимальных условиях, а также при КС и ЩС. 70-кДа БТШ – SPAR2\_700380 при КС, и фрагмент YALIOF25289p, обнаруженный в оптимальных условиях – оказались общими для оптимальных условий и КС. Тиоредоксин оказался общим для оптимальных условий, а также ЩС и ТС: SPAR2\_200490 был обнаружен в условиях ТС, а YALIOF01496p – в оптимальных условиях и при ЩС, причём уровень последнего возрастал в стрессовых условиях.

Наконец, Cu/Zn СОД была обнаружена во всех вариантах. В оптимальных и щелочных условиях она была представлена белком YALIOE12133p, причём уровень этого белка возрастал при ЩС. В условиях ТС этот фермент был представлен белком



SPAR2\_500390, а при КС он был обнаружен в виде фрагмента. Таким образом, Cu/Zn СОД, тиоредоксин и различные варианты шаперонов семейства 70 кДа являются наиболее универсальными цитопротекторными агентами. Регуляция активности цитохром с оксидазного комплекса и увеличение количества VDAC составили факторы адаптации к ЩС. При адаптации к ТС формиатдегидрогеназа оказалась уникальным цитопротекторным ферментом, а для КС таким ферментом стала карбонилредуктаза.



**Рисунок 35.** Гипотетические пути утилизации глицерина в клетках *Y. lipolytica* в условиях ТС и ЩС. При повышении температуры глицерин метаболизируется с образованием глюкозы в ходе глюконеогенеза, происходящего в цитоплазме. Образованная таким образом глюкоза расходуется на синтез трегалозы. При ЩС происходит сдвиг в сторону окислительного метаболизма с образованием пирувата из глицеральдегид-3-фосфата в митохондриях. Пируват затем используется в ЦТК, продукты которого участвуют в синтезе липидов.

На основании полученных результатов нами была составлена гипотетическая схема утилизации глицерина клетками *Y. lipolytica* в условиях ТС и ЩС (рис. 35). В условиях ЩС метаболизм смещается в сторону окисления глицеральдегид-3-фосфата до пирувата в митохондриях, его вовлечения в цикл Кребса с последующим образованием цитрата, и его транспортировкой в цитозоль с последующим

включением в биосинтез липидов (рис. 35). При повышенной температуре глицерин метаболизируется, образуя глюкозу в цитоплазме с одновременным синтезом трегалозы (рис. 35).

Таким образом, анализ белкового состава дрожжей *Y. lipolytica* в различных условиях выявил некоторую закономерность в реакциях на различные стрессы. Мы наблюдали специфические воздействия ЩС и ТС на протеомный профиль. Изменения протеома митохондрий, выраженные в индукции VDAC и малатдегидрогеназы, играют ключевую роль в процессе адаптации. Рост в условиях КС сопровождался изменениями протеома, отличными от ТС и ЩС по отдельности. Более того, такие перестройки протеома, как индукция ряда шаперонов и карбонилредуктаз, указывают на катаболический процесс обезвреживания повреждённых в ходе окислительного стресса белков и липидов. Адаптация к КС включает в себя значительные перестройки метаболизма липидов и углеводов, а также защиты клеток против цитотоксичных продуктов перекисного окисления липидов и повреждённых белков.

Краткие выводы главы:

- Высокий адаптационный потенциал *Y. lipolytica* при оптимальной температуре достигается за счет высокого содержания в цитозоле цитопротекторного полиола маннита;
- Повышение температуры культивирования приводит к накоплению в клетках большого количества трегалозы и возрастанию доли арабита на фоне исчезновения маннита.
- Любое стрессовое воздействие приводит к снижению содержания запасных липидов (ТАГ и СЖК), в то время как повышение температуры культивирования обуславливает появление в составе запасных липидов продуктов  $\beta$ -окисления (ДАГ и МАГ).
- При оптимальной температуре культивирования преобладающими мембранными липидами являются Ст, при повышенной – ФХ и ФК.

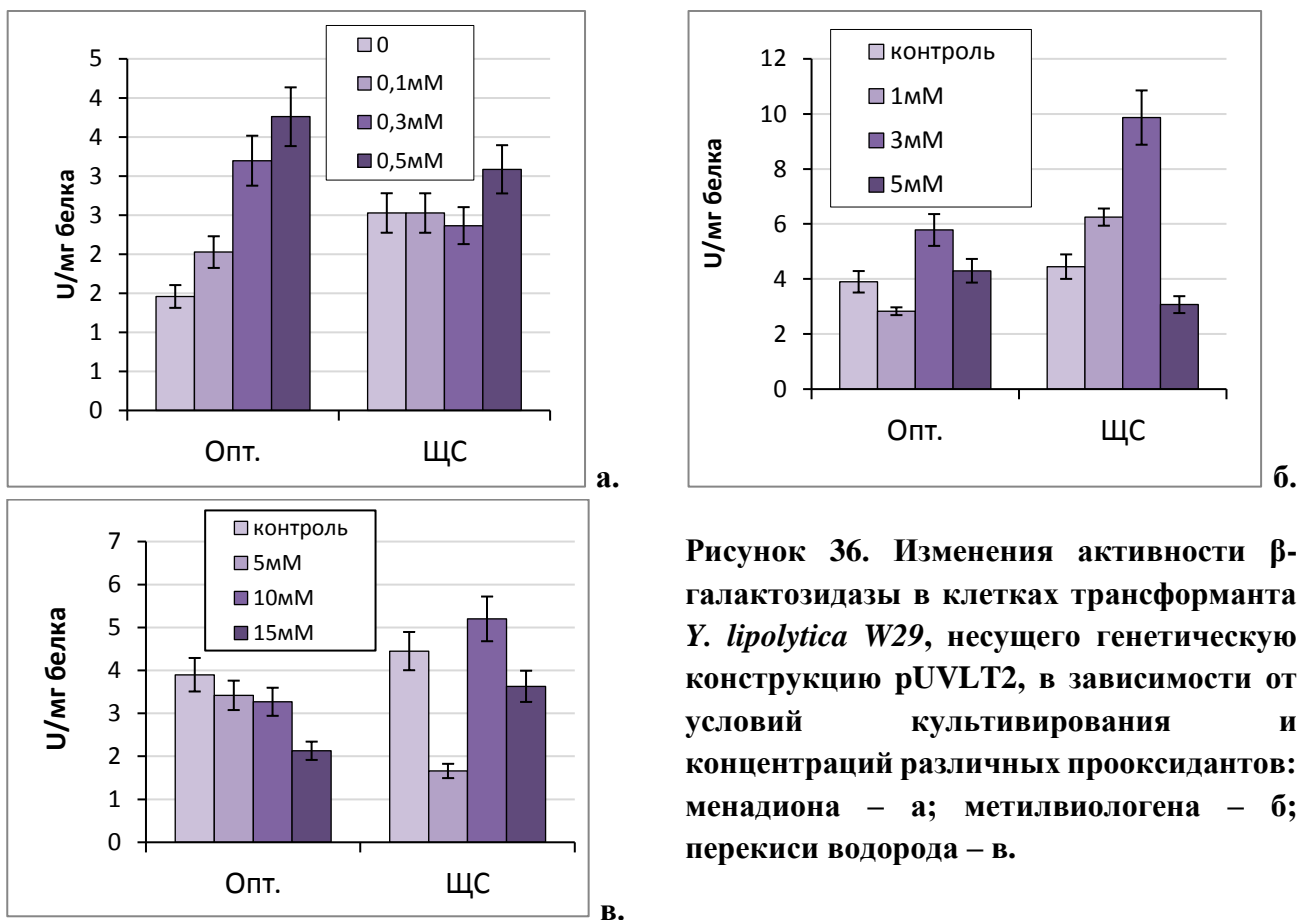
- КС приводит к значительному снижению содержания КЛ в мембранах митохондрий.
- ЩС вызывает увеличение экспрессии шаперонов, митохондриальных белков и регуляции окислительного фосфорилирования за счет снижения содержания комплексов IV и VI цитохром с оксидазы.
- Среди уникальных для ТС изменений протеома можно выделить индукцию формиатдегидрогеназы.
- Адаптация к КС включает в себя существенную перестройку метаболизма углеводов и липидов, а также защиту клеток от продуктов перекисного окисления липидов и распада белков.
- Адаптация к КС приводит к развитию перекрёстной адаптации, которая выражается в «переключении» метаболизма на адаптацию к фактору с большей повреждающей способностью – температуре.
- Уникальными для оптимальных условий оказались белки, вовлеченные в процессы деления и окислительного фосфорилирования.
- Изменения протеома при ЩС свидетельствуют о возрастании роли системы ККБ, регуляции окислительного фосфорилирования и усилении гликолиза.
- При ТС возрастает роль БТШ и формиатдегидрогеназы в качестве дополнительного фактора антиоксидантной защиты.
- При КС в протеоме появляется карбинилредуктаза как фактор защиты от цитотоксичных продуктов перекисного окисления липидов.
- Cu/Zn СОД присутствовала во всех исследуемых условиях.
- Cu/Zn СОД, тиоредоксин и 70-кДа БТШ-шапероны являются наиболее универсальными стрессовыми белками *Y. lipolytica*.

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

На основании проведенных протеомных исследований нами и нашими коллегами [203] было сделано предположение, что индукция митохондриального порина VDAC может быть универсальной реакцией на стресс у вида *Y. lipolytica*. Для подтверждения этой гипотезы был создан штамм-трансформант на основе *Y. lipolytica* W29, несущий генетическую конструкцию pUVLT2, включающую ген  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* под контролем промотора гена митохондриального порина VDAC (*POR1*).

В данной генетической конструкции, получившей название pUVLT2, лежит модифицированная последовательность гена  $\beta$ -галактозидазы (*LacZ*) из *E. coli* (рис. 9). Особенностью этого гена в составе данной конструкции по сравнению с геном *LacZ* дикого типа, является наличие синтетического дополнительного кодона GGA (Gly), совмещенного с сайтом рестрикции, непосредственно после инициаторного кодона ATG (Met) в начале открытой рамки считывания. Согласно правилу Варшавского, этот кодон придает продукту гена *LacZ* повышенную протеолитическую устойчивость в цитоплазме *Y. lipolytica*. Использование транскрипционных репортёров в настоящее время является стандартным методом исследования. Этот приём позволяет давать количественную оценку активности индуцибельных промоторов *in vivo* не только с целью проведения фундаментальных исследований, но и при создании коммерческих экспрессионных систем. Ген  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*, предложенный в работах основоположников генной инженерии Жакоба и Моно [383], является наиболее распространённым среди всех известных репортёров. Полученная конструкция pUVLT2 при введении в штамм *Y. lipolytica* W29 обеспечивала получение трансформантов, обладающих воспроизводимо определяемой активностью  $\beta$ -галактозидазы в клеточных лизатах, зависимой от условий культивирования рекомбинантного штамма. Аналогичный результат не мог быть получен с применением подобных конструкций, содержащих

ген *LacZ* нативной структуры, без внесения искусственного кодона GGA во втором положении открытой рамки считывания после инициаторного кодона ATG.



**Рисунок 36.** Изменения активности  $\beta$ -галактозидазы в клетках трансформанта *Y. lipolytica* W29, несущего генетическую конструкцию pUVLT2, в зависимости от условий культивирования и концентраций различных прооксидантов: менадиона – а; метилвиологена – б; перекиси водорода – в.

Оценку степени индукции промотора проводили по мониторингу активности фермента  $\beta$ -галактозидазы, кодируемого репортёрным геном *LacZ*. При введении в дрожжевую клетку вектора, содержащего такой ген, рекомбинантные клетки приобретают способность гидролизовать хромогенный аналог лактозы X-Gal и превращать его в окрашенное соединение 5-бром-4-хлориндол [203].

Так как индукция VDAC была показана на уровне протеома, а роль этого стресс-индуцибельного белка в перекрёстной адаптации не была ясна, на данном этапе исследований индукция промотора гена *POR1* исследовалась как при использовании одного стрессора (ЩС), так и при комбинированном стрессовом воздействии. В отличие от дикого типа, добиться устойчивого роста трансформанта pUVLT2 при повышенной температуре (38°) не удалось, так что было принято решение в качестве дополнительного стрессового фактора использовать введение

прооксидантов (перекиси водорода, менадиона и метилвиологена) в суспензионную культуру.

Было показано, что в отсутствии стрессоров активность  $\beta$ -галактозидазы колебалась в пределах от 1.4 до 3.9 U/мг белка, в то время как введение различных прооксидантов в культуру, растущую в оптимальных условиях, приводило к различным паттернам изменения активности. В случае менадиона, рост концентрации оксиданта от 0.1 до 0.5 мМ приводил к линейному росту активности фермента от 2.02 до 3.7 U/мг белка, соответственно (рис. 36, а.). Метилвиологен (рис. 36, б.) с ростом концентрации оказывал на активность фермента нелинейное воздействие. Если в случае 1 мМ прооксиданта активность фермента составляла 2.8 U/мг белка, то в случае 3 мМ – 5.8 U/мг белка. Повышение концентрации метилвиологена до 5 мМ приводило к снижению активности  $\beta$ -галактозидазы до 4.3 U/мг белка. Перекись водорода (рис. 36, в) в концентрациях 5 и 10 мМ приводила к незначительному снижению активности  $\beta$ -галактозидазы до 3.4 и 3.3 U/мг белка, соответственно. Дальнейшее повышение концентрации до 15 мМ приводило к значительному подавлению активности фермента, которая составляла 2.1 U/мг белка.

В случае ЩС без дополнительного окислительного стресса активность  $\beta$ -галактозидазы составляла от 2.5 до 4.5 U/мг белка. Введение в среду культивирования менадиона не оказало значительного воздействия на активность фермента (рис. 36, а). В то же время метилвиологен в концентрации 1 и 3 мМ в сочетании с ЩС приводил сначала к росту активности фермента до 6.5 и 9.9 U/мг белка, соответственно, а в концентрации 5 мМ – к резкому падению активности до 3.07 U/мг белка. Введение перекиси водорода в среду культивирования (рис. 36, в) в концентрации 5 мМ оказывало подавляющее воздействие на активность  $\beta$ -галактозидазы культуры трансформанта, растущей при ЩС. Активность фермента в этом случае составляла 1.7 U/мг белка. Повышение концентрации оксиданта до 10 мМ приводило к росту активности фермента до 5.2 U/мг белка. В то же время, 15

мМ концентрация перекиси водорода снова снижала активность β-галактозидазы до 3.6 U/мг белка.

Различия в изменениях активности β-галактозидазы, инициируемых разными концентрациями прооксидантов у клеток, выращенных в оптимальных условиях и при ЩС, могут быть объяснены природой самих прооксидантов. Менадион показывал явный дозозависимый эффект в оптимальных условиях и не оказывал заметного действия в сочетании с ЩС. В то же время, метилвиологен и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в средних концентрациях (3 и 10 мМ, соответственно), приводили к значительному росту активности β-галактозидазы в условиях ЩС по сравнению с контролем. Высокие концентрации (5 и 15 мМ, соответственно) этих оксидантов приводили к подавлению активности во всех изученных случаях. Можно предположить, что менадион, являясь прооксидантом митохондриальной направленности, приводит к активации VDAC лишь в случае оптимальных условий, когда изначальная индукция гена этого белка сравнительно невысока. Той индукции, что происходит при ЩС, достаточно, чтобы клетка могла «справиться» с АФК митохондриальной локализации.

Цитотоксичное воздействие метилвиологена связано, в первую очередь, с перекисным окислением КЛ в мембранах митохондрий, что приводит к дисфункции электрон-транспортной цепи [384]. В соответствии с предположениями, изложенными выше, индукция промотора гена *POR1* может происходить для повышения содержания VDAC во внешней мембране митохондрий, что необходимо для того, чтобы скомпенсировать частичную потерю активности VDAC из-за перекисного окисления КЛ.

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 [203]. 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 вида *Y. lipolytica* на стресс.

Краткие выводы главы:

- Менадион приводит к дозозависимой индукции промотора гена *POR1* при оптимальном значении pH. В щелочных условиях индуцирующий эффект менадиона заметно снижен.
- Метилвиологен приводит к наиболее выраженной индукции промотора гена *POR1* в концентрации 3 мМ. В щелочных условиях этот эффект более выражен, чем при оптимальном значении pH.
- $H_2O_2$  не оказывает стимулирующего эффекта на индукцию промотора гена *POR1* при оптимальном значении pH, а в щелочных условиях наиболее выраженная стимуляция достигается при концентрации 10 мМ.
- ЩС сам по себе приводит к индукции промотора гена *POR1*.
- Таким образом, подтверждается вовлечение митохондриального порина *VDAC* в антиоксидантную защиту клеток.
- Промотор гена *POR1* обладает высокой индуцибельностью в условиях ЩС, а также при комбинировании ЩС и индукции окислительного стресса. Он может быть рекомендован для экспрессии гетерологичных белков штаммами-трансформантами *Y. lipolytica*.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных в ходе работы результатов можно сделать следующие 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  $\beta$ -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 перекрёстной 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fickers P., Cheng H., Sze Ki Lin C. S* Sugar Alcohols and Organic Acids Synthesis in *Yarrowia lipolytica*: Where Are We? //Microorganisms. 2020. V. 8. № 4. P. 574
2. *Carvalho T., Pereira A.D.S., Bonomo R.C.F., Franco M., Finotelli P.V., Amaral P.F.F.* Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowia lipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach //Int J Biol Macromol. 2020. V. 160. P. 889-902
3. *Dąbrowska A., Bajzert J., Babij K., Szoltysik M., Stefaniak T., Willak-Janc E., Chrzanowska J.* Reduced IgE and IgG antigenic response to milk proteins hydrolysates obtained with the use of non-commercial serine protease from *Yarrowia lipolytica*. //Food Chem. 2020. V. 302. P. 125350
4. *Bae S.J., Park B.G., Kim B.G., Hahn J.S.* Multiplex Gene Disruption by Targeted Base Editing of *Yarrowia lipolytica* Genome Using Cytidine Deaminase Combined with the CRISPR/Cas9 System. //Biotechnol J. 2020. V. 15. № 1. e1900238
5. *Darvishi F. Moradi M., Jolivalt C., Madzak C.* Laccase production from sucrose by recombinant *Yarrowia lipolytica* and its application to decolorization of environmental pollutant dyes. //Ecotoxicol Environ Saf. 2018. V. 165. P. 278-283
6. *Shi N., Mao W., He X., Chi Z., Chi Z., Liu G.* Co-expression of Exo-inulinase and Endo-inulinase Genes in the Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* for Efficient Single Cell Oil Production from Inulin. //Appl Biochem Biotechnol. 2018. V. 185. № 1. P. 334-346
7. *Espejo-Mojica Á.J., Alméciga-Díaz C.J., Rodríguez A., Mosquera Á., Díaz D., Beltrán L., Díaz S., Pimentel N., Moreno J., Sánchez J., Sánchez O.F., Córdoba H., Poutou-Piñales R.A., Barrera L.A.* Human recombinant lysosomal enzymes produced in microorganisms. //Mol Genet Metab. 2015. V. 116. № 1-2. P. 13-23
8. *Louhasakul Y., Cheirsilp B., Treu L., Kougias P.G., Angelidaki I.* Metagenomic insights into bioaugmentation and biovalorization of oily industrial wastes by lipolytic oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* during successive batch fermentation. //Biotechnol Appl Biochem. 2019. 10.1002/bab.1878

9. Song H.T., Yang Y.M., Liu D.K., Xu X.Q., Xiao W.J., Liu Z.L., Xia W.C., Wang C.Y., Yu X., Jiang Z.B. Construction of recombinant *Yarrowia lipolytica* and its application in bio-transformation of lignocellulose //Bioengineered. 2017. V. 8. № 5. P. 624-629
10. Katre G., Ajmera N., Zinjarde S., Ravi Kumar A. Mutants of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 grown on waste cooking oil as a biofactory for biodiesel production // Microb Cell Fact. 2017. V. 16. № 1. P.176
11. Zvyagil'skaya R., Persson B.L. A novel alkali-tolerant *Yarrowia lipolytica* strain for dissecting Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transport systems in yeasts //Cell Biol Int. 2005. V. 29. № 1. P. 87-94
12. Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J.M., Beyne E., Bleykasten C., Boisramé A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., De Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J.M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G.F., Straub M.L., Suleau A., Swennen D., Tekaia F., Wésolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P., Souciet J.L. Genome evolution in yeast //Nature. 2004. V.430. № 6995. P. 35-44
13. Larroude, M., Rossignol, T., Nicaud, J. M., & Ledesma-Amaro, R. Synthetic biology tools for engineering *Yarrowia lipolytica* //Biotechnology advances. 2018. V. 36. № 8. P. 2150-2164
14. Hu W., Li W.J., Yang H.Q., Chen J.H. Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. //Appl Microbiol Biotechnol. 2019. V. 103. № 1. P. 201-209
15. Muhammad, A., Feng, X., Rasool, A., Sun, W., & Li, C. Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. Biotechnology advance. 2020. V. 43. P. 107555

16. Zieniuk, B., & Fabiszewska, A. *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a minireview // World journal of microbiology & biotechnology. 2018. V. 35. № 1. P. 10
17. Lasserre, J. P., Dautant, A., Aiyar, R. S., Kucharczyk, R., Glatigny, A., Tribouillard-Tanvier, D., Rytka, J., Blondel, M., Skoczen, N., Reynier, P., Pitayu, L., Rötig, A., Delahodde, A., Steinmetz, L. M., Dujardin, G., Procaccio, V., & di Rago, J. P. // Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. Disease models & mechanisms. 2015. V. 8. № 6. P. 509-526
18. Kaila V. Long-range proton-coupled electron transfer in biological energy conversion: towards mechanistic understanding of respiratory complex I // Journal of the Royal Society, Interface, 2018. V. 15. № 141. e. 20170916
19. Larroude, M., Trabelsi, H., Nicaud, J. M., & Rossignol, T. A set of *Yarrowia lipolytica* CRISPR/Cas9 vectors for exploiting wild-type strain diversity //Biotechnology letters. 2020. T. 42. №. 5. C. 773-785
20. Yang, X., Wang, H., Li, C., & Lin, C. Restoring of glucose metabolism of engineered *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production via a simple and efficient adaptive evolution strategy //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2017. – T. 65. – №. 20. – C. 4133-4139
21. Yang, S., & Lian, G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply //Molecular and cellular biochemistry. 2020. V. 467. № 1-2. P. 1-12
22. Brand M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling //Free Radical Biology and Medicine. – 2016. V. 100. P. 14-31
23. Wong H. S., Benoit B., Brand M. D. Mitochondrial and cytosolic sources of hydrogen peroxide in resting C2C12 myoblasts //Free Radical Biology and Medicine. 2019. V. 130. P. 140-150
24. Mazat J. P., Devin A., Ransac S. Modelling mitochondrial ROS production by the respiratory chain //Cellular and Molecular Life Sciences. 2020. V. 77. №. 3. P. 455-465

25. *Quinlan, C. L., Goncalves, R. L., Hey-Mogensen, M., Yadava, N., Bunik, V. I., & Brand, M. D.* The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I // *J Biol Chem.* 2014. V. 289. P. 8312-8325
26. *Liu, J., Tian, J., Perry, C., Lukowski, A. L., Doukov, T. I., Narayan, A. R., & Bridwell-Rabb, J.* Design principles for site-selective hydroxylation by a Rieske oxygenase // *Nature Communications.* 2022. T. 13. №. 1. C. 1-13
27. *Antonucci, S., Di Sante, M., Tonolo, F., Pontarollo, L., Scalcon, V., Alanova, P., Menabò, R., Carpi, A., Bindoli, A., Rigobello, M. P., Giorgio, M., Kaludercic, N., & Di Lisa, F.* The determining role of mitochondrial ROS generation and monoamine oxidase activity in doxorubicin-induced cardiotoxicity // *Antioxidants & redox signaling.* 2020. V. 10. №1 089/ars.2019.7929
28. *Gill, T., & Levine, A. D.* Mitochondria-derived hydrogen peroxide selectively enhances T cell receptor-initiated signal transduction // *The Journal of biological chemistry.* 2013. V. 288. № 36. P. 26246-26255
29. *Miyata, N., Okumoto, K., & Fujiki, Y.* Cell Death or Survival Against Oxidative Stress // *Sub-cellular biochemistry.* 2018. V. 89. P. 463-471
30. *Nikolaidis M.G., Margaritelis N.V., Matsakas A.* Quantitative Redox Biology of Exercise // *Int J Sports Med.* 2020. V. 10.1055/a-1157-9043
31. *McGarry, T., Binniecka, M., Veale, D. J., & Fearon, U.* Hypoxia, oxidative stress and inflammation // *Free Radical Biology and Medicine // Free radical biology & medicin.* 2018. V. 125. P. 15-24
32. *Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay // *Biomed Res Int.* 2014. V. 2014. I. 761264
33. *Waneka, G., Svendsen, J. M., Havird, J. C., & Sloan, D. B.* Mitochondrial mutations in *Caenorhabditis elegans* show signatures of oxidative damage and an AT-bias // *Genetics.* 2021. T. 219. №. 2. C. iyab116
34. *Jiang, D., & Rusling, J. F.* Oxidation chemistry of DNA and p53 tumor suppressor gene // *Chemistry Open.* 2019. V. 8. № 3. P. 252-265

35. *Eleutherio, E., de Araujo Brasil, A., França, M. B., de Almeida, D. S. G., Rona, G. B., & Magalhães, R. S. S.* Oxidative stress and aging: learning from yeast lessons //Fungal biology. 2018. T. 122. №. 6. C. 514-525
36. *Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., & Collet, J. F.* Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria //Nature reviews Microbiology. 2017. V. 15. № 7. P. 385-396
37. *Yousef, H. A., Abdelfattah, E. A., & Augustyniak, M.* Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) collected from areas polluted by the fertilizer industry //Ecotoxicology (London, England). 2017. V. 26. № 3. P. 340-350
38. *Shadyro O., Lisovskaya A.* ROS-induced lipid transformations without oxygen participation //Chemistry and physics of lipids. 2019. T. 221. C. 176-183
39. *Gaschler M. M., Stockwell B. R.* Lipid peroxidation in cell death Lipid peroxidation in cell death //Biochemical and biophysical research communications. 2017. V. 482. №. 3. P. 419-425
40. *Catalá A., Díaz M.* Impact of lipid peroxidation on the physiology and pathophysiology of cell membranes //Frontiers in physiology. 2016. V. 7. P. 423
41. *Cloos A.S., Ghodsi M., Stommen A., Vanderroost J., Dauguet N., Pollet H., D'Auria L., Mignolet E., Larondelle Y., Terrasi R., Muccioli G.G., Van Der Smissen P., Tyteca D.* Interplay between plasma membrane lipid alteration, oxidative stress and calcium-based mechanism for extracellular vesicle biogenesis from erythrocytes during blood storage //Frontiers in physiology. 2020. V. 11. P. 712
42. *Feng H., Stockwell B. R.* Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? //PLoS Biology. 2018. V. 16. №. 5. P. e2006203
43. *Feng H., Stockwell B. R.* Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? //PLoS Biology. 2018. V. 16. №. 5. P. e2006203
44. *Heffern, C. T., Pocivavsek, L., Birukova, A. A., Moldobaeva, N., Bochkov, V. N., Lee, K. Y. C., & Birukov, K. G.* Thermodynamic and kinetic investigations of the release of oxidized phospholipids from lipid membranes and its effect on vascular integrity //Chemistry and physics of lipids. 2013. V. 175. P. 9-19

45. *Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., & Miklavčič, D.* Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models //Annual review of biophysics. 2019. V. 48. P. 63-91
46. *Stockwell B.R., Friedmann*  
*Angeli J.P, Bayir H., Bush A.I., Conrad M., Dixon S.J., Fulda S., Gascón S., Hatzios S.K., Kagan V.E., Noel K., Jiang X., Linkermann A., Murphy M.E., Overholtzer M., Oyagi A., Pagnussat G.C., Park J., Ran Q., Rosenfeld C.S., Salnikow K., Tang D., Torti F.M., Torti S.V., Toyokuni S., Woerpel K.A., Zhang D.D.* Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease //Cell. – 2017. T. 171. №. 2. C. 273-285
47. *Gürbüz G., Heinonen M.* LC–MS investigations on interactions between isolated  $\beta$ -lactoglobulin peptides and lipid oxidation product malondialdehyde //Food Chemistry. 2015. V. 175. P. 300-305
48. *Yakubenko V. P., Byzova T. V.* Biological and pathophysiological roles of end-products of DHA oxidation //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2017. V. 1862. №. 4. P. 407-415
49. *Woronoff, G., Nghe, P., Baudry, J., Boitard, L., Braun, E., Griffiths, A. D., & Bibette, J.* Metabolic cost of rapid adaptation of single yeast cells //Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. T. 117. №. 20. C. 10660-10666
50. *Ramos-Gomez, M., Olivares-Marin, I. K., Canizal-García, M., González-Hernández, J. C., Nava, G. M., & Madrigal-Perez, L. A.* Resveratrol induces mitochondrial dysfunction and decreases chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* in a glucose-dependent manner //Journal of bioenergetics and biomembranes. 2017. T. 49. №. 3. C. 241-251
51. *Rodrigues-Pousada, C., Devaux, F., Caetano, S. M., Pimentel, C., da Silva, S., Cordeiro, A. C., & Amaral, C.* Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview // Microbial cell.2019. V. 6. № 6. P. 267–285
52. *Ribeiro T.P., Fonseca F.L., de Carvalho M.D., Godinho R.M., de Almeida F.P., Saint’Pierre T.D., Rey N.A., Fernandes C., Horn A. Jr., Pereira M.D.* Metal-based superoxide dismutase and catalase mimics reduce oxidative stress biomarkers and

- extend life span of *Saccharomyces cerevisiae* //Biochemical Journal. 2017. T. 474. №. 2. C. 301-315
53. *Sepasi Tehrani, H., & Moosavi-Movahedi, A. A.* Catalase and its mysteries //Progress in biophysics and molecular biology. 2018. V.140. P. 5–12; *Banks C. J., Andersen J. L.* Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications //Redox biology. 2019. V. 26. P. 101270
54. *Banks C. J., Andersen J. L.* Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications //Redox biology. 2019. V. 26. P. 101270
55. *de Carvalho M. D. C., De Mesquita J. F., Eleutherio E. C. A.* In vivo characterization of I91T Sod2 polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* //Journal of Cellular Biochemistry. 2017. T. 118. №. 5. C. 1078-1086
56. *Chung W. H.* Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging //Journal of Microbiology. 2017. V. 55. №. 6. P. 409-416
57. *Miller A. F.* Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights //FEBS letters. 2012. V. 586. №. 5. P. 585-595
58. *Zyrina, A. N., Smirnova, E. A., Markova, O. V., Severin, F. F., & Knorre, D. A.* Mitochondrial superoxide dismutase and Yap1p act as a signaling module contributing to ethanol tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Applied and Environmental Microbiology. 2017. V. 83. №. 3
59. *Semchyshyn H. M., Valishkevych B. V.* Hormetic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of TOR and glutathione reductase //Dose-Response. 2016. V. 14. №. 2. P. 1559325816636130
60. *Banerjee R., Joshi N., Nagotu S.* Cell organelles and yeast longevity: an intertwined regulation //Current genetics. 2020. V. 66. №. 1. P. 15-41
61. *Papa, L., Hahn, M., Marsh, E.L., Evans, B.S., and Germain, D.* 2014. SOD2 to SOD1 switch in breast cancer. Journal of biological chemistry. 2014. V. 289. №. 9. P. 5412-5416



62. Choi J. E., Chung W. H. Functional interplay between the oxidative stress response and DNA damage checkpoint signaling for genome maintenance in aerobic organisms //Journal of Microbiology. 2020. T. 58. №. 2. C. 81-91
63. Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. S. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance //Nature communications. 2014. V. 5. №. 1. P. 1-11
64. Magrì, A., Di Rosa, M. C., Tomasello, M. F., Guarino, F., Reina, S., Messina, A., & De Pinto, V. Overexpression of human SOD1 in VDAC1-less yeast restores mitochondrial functionality modulating beta-barrel outer membrane protein genes //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 2016. V. 1857. №. 6. P. 789-798
65. Reddi A. R., Culotta V. C. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration //Cell. 2013. V. 152. №. 1-2. P. 224-235
66. Аринбасарова А. Ю., Бирюкова Е. Н., Меденцев А. Г. Антистрессовые системы дрожжей *Yarrowia lipolytica* (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. №. 2. С. 122-122
67. Bankar A., Zinjarde S., Shinde M., Gopalghare G., Ravikumar A. Heavy metal tolerance in marine strains of *Yarrowia lipolytica* //Extremophiles. 2018. V. 22. №. 4. P. 617-628
68. Robinett N.G., Culbertson E.M., Peterson R.L., Sanchez H., Andes D.R., Nett J.E., Culotta V.C. Exploiting the vulnerable active site of a copper-only superoxide dismutase to disrupt fungal pathogenesis //Journal of Biological Chemistry. 2019. V. 294. №. 8. P. 2700-2713
69. Broxton C. N., Culotta V. C. SOD enzymes and microbial pathogens: surviving the oxidative storm of infection //PLoS pathogens. 2016. V. 12. №. 1. P. e1005295
70. Karakus Y. Y. Typical Catalases: Function and Structure //Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease. 2020. C. 111
71. Nava-Ramírez T., Hansberg W. Chaperone activity of large-size subunit catalases //Free Radical Biology and Medicine. 2020. V. 15. P. 99-106

72. Vega-García, V., Díaz-Vilchis, A., Saucedo-Vázquez, J. P., Solano-Peralta, A., Rudiño-Piñera, E., & Hansberg, W. Structure, kinetics, molecular and redox properties of a cytosolic and developmentally regulated fungal catalase-peroxidase //Archives of biochemistry and biophysics. 2018. V. 640. P. 17-26
73. Hansberg W., Salas-Lizana R., Domínguez L. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure //Archives of biochemistry and biophysics. 2012. V. 525. №. 2. P. 170-180
74. Gebicka L., Krych-Madej J. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress //Journal of inorganic biochemistry. 2019. V. 197. P. 110699
75. Khan, A., Khan, M. Z., Dou, J., Umer, S., Xu, H., Sammad, A. & Wang, Y. RNAi-Mediated Silencing of Catalase Gene Promotes Apoptosis and Impairs Proliferation of Bovine Granulosa Cells under Heat Stress //Animals. 2020. V. 10. №. 6. P. 1060
76. Lopes M., Mota M., Belo I. Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* cellular response to different agents of oxidative stress //Applied biochemistry and biotechnology. 2013. V. 170. №. 2. P. 448-458
77. Calabrese G., Morgan B., Riemer J. Mitochondrial glutathione: regulation and functions //Antioxidants & Redox Signaling. 2017. V. 27. №. 15. P. 1162-1177
78. Trip D. S. L., Youk H. Yeasts collectively extend the limits of habitable temperatures by secreting glutathione //Nature Microbiology. 2020. P. 1-12
79. Deponte M. The incomplete glutathione puzzle: just guessing at numbers and figures? //Antioxidants & redox signaling. 2017. V. 27. №. 15. P. 1130-1161
80. Ryoo I., Kwak M. K. Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor Nfe2l2/Nrf2 and mitochondria //Toxicology and applied pharmacology. 2018. V. 359. P. 24-33
81. Mari M., de Gregorio E., de Dios C., Roca-Agujetas V., Cucarull B., Tutusaus A., Morales A., Colell A. Mitochondrial Glutathione: Recent Insights and Role in Disease //Antioxidants (Basel). 2020. V. 9. №. 10. P. 909
82. Bhattacharjee A., Chakraborty K., Shukla A. Cellular copper homeostasis: Current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases //Metallomics. 2017. V. 9. №. 10. P. 1376-1388

83. *Koike S., Nishimoto S., Ogasawara Y.* Cysteine persulfides and polysulfides produced by exchange reactions with H<sub>2</sub>S protect SH-SY5Y cells from methylglyoxal-induced toxicity through Nrf2 activation //Redox biology. 2017. V. 12. P. 530-539
84. *Pluskal T., Sajiki K., Becker J., Takeda K., Yanagida M.* Diverse fission yeast genes required for responding to oxidative and metal stress: Comparative analysis of glutathione-related and other defense gene deletions //Genes Cells. 2016. V. 21. № 6. P. 530-542
85. *Wang D.H., Zhang J.L., Dong Y.Y., Wei G.Y., Qi B.* Glutathione is involved in physiological response of *Candida utilis* to acid stress //Appl Microbiol Biotechnol. 2015. V. 99. № 24. P. 10669-10679
86. *Muneer B., Lali T., Iqbal M.J., Shakoori F.R., Shakoori A.R.* Arsenic processing of yeast isolates IIB-As1 & IIB-As2 and production of glutathione under stress conditions //J Basic Microbiol. 2016 V. 56. № 10. P. 1124-1131
87. *Shi H., Jiang Y., Yang Y., Peng Y., Li C.* Copper metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: an update //Biometals. 2020 Oct 30
88. *Gergondey R., Garcia C., Marchand C.H., Lemaire S.D., Camadro J.M., Auchère F.* Modulation of the specific glutathionylation of mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under basal and stress conditions //Biochem J. 2017 V. 474. № 7. P. 1175-1193
89. *Kieliszek M.* Selenium–fascinating microelement, properties and sources in food //Molecules. 2019. V. 24. №. 7. P. 1298
90. *Canizal-García, M., Olmos-Orizaba, B. E., Moreno-Jiménez, M., Calderón-Cortés, E., Saavedra-Molina, A., & Cortés-Rojo, C.* Glutathione peroxidase 2 (Gpx2) preserves mitochondrial function and decreases ROS levels in chronologically aged yeast //Free Radical Research. 2021. T. 55. №. 2. C. 165-175
91. *Brigelius-Flohé R., Flohé L.* Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily //Antioxidants & redox signaling. 2020. V. 33. №. 7. P. 498-516
92. *Gruhlke M.C.H., Schlembach I., Leontiev R., Uebachs A., Gollwitzer P.U.G, Weiss A., Delaunay A, Toledano M., Slusarenko A.J.* Yap1p, the central regulator of the *S. cerevisiae* oxidative stress response, is activated by allicin, a natural oxidant and

- defence substance of garlic //Free Radical Biology and Medicine. 2017. V. 108 P. 793-802
93. *Brigelius-Flohé R., Flohé L.* Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily //Antioxidants & redox signaling. 2020. V. 33. № 7. P. 498-516
94. *Kalita, P., Shukla, H., Gadhave, K., Giri, R., & Tripathi, T.* Role of the glutaredoxin domain and FAD in the stabilization of thioredoxin glutathione reductase //Archives of biochemistry and biophysics. 2018. T. 656. C. 38-45
95. *Kurylenko O. O., Dmytruk K. V., Sibirny A.* Glutathione metabolism in yeasts and construction of the advanced producers of this tripeptide //Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. – Springer, Cham, 2019. P. 153-196
96. *Horn, T., Bettray, W., Slusarenko, A. J., & Gruhlke, M. C.* S-allylmercaptogluthione is a substrate for glutathione reductase (EC 1.8. 1.7) from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) //Antioxidants. 2018. V. 7. №. 7. P. 86
97. *Braymer J.J., Stümpfig M., Thelen S., Mühlenhoff U., Lill R.* Depletion of thiol reducing capacity impairs cytosolic but not mitochondrial iron-sulfur protein assembly machineries //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2019. V. 1866. №. 2 P. 240-251
98. *Copsey, A. C., Barsottini, M. R., May, B., Xu, F., Albury, M. S., Young, L., & Moore, A. L.* Kinetic characterisation and inhibitor sensitivity of *Candida albicans* and *Candida auris* recombinant AOX expressed in a self-assembled proteoliposome system //Scientific reports. 2021. T. 11. №. 1. C. 1-10
99. *Ebiloma, G. U., Balogun, E. O., Cueto- Díaz, E. J., de Koning, H. P., & Dardonville, C.* Alternative oxidase inhibitors: Mitochondrion- targeting as a strategy for new drugs against pathogenic parasites and fungi //Medicinal research reviews. 2019. V. 39. №. 5. P. 1553-1602
100. *Рогов А.Г., Звягильская Р.А.* Физиологическая роль митохондриальной альтернативной оксидазы (от дрожжей до растений) (обзор) // Биохимия. 2015. V. 80. № 4. P. 472-479
101. *Xu, T., Yao, F., Liang, W. S., Li, Y. H., Li, D. R., Wang, H., and Wang, Z. Y.* Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and

- resistance to oxidative stress of *Sclerotinia sclerotiorum* //Journal of Microbiology. 2012. V. 50. №. 4. P. 594-602
102. *Saad-Allah K., Abdelsalam I. M.* Abiotic stress trigger mitochondrial defense system: A comprehensive review //Iranian Journal of Plant Physiology. 2020. V. 10. №. 3. P. 3195-3212
103. *Honda Y., Hattori T., Kirimura, K.* Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger* // J. Biosci. Bioeng. 2012 V. 113. № 3. P. 338-342
104. *Kunova A., Pizzatti C., Cortesi P.* Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* // Pest Manag. Sci. 2013. V. 69. P. 278-284
105. *Kumari, A., Pathak, P. K., Bulle, M., Igamberdiev, A. U., & Gupta, K. J.* Alternative oxidase is an important player in the regulation of nitric oxide levels under normoxic and hypoxic conditions in plants //Journal of Experimental Botany. – 2019. V. 70. №. 17. P. 4345-4354
106. *Winterbourn C. C.* Hydrogen peroxide reactivity and specificity in thiol-based cell signalling //Biochemical Society Transactions. 2020. T. 48. №. 3. C. 745-754
107. *Flohé L.* The impact of thiol peroxidases on redox regulation //Free radical research. 2016. V. 50. №. 2. P. 126-142
108. *Brigelius-Flohé R., Maiorino M.* Glutathione peroxidases //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2013. V. 1830. №. 5. P. 3289-3303
109. *Deponte M.* Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2013. V. 1830. №. 5. P. 3217-3266
110. *Mishra S., Imlay J.* Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? //Archives of biochemistry and biophysics. 2012. V. 525. №. 2. P. 145-160
111. *Zhang J., Li X., Han X., Liu R., Fang J.* Targeting the thioredoxin system for cancer therapy //Trends in pharmacological sciences. 2017. V. 38. №. 9. P. 794-808

112. *Picazo C., McDonagh B., Peinado J., Bárcena J.A., Matallana E., Aranda A.* *Saccharomyces cerevisiae* cytosolic thioredoxins control glycolysis, lipid metabolism, and protein biosynthesis under wine-making conditions //Applied and environmental microbiology. 2019. V. 85. №. 7. P. e02953-18
113. *Ye Z., Ayer D. E.* Ras suppresses TXNIP expression by restricting ribosome translocation //Molecular and cellular biology. 2018. V. 38. №. 20. P. e00178-18
114. *He L., He T., Farrar S., Ji L., Liu T., Ma X.* Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species //Cellular Physiology and Biochemistry. 2017. T. 44. №. 2. C. 532-553
115. *Calabrese G, Peker E, Amponsah PS, Hoehne MN, Riemer T, Mai M, Bienert GP, Deponte M, Morgan B, Riemer J.* Hyperoxidation of mitochondrial peroxiredoxin limits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- induced cell death in yeast //The EMBO journal. 2019.V. 38. №. 18. P. e101552
116. *Abdalla M., Eltayb W. A., Yousif A.* Comparison of structures among *Saccharomyces cerevisiae* Grxs proteins //Genes and Environment. 2018. V. 40. №. 1. P. 17
117. *Cowan J. A.* Role of protein-glutathione contacts in defining glutaredoxin-3 [2Fe–2S] cluster chirality, ligand exchange and transfer chemistry //JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. 2017. V. 22. №. 7. P. 1075-1087
118. *Jainarayanan A. K., Yadav S., Bachhawat A. K.* Yeast glutaredoxin, GRX4, functions as a glutathione S-transferase required for red ade pigment formation in *Saccharomyces cerevisiae* //Journal of Biosciences. – 2020. V. 45. №. 1. P. 39
119. *Berndt C., Lillig C. H.* Glutathione, glutaredoxins, and iron //Antioxidants & Redox Signaling. 2017. V. 27. №. 15. P. 1235-1251
120. *Reuter W.H., Masuch T., Ke N., Lenon M., Radzinski M., Van Loi V., Ren G., Riggs P., Antelmann H., Reichmann D., Leichert L.I., Berkmen M.* Utilizing redox-sensitive GFP fusions to detect in vivo redox changes in a genetically engineered prokaryote //Redox biology. 2019. V. 26. P. 101280

121. *Chalker, J., Gardiner, D., Kuksal, N., & Mailloux, R. J.* Characterization of the impact of glutaredoxin-2 (GRX2) deficiency on superoxide/hydrogen peroxide release from cardiac and liver mitochondria //Redox biology. 2018. V. 15. P. 216-227
122. *Vall-Llaura N., Reverter-Branchat G., Vived C., Weertman N., Rodríguez-Colman M.J., Cabisco E.* Reversible glutathionylation of Sir2 by monothiol glutaredoxins Grx3/4 regulates stress resistance //Free Radical Biology and Medicine. 2016. V. 96. P. 45-56
123. *Chakravarti, A., Camp, K., McNabb, D. S., & Pinto, I.* The iron-dependent regulation of the *Candida albicans* oxidative stress response by the CCAAT-binding factor //PloS one. 2017. V. 12. №. 1. P. e0170649
124. *West, J. D., Roston, T. J., David, J. B., Allan, K. M., & Loberg, M. A.* Piecing together how peroxiredoxins maintain genomic stability //Antioxidants. 2018. T. 7. №. 12. C. 177
125. *Rhee S. G.* Overview on peroxiredoxin //Molecules and cells. 2016. V. 39. №. 1. P. 1
126. *Stöcker S., Van Laer K., Mijuskovic A., Dick T.P.* The conundrum of hydrogen peroxide signaling and the emerging role of peroxiredoxins as redox relay hubs //Antioxidants & redox signaling. 2018. V. 28. №. 7. P. 558-573
127. *Gao J., Feng H., Yuan W., Li Y., Hou S., Zhong S., Bai F.* Enhanced fermentative performance under stresses of multiple lignocellulose-derived inhibitors by overexpression of a typical 2-Cys peroxiredoxin from *Kluyveromyces marxianus* //Biotechnology for biofuels. 2017. V. 10. №. 1. P. 79
128. *Roger F., Picazo C., Reiter W., Libiad M., Asami C., Hanzén S., Gao C., Lagniel G., Welkenhuysen N., Labarre J., Nyström T., Grøtli M., Hartl M., Toledano M.B., Molin M.* Peroxiredoxin promotes longevity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistance in yeast through redox-modulation of protein kinase A //Elife. 2020. V. 9. P. e60346
129. *Irokawa H., Tachibana T., Watanabe T., Matsuyama Y., Motohashi H., Ogasawara A., Iwai K., Naganuma A., Kuge S.* Redox-dependent regulation of gluconeogenesis by a novel mechanism mediated by a peroxidatic cysteine of peroxiredoxin //Scientific reports. 2016. V. 6. №. 1. P. 1-16

130. *Brachmann, C., Kaduhr, L., Jüdes, A., Ravichandran, K. E., West, J. D., Glatt, S., & Schaffrath, R.* Redox requirements for ubiquitin-like urmylation of Ahp1, a 2-Cys peroxiredoxin from yeast //Redox biology. 2020. V. 30. P. 101438
131. *Martinez-Munoz G. A., Kane P.* Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH //J. Biol. Chem. 2017. V. 292. №. 19. P. 7743-7743
132. *Palmgren M, Morsomme P.* The plasma membrane H<sup>+</sup> -ATPase, a simple polypeptide with a long history //Yeast. 2019. V. 36. № 4. P. 201-210
133. *Guaragnella N., Bettiga M.* Acetic acid stress in budding yeast: from molecular mechanisms to applications //Yeast. 2021. T. 38. №. 7. C. 391-400
134. *Hahne K., Rödel G., Ostermann K.* A fluorescence- based yeast sensor for monitoring acetic acid //Engineering in Life Sciences. 2021. DOI: 10.1002/ elsc. 202000006
135. *Deparis, Q., Claes, A., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M.* Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories //FEMS Yeast Research. 2017. V. 17. №. 4
136. *Geng P., Zhang L., Shi G.Y.* Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* //World J Microbiol Biotechnol. 2017. V. 33. № 5. P. 94
137. *Martínez-Pastor M. T., Perea-García A., Puig S.* Mechanisms of iron sensing and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* //World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017. V. 33. №. 4. P. 75
138. *Devaux F., Thiébaud A.* The regulation of iron homeostasis in the fungal human pathogen *Candida glabrata* //Microbiology. – 2019. V. 165. №. 10. P. 1041-1060
139. *Gerwien, F., Skrahina, V., Kasper, L., Hube, B., & Brunke, S.* Metals in fungal virulence //FEMS microbiology reviews. 2018. V. 42. №. 1. P. fux050
140. *Martins T. S., Costa V., Pereira C.* Signaling pathways governing iron homeostasis in budding yeast //Molecular microbiology. 2018. V. 109. №. 4. P. 422-432
141. *Heinisch J. J., Rodicio R.* Stress responses in wine yeast //Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. – Springer, Cham, 2017. P. 377-395



142. *Bondarenko P. Y., Fedorov A. S., Sineoky S. P.* Optimization of repeated-batch fermentation of a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* for succinic acid production at low pH //Applied biochemistry and microbiology. 2017. V. 53. №. 9. P. 882-887
143. *Zhao C., Cui Z., Zhao X., Zhang J., Zhang L., Tian Y., Qi Q., Liu J.* Enhanced itaconic acid production in *Yarrowia lipolytica* via heterologous expression of a mitochondrial transporter MTT //Applied microbiology and biotechnology. 2019. T. 103. №. 5. C. 2181-2192
144. *Dourou M., Kancelista A., Juszczak P., Sarris D., Bellou S., Triantaphyllidou I.-E., Rywinska A., Papanikolaou S., Aggelis G.* Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products //Journal of Cleaner Production. 2016. T. 139. C. 957-969
145. *Fernandes, T. R., Segorbe, D., Prusky, D., & Di Pietro, A.* How alkalization drives fungal pathogenicity //PLoS pathogens. 2017. V. 13. №. 11. P. e1006621
146. *Ariño J., Ramos J., Sychrova H.* Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts //Yeast. 2019. T. 36. №. 4. C. 177-193
147. *Petrezsélyová, S., López-Malo, M., Canadell, D., Roque, A., Serra-Cardona, A., Marqués, M. C., Vilaprinyó, E., Alves, R., Yenush, L., & Ariño, J.* Regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Ena1 Expression by Calcineurin/Crz1 under High pH Stress: A Quantitative Study //PloS one. 2016. V.11. № 6. P. e0158424
148. *Markina-Iñarrairaegui, A., Spielvogel, A., Etxebeste, O., Ugalde, U., & Espeso, E. A.* Tolerance to alkaline ambient pH in *Aspergillus nidulans* depends on the activity of ENA proteins //Scientific reports. 2020. V. 10. № 1. P. 14325
149. *Smith A. D., Logeman B. L., Thiele D. J.* Copper acquisition and utilization in fungi //Annual review of microbiology. 2017. V. 71. P. 597-623
150. *Higuchi, Y., Mori, H., Kubota, T., & Takegawa, K.* Analysis of ambient pH stress response mediated by iron and copper intake in *Schizosaccharomyces pombe* //Journal of bioscience and bioengineering. 2018. V. 125. №. 1. P. 92-96

151. *Penalva M. A., Lucena-Agell D., Arst Jr H. N.* Liaison alcaline: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling //Current opinion in microbiology. 2014. V. 22. P. 49-59
152. *Shu, T., He, X. Y., Chen, J. W., Mao, Y. S., & Gao, X. D.* The pH-Responsive Transcription Factors YIRim101 and Mhy1 Regulate Alkaline pH-Induced Filamentation in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica* //Msphere. 2021. T. 6. №. 3. C. e00179-21
153. *Brown, A. J., Cowen, L. E., Di Pietro, A., & Quinn, J.* Stress adaptation //The fungal kingdom. 2017. P. 463-485
154. *Athanasopoulos, A., André, B., Sophianopoulou, V., & Gournas, C.* Fungal plasma membrane domains //FEMS microbiology reviews. 2019. V. 43. №. 6. P. 642-673
155. *Nishino K., Obara K., Kihara A.* The C-terminal cytosolic region of Rim21 senses alterations in plasma membrane lipid composition //Journal of Biological Chemistry. 2015. V. 290. №. 52. P. 30797-30805
156. *Thewes S.* Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes //Eukaryotic cell. 2014. T. 13. №. 6. C. 694-705
157. *Ma, L., Li, Y., Chen, X., Ding, M., Wu, Y., & Yuan, Y. J.* SCRaMbLE generates evolved yeasts with increased alkali tolerance//Microbial cell factories. 2019. V. 18. №. 1. P. 1-11
158. *Mellado L., Arst Jr H. N., Espeso E. A.* Proteolytic activation of both components of the cation stress–responsive Slt pathway in *Aspergillus nidulans* //Molecular biology of the cell. 2016. T. 27. №. 16. C. 2598-2612
159. *Гусева М.А., Эпова Е.Ю., Осипенкова О.В., Елагина Е.М., Шевелев А.Б.* Изучение молекулярного механизма адаптации дрожжей *Yarrowia lipolytica* к щелочному стрессу //Фундаментальные исследования. 2011. № 3. С. 181-190
160. *E. Epova, M. Guseva, L. Kovalyov, E. Isakova, Y. Deryabina, A. Belyakova, M. Zylkova, A. Shevelev* Identification of proteins involved in pH adaptation in extremophile yeast *Yarrowia lipolytica*. – IntechOpen, 2012

161. *Gong, Y., Li, T., Yu, C., & Sun, S.* Candida albicans heat shock proteins and Hsp-associated signaling pathways as potential antifungal targets //Frontiers in cellular and infection microbiology. 2017. V. 7. P. 520
162. *Nitika, Porter C.M., Truman A.W., Truttmann M.C.* Post-translational modifications of Hsp70 family proteins: Expanding the chaperone code //Journal of Biological Chemistry. 2020. P. jbc. REV120. 011666
163. *Pincus D.* Size doesn't matter in the heat shock response //Current genetics. – 2017. V. 63. №. 2. P. 175-178
164. *Verghese J., Abrams J., Wang Y., Morano K.A.* Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system //Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2012. V. 76. № 2. p. 115 – 158
165. *Seaton D. D., Krishnan J.* Model-based analysis of cell cycle responses to dynamically changing environments //PLoS computational biology. 2016. V. 12. №. 1. P. e1004604
166. *Valiante V.* The cell wall integrity signaling pathway and its involvement in secondary metabolite production //Journal of Fungi. 2017. V. 3. №. 4. P. 68
167. *Ye, X., Lin, J., Mayne, L., Shorter, J., & Englander, S. W.* Structural and kinetic basis for the regulation and potentiation of Hsp104 function //Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. V. 117. №. 17. P. 9384-9392
168. *Jiang, Y., Akhavan Aghdam, Z., Li, Y., Zid, B. M., & Hao, N.* A protein kinase A–regulated network encodes short-and long-lived cellular memories //Science Signaling. 2020. V. 13. №. 632. P. e3585
169. *Veri A. O., Robbins N., Cowen L. E.* Regulation of the heat shock transcription factor Hsf1 in fungi: implications for temperature-dependent virulence traits //FEMS yeast research. 2018. V. 18. №. 5. P. foy041
170. *Zander G., Krebber H.* Quick or quality? How mRNA escapes nuclear quality control during stress //RNA biology. 2017. V. 14. №. 12. P. 1642-1648

171. *Tiwari S., Raman Thakur J. S.* Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi //Biotechnology research international. 2015. V. 2015. P. e.132635
172. *Elmallah M.I.Y., Cordonnier M, Vautrot V., Chanteloup G., Garrido. C., Gobbo J.* Membrane-anchored heat-shock protein 70 (HSP70) in cancer // Cancer Lett. 2020. V. 469. P.134-141
173. *Yakubu UM, Morano KA.* Roles of the nucleotide exchange factor and chaperone Hsp110 in cellular proteostasis and diseases of protein misfolding //Biol Chem. 2018 V. 399. № 10. P. 1215-1221
174. *Koike N., Hatano Y., Ushimaru T.* Heat shock transcriptional factor mediates mitochondrial unfolded protein response //Current genetics. – 2018. V. 64. №. 4. P. 907-917
175. *Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N.* Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks //Nature reviews Molecular cell biology. 2019. V. 20. №. 5. P. 267-284
176. *Anderson N. S., Haynes C. M.* Folding the Mitochondrial UPR into the Integrated Stress Response //Trends in Cell Biology; 2020
177. *Horwich A. L., Fenton W. A.* Chaperonin-assisted protein folding: a chronologue //Quarterly Reviews of Biophysics. 2020. V. 53
178. *Kim, K. S., Maio, N., Singh, A., & Rouault, T. A.* Cytosolic HSC20 integrates de novo iron–sulfur cluster biogenesis with the CIAO1-mediated transfer to recipients //Human molecular genetics. 2018. V. 27. №. 5. P. 837-852
179. *Bar- Ziv R., Bolas T., Dillin A.* Systemic effects of mitochondrial stress //EMBO reports. 2020. P. e50094
180. *Naresh N. U., Haynes C. M.* Signaling and regulation of the mitochondrial unfolded protein response //Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2019. V. 11. №. 6. P. a033944
181. *Das, S., Banerjee, A., Kamran, M., Ejazi, S. A., Asad, M., Ali, N., & Chakrabarti, S.* A chemical inhibitor of heat shock protein 78 (BTIII78) from *Leishmania donovani*

- represents a potential anti-leishmanial drug candidate //Journal of Biological Chemistry. 2020. C. jbc. RA120. 014587
182. *Koike N., Hatano Y., Ushimaru T.* Heat shock transcriptional factor mediates mitochondrial unfolded protein response //Current genetics. 2018. V. 64. №. 4. P. 907-917
  183. *Kempf C., Lengeler K., Wendland J.* Differential stress response of *Saccharomyces* hybrids revealed by monitoring HSP104 aggregation and disaggregation //Microbiological Research. 2017. V. 200. P. 53-63
  184. *De Maio, A., Cauvi, D. M., Capone, R., Bello, I., Egberts, W. V., Arispe, N., & Boelens, W.* The small heat shock proteins,  $\beta$ TIIIIB1 and  $\beta$ TIIIIB5, interact differently with lipid membranes //Cell Stress and Chaperones. 2019. V. 24. №. 5. P. 947-956
  185. *Andrade-Linares D. R., Veresoglou S. D., Rillig M. C.* Temperature priming and memory in soil filamentous fungi //Fungal Ecology. 2016. V. 21. P. 10-15
  186. *Andrade-Linares D. R., Veresoglou S. D., Rillig M. C.* Temperature priming and memory in soil filamentous fungi //Fungal Ecology. 2016. V. 21. P. 10-15
  187. *Jamieson DJ.* Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // Yeast. 1998, V. 14, p. 1511-27
  188. *Rodrigues-Pousada Cl, Menezes RA, Pimentel C.* The Yap family and its role in stress response. // Yeast. 2010, V. 27, p. 245-58
  189. *Brown A.J.P, Budge S., Kaloriti D., Tillmann A., Jacobsen M.A., Yin Z., Ene I.V., Bohovych I., Sandai D., Kastora S., Potrykus J., Ballou E.R., Childers D.S., Shahana S. and Leach D. M.* Stress adaptation in a pathogenic fungus // The Journal of Experimental Biology. 2014. V. 217. P. 144 155
  190. *Molon M., Zadrzag-Tecza R.* Effect of temperature on replicative aging of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Biogerontology. 2016. V. 17. №. 2. P. 347-357
  191. *Brown A. J. P., Larcombe D. E., Pradhan A.* Thoughts on the evolution of Core Environmental Responses in yeasts //Fungal Biology. 2020. T. 124. №. 5. C. 475-481.

192. Leach, M. D., Tyc, K. M., Brown, A. J., & Klipp, E. Modelling the regulation of thermal adaptation in *Candida albicans*, a major fungal pathogen of humans //PLoS One. 2012. T. 7. №. 3. C. e32467
193. Glatz A., Pilbat A.M., Németh G.L., Vince-Kontár K., Jósvay K., Hunya Á., Udvardy A., Gombos I., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Z. Involvement of small heat shock proteins, trehalose, and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe* //Cell Stress and Chaperones. 2016. V. 21. №. 2. P. 327-338
194. Hoshida H., Akada R. High-temperature bioethanol fermentation by conventional and nonconventional yeasts //Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi. – Springer, Cham, 2017. P. 39-61
195. Arneaud S. L. B., Douglas P. M. The stress response paradox: fighting degeneration at the cost of cancer //The FEBS journal. 2016. V. 283. №. 22. P. 4047-4055
196. Gong, Y., Li, T., Yu, C., & Sun, S. *Candida albicans* heat shock proteins and HSPs-associated signaling pathways as potential antifungal targets //Frontiers in cellular and infection microbiology. 2017. T. 7. C. 520
197. Day A. M., Quinn J. Stress-activated protein kinases in human fungal pathogens //Frontiers in cellular and infection microbiology. 2019. V.17. № 9. P. 261
198. Leach, M. D., Budge, S., Walker, L., Munro, C., Cowen, L. E. and Brown, A. J. P. Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast //PLoS Pathog. 2012. I. 8. e1003069
199. Nicholls, S., MacCallum, D. M., Kaffarnik, F. A., Selway, L., Peck, S. C., & Brown, A. J. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* //Fungal Genetics and Biology. 2011. T. 48. №. 3. C. 297-305.
200. Mitchell A., Wei P., Lim W. A. Oscillatory stress stimulation uncovers an Achilles' heel of the yeast MAPK signaling network //Science. 2015. V. 350. №. 6266. P. 1379-1383

201. *Brown, A. J., Gow, N. A., Warris, A., & Brown, G. D.* Memory in fungal pathogens promotes immune evasion, colonisation, and infection //Trends in microbiology. 2019. V. 27. №. 3. P. 219-230
202. *Kaloriti D., Tillmann A., Cook E., Jacobsen M., You T., Lenardon M., Ames L., Barahona M., Chandrasekaran K., Coghill G., Goodman D., Gow N.A., Grebogi C., Ho H.L., Ingram P., McDonagh A., de Moura A.P., Pang W., Puttnam M., Radmaneshfar E., Romano M.C., Silk D., Stark J., Stumpf M., Thiel M., Thorne T., Usher J., Yin Z., Haynes K., Brown A.J.* Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species //Med Mycol. 2012 . V. 50. № 7. P. 699-709
203. *Гусева М.А., Энова Е.Ю., Ковалёв Л.И., Шевелёв А.Б.* Изучение механизмов адаптации дрожжей *Yarrowia lipolytica* к щелочным условиям среды методами протеомики //Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. №. 3. С. 336-341
204. *Serra-Cardona A., Canadell D., Ariño J.* Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. //Microb Cell. 2015. V. 2. № 6. P. 182-196
205. *Parrou J. L., Teste M. A., François J.* Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose //Microbiology. 1997. Т. 143. №. 6. С. 1891-1900
206. *Феофилова Е.П., Усов А.И., Мысякина И.С., Кочкина Г.А.* Трегалоза: особенности химического строения, биологические функции и практическое значение //Микробиология. 2014. Т. 83. №. 3. С. 271-271
207. *Mohammad, K., Dakik, P., Medkour, Y., McAuley, M., Mitrofanova, D., & Titorenko, V. I.* Some Metabolites act as second messengers in yeast chronological aging //International journal of molecular sciences. 2018. V. 19. №. 3. P. 860
208. *Kahraman H., Keskin Z. B.* The Importance of Trehalose Sugar //measurements. 2019. Т. 126. С. 127-135
209. *Lee H. J., Yoon Y. S., Lee S. J.* Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction //Cell death & disease. 2018. V. 9. – №. 7. P. 1-12

210. *Len J. S., Koh W. S. D., Tan S. X.* The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation //Bioscience reports. 2019.. 39. №. 8. P. BSR20191601
211. *Auesukaree C.* Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation //Journal of bioscience and bioengineering. 2017. V. 124. №. 2. P. 133-142
212. *Kushwah N., Jain V., Yadav D.* Osmolytes: A Possible Therapeutic Molecule for Ameliorating the Neurodegeneration Caused by Protein Misfolding and Aggregation //Biomolecules. 2020. V. 10. №. 1. P. 132
213. *Ianutsevich, E. A., Danilova, O. A., Kurilov, D. V., Zavarzin, I. V., & Tereshina, V. M.* Osmolytes and membrane lipids in adaptive response of thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* to cold, osmotic and oxidative shocks //Extremophiles. 2020. V. 24. № 3. P. 391-401
214. *Kaleta B., Górski A., Zagożdżon R., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Nawrot B., Klimaszewska M., Malinowska E., Górski S., Turło J.* Selenium-containing polysaccharides from *Lentinula edodes*—Biological activity //Carbohydrate polymers. 2019. V. 223. P. 115078
215. *Ianutsevich, E. A., Danilova, O. A., Groza, N. V., Kotlova, E. R., & Tereshina, V. M.* Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures //Microbiology. 2016. T. 162. №. 6. C. 989-999
216. *Uddin Pk M.M., Islam M.S., Pervin R., Dutta S., Talukder R.I., Rahman M.* Optimization of extraction of antioxidant polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm and its cytotoxic activity against murine lymphoid cancer cell line //Plos one. 2019. V. 14. №. 1. P. e0209371
217. *Kordowska- Wiater M.* Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects //Journal of applied microbiology. 2015. V. 119. №. 2. P. 303-314
218. *Patel T. K., Williamson J. D.* Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions //Trends in plant science. 2016. V. 21. №. 6. P. 486-497



219. *Rathore S. S., Raman T., Ramakrishnan J.* Magnesium ion acts as a signal for capsule induction in *Cryptococcus neoformans* //Frontiers in microbiology. 2016. V. 7. P. 325
220. *Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J.* The role of the membrane lipid composition in the oxidative stress tolerance of different wine yeasts //Food microbiology. 2019. T. 78. C. 143-154
221. *Renne M. F., de Kroon A. I. P. M.* The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes //FEBS letters. 2018. V. 592. №. 8. P. 1330-1345
222. *Yang, H. J., Osakada, H., Kojidani, T., Haraguchi, T., & Hiraoka, Y.* Lipid droplet dynamics during *Schizosaccharomyces pombe* sporulation and their role in spore survival //Biology Open. 2017. V. 6. №. 2. P. 217-222
223. *Alza, N. P., Iglesias González, P. A., Conde, M. A., Uranga, R. M., & Salvador, G. A.* Lipids at the Crossroad of  $\alpha$ -Synuclein Function and Dysfunction: Biological and Pathological Implications //Frontiers in cellular neuroscience. 2019. V. 13. P 175
224. *Homma T., Fujii J.* Emerging connections between oxidative stress, defective proteolysis, and metabolic diseases //Free Radical Research. 2020. P. 1-16
225. *Tang W., Jiang Y.F., Ponnusamy M., Diallo M.* Role of Nrf2 in chronic liver disease //World J. Gastroenterol. 2014 V. 20. P. 13079-13087
226. *Georgiadi A., Kersten S.* Mechanisms of gene regulation by fatty acids //Advances in nutrition //Adv. Nutr. 2012. V. 3. P. 12 7-134
227. *Wang Q., London E.* Lipid structure and composition control consequences of interleaflet coupling in asymmetric vesicles //Biophysical journal. 2018. V. 115. №. 4. P. 664-678
228. *Khmelinskaia A., Marquês J.M.T., Bastos A.E.P., Antunes C.A.C., Bento-Oliveira A., Scolari S., Lobo G.M.D.S., Malhó R., Herrmann A., Marinho H.S., de Almeida R.F.M.* Liquid-ordered phase formation by mammalian and yeast sterols: A common feature with organizational differences //Frontiers in cell and developmental biology. 2020. V. 8. P. 337

229. *Masanao K., Takumi K., Nobuaki M.* Assembly formation of minor dihydrosphingomyelin in sphingomyelin-rich ordered membrane domains //Scientific Reports (Nature Publisher Group). 2020. V. 10. №. 1. P. 1-10
230. *Rollero, S., Mouret, J. R., Sanchez, I., Camarasa, C., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J. M., & Dequin, S.* Key role of lipid management in nitrogen and aroma metabolism in an evolved wine yeast strain //Microbial cell factories. 2016. V. 15. №. 1. P. 1-15; *Kraft M.L.* Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts //Mol Biol Cell. 2013. V. 24. № 18. P. 2765-2768
231. *Jordá T., Puig S.* Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* //Genes. 2020. V. 11. №. 7. P. 795.; *Jacquier N., Schneiter R.* Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast //The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2012. V. 129. №. 1-2. P. 70-78
232. *Sankaran J., Wohland T.* Fluorescence strategies for mapping cell membrane dynamics and structures //APL Bioengineering. 2020. V. 4. №. 2. P. 020901
233. *Dupont S., Beney L., Ferreira T., Gevaris P.* Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2011. V. 1808. P. 1520-1528
234. *Kodedová M, Sychrová H.* Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae* //PLoS One. 2015. V. 10. №. 9. P. e0139306
235. *Yan D., Lin X., Qi Y., Liu H., Chen X., Liu L. and Chen J.* Crz1p Regulates pH Homeostasis in *Candida glabrata* by Altering Membrane Lipid Composition // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. № 23. P. 6920-6929
236. *Yazawa H., Iwahashi H., Kamisaka Y., Kimura K., Uemura H.* Production of polyunsaturated fatty acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to alkaline pH tolerance //Yeast. 2009 V. 26. № 3. P. 167-84
237. *Casu, F., Pinu, F. R., Stefanello, E., Greenwood, D. R., & Villas-Bôas, S. G.* The fate of linoleic acid on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism under aerobic and anaerobic conditions //Metabolomics. 2018. V. 14. №. 8. P. 103

238. Yang, Y., Xia, Y., Hu, W., Tao, L., Ni, L., Yu, J., & Ai, L. Membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* from Huangjiu (Chinese rice wine) is variably regulated by OLE1 to offset the disruptive effect of ethanol //Applied and environmental microbiology. 2019. V. 85. №. 23. P. e01620-19
239. Stratford, M., Steels, H., Novodvorska, M., Archer, D. B., & Avery, S. V. Extreme osmotolerance and halotolerance in food-relevant yeasts and the role of glycerol-dependent cell individuality //Frontiers in microbiology. 2019. V. 9. P. 3238
240. Януцевич Е.А., Данилова О.А., Гроза Н.В., Терёшина В.М. Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического, окислительного и холодового воздействий // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 283-292
241. Wang H., Zhang C., Xiao H. Mechanism of membrane fusion: protein-protein interaction and beyond //International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. 2019. V. 11. №. 6. P. 250
242. Ikon N., Ryan R. O. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2017. V. 1859. №. 6. P. 1156-1163
243. Rostovtseva, T. K., Queralt-Martín, M., Rosencrans, W. M., & Bezrukov, S. M. Targeting the multiple physiologic roles of VDAC with steroids and hydrophobic drugs //Frontiers in Physiology. 2020. V. 11. P. 466
244. Burnet, M. C., Zamith-Miranda, D., Heyman, H. M., Weitz, K. K., Bredeweg, E. L., Nosanchuk, J. D., & Nakayasu, E. S. Remodeling of the Histoplasma Capsulatum Membrane Induced by Monoclonal Antibodies //Vaccines. 2020. V. 8. №. 2. P. 269
245. Bouklas, T., Munshi, M., Del Poeta, M., & Fries, B. C. Bouklas T. et al. Lipid Regulation in Pathogenic Fungi //Analysis of Membrane Lipids. – Springer, New York, NY, 2020. P. 13-19
246. Fugio L. B., Coeli-Lacchini F. B., Leopoldino A. M. Sphingolipids and Mitochondrial Dynamic //Cells. – 2020. V. 9. №. 3. P. 581
247. Spincemaille P., Cammue B. P., Thevissen K. Sphingolipids and mitochondrial function, lessons learned from yeast //Microbial Cell. 2014. V. 1. №. 7. P. 210

248. *Mota Fernandes C., Del Poeta M.* Fungal sphingolipids: role in the regulation of virulence and potential as targets for future antifungal therapies //Expert Review of Anti-infective Therapy. 2020. P. 1-10
249. *Lee, Y. J., Jeschke, G. R., Roelants, F. M., Thorner, J., & Turk, B. E.* Reciprocal phosphorylation of yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenases in adaptation to distinct types of stress //Molecular and cellular biology. 2012. V. 32. №. 22. P. 4705-4717
250. *Guo Q., Zhang T., Meng N., Duan Y., Meng Y., Sun D., Liu Y., Luo G.* Sphingolipids are required for exocyst polarity and exocytic secretion in *Saccharomyces cerevisiae* //Cell & bioscience. 2020. V. 10. P. 1-11
251. *Wallace E.W., Kear-Scott J.L., Pilipenko E.V., Schwartz M.H., Laskowski P.R., Rojek A.E., Katanski C.D., Riback J.A., Dion M.F., Franks A.M., Airoidi E.M., Pan T., Budnik B.A., Drummond D.A.* Reversible, specific, active aggregates of endogenous proteins assemble upon heat stress //Cell. 2015. V. 162. №. 6. P. 1286-1298
252. *Howie R.L., Jay-Garcia L.M., Kiktev D.A., Faber Q.L., Murphy M., Rees K.A., Sachwani N., Chernoff Y.O.* Role of the cell asymmetry apparatus and ribosome-associated chaperones in the destabilization of a *Saccharomyces cerevisiae* prion by heat shock //Genetics. 2019. V. 212. №. 3. P. 757-771
253. *Yoshida, M., Kato, S., Fukuda, S., & Izawa, S. shida M.* Acquired Resistance to Severe Ethanol Stress in *Saccharomyces cerevisiae* Protein Quality Control //Applied and environmental microbiology. – 2021. – T. 87. – №. 6. – C. e02353-20
254. *Mathew V., Stirling P.C.* Protein quality control meets transcriptome remodeling under stress. //Cell Stress. 2017. V. 1. № 3. P. 134-135
255. *Owen M.C., Gnutt D., Gao M. Wärmländer S.K.T.S., Jarvet J., Gräslund A., Winter R., Ebbinghaus S., Strodel B.* Effects of in vivo conditions on amyloid aggregation //Chemical Society Reviews. 2019. V. 48. №. 14. P. 3946-3996
256. *Gaur, D., Singh, P., Guleria, J., Gupta, A., Kaur, S., & Sharma, D.* The yeast Hsp70 cochaperone Ydj1 regulates functional distinction of Ssa Hsp70s in the Hsp90 chaperoning pathway //Genetics. 2020. T. 215. №. 3. C. 683-698

257. *Klaips C. L., Jayaraj G. G., Hartl F. U.* Pathways of cellular proteostasis in aging and disease //Journal of Cell Biology. 2018. V. 217. №. 1. P. 51-63
258. *Szymczak L. C., Kuo H. Y., Mrksich M.* Peptide arrays: development and application //Analytical chemistry. 2018. V. 90. №. 1. P. 266
259. *Ho B., Baryshnikova A., Brown G. W.* Unification of protein abundance datasets yields a quantitative *Saccharomyces cerevisiae* proteome //Cell systems. 2018. V. 6. №. 2. P. 192-205. e3
260. *Fletcher M., Higgins S., Jelic M., Klum S., Muller B., Peng Z.J., Rai D., Ros V., Singh M., Wende H.V., Kennedy B.K., Kaeberlein M.* Stress profiling of longevity mutants identifies Afg3 as a mitochondrial determinant of cytoplasmic mRNA translation and aging //Aging cell. 2013. T. 12. №. 1. C. 156-166
261. *Marquez-Lona, E. M., Torres-Machorro, A. L., Gonzales, F. R., Pillus, L., & Patrick, G. N.* Phosphorylation of the 19S regulatory particle ATPase subunit, Rpt6, modifies susceptibility to proteotoxic stress and protein aggregation //PloS one. 2017. T. 12. №. 6. C. e0179893
262. *Gerstel, A., Beas, J. Z., Duverger, Y., Bouveret, E., Barras, F., & Py, B.* Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins //The Journal of biological chemistry. 2017. V. 292. №. 43. P. 17979
263. *Gonia, S., Norton, J., Watanaskul, L., Pulver, R., Morrison, E., Brand, A., & Gale, C. A.* *Rax2* is important for directional establishment of growth sites, but not for reorientation of growth axes, during *Candida albicans* hyphal morphogenesis //Fungal Genetics and Biology. 2013. T. 56. C. 116-124
264. *Reardon, B. J., Gordon, D., Ballard, M. J., & Winter, E.* DNA binding properties of the *Saccharomyces cerevisiae* DAT1 gene product //Nucleic acids research. 1995. T. 23. №. 23. C. 4900-4906
265. *Lohse M.B. Rosenberg O.S., Cox J.S., Stroud R.M., Finer-Moore J.S., Johnson A.D.* Structure of a new DNA-binding domain which regulates pathogenesis in a wide variety of fungi //Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 V. 111. № 29. P. 10404-10410

266. McGuire A.T., Mangroo D. Cex1p facilitates Rna1p-mediated dissociation of the Los1p-tRNA-Gsp1p-GTP export complex //Traffic. 2012. V. 13. № 2. P. 234-256
267. Guo, H., Wan, H., Chen, H., Fang, F., Liu, S., & Zhou, J. Proteomic analysis of the response of  $\alpha$ -ketoglutarate-producer *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 to environmental pH stimuli //Applied microbiology and biotechnology. 100(20), 8829-8841
268. Гусева, М. А., Энова, Е. Ю., Ковалёв, Л. И., Шевелёв, А. Б. Изучение механизмов адаптации дрожжей *Yarrowia lipolytica* к щелочным условиям среды методами протеомики //Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. №. 3. С. 336-341
269. Yang L.B., Dai X.M., Zheng Z.Y., Zhu L., Zhan X.B., Lin C.C. Proteomic Analysis of Erythritol-Producing *Yarrowia lipolytica* from Glycerol in Response to Osmotic Pressure //J Microbiol Biotechnol. 2015. V. 25. № 7. P. 1056-1069
270. Khilyas I.V., Lochnit G., Ilinskaya O.N. Proteomic Analysis of 2,4,6-Trinitrotoluene Degrading Yeast *Yarrowia lipolytica*. Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 2600
271. Webster D. L., Watson K. Ultrastructural changes in yeast following heat shock and recovery // Yeast. 1993.V. 9. P. 1165–1175
272. Ma M., Han P., Zhang R., and Li H. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress // Can. J. Microbiol. 2013. V. 59. P. 589-597
273. Cao, S., Xu, W., Zhang, N., Wang, Y., Luo, Y., He, X., & Huang, K. A mitochondria-dependent pathway mediates the apoptosis of GSE-induced yeast //PLoS One. 2012. V. 7. №. 3. P. e32943
274. Palumbo, P., Vanoni, M., Cusimano, V., Busti, S., Marano, F., Manes, C., & Alberghina, L. Whi5 phosphorylation embedded in the G 1/S network dynamically controls critical cell size and cell fate //Nature communications. 2016. V. 7. №. 1. P. 1-14
275. Udom, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., & Auesukaree, C. Coordination of the cell wall integrity and high-osmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* //Applied and environmental microbiology. 2019. V. 85. №. 15. P. e00551-19

276. *Furukawa K., Innokentev A., Kanki T.* Regulatory Mechanisms of Mitochondrial Autophagy: Lessons From Yeast //Frontiers in Plant Science. 2019. Т. 10. P. 1479
277. *Deryabina Y., Isakova E., Sekova V., Antipov A., Saris N.-E. L.* Inhibition of free radical scavenging enzymes affects mitochondrial membrane permeability transition during growth and aging of yeast cells //J Bioenerg Biomembr. 2014. V. 46. P. 479-492
278. *Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Сузина Н.Е., Сорокин В.В., Меденцев А. Г.* Изменение ультраструктуры клеток *Yarrowia lipolytica* в стрессовых условиях //Микробиология. 2011. Т. 80. №3. С. 344-348
279. *Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R.* Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells //FEMS yeast research. 2014. Т. 14. №. 7. С.1068-1079.
280. *Reynolds E.S.* The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. P. 208-213
281. *Somogui M,* Determination of blood sugar // J. Biol. Chem. 1945. V. 160. P. 69
282. *Бробст К.М.* Газожидкостная хроматография триметилсилильных производных сахаров // Методы исследования углеводов / Под. ред. Ф.Я. Хорлина. М.: Мир. 1975. С. 9-13
283. *Nichols B,W,* Separation of the lipids of photosynthetic tissues; improvement in analysis by thin-layer chromatography // BBA. 1963. V. 4145. P. 417-422
284. *Кейтс М,* Техника липидологии. М.: Мир. 1975, 322 с.
285. *Benning C., Huang Z-H., Gage D,A,* Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 317. № 1. P. 103-111
286. *Blum H., Beier H., Gross H. J.* Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels //Electrophoresis. 1987. Т. 8. №. 2. С. 93-99.
287. *Ковалева М.А., Ковалев Л.И., Худайдатов А.И., Ефимочкин А.С., Шишкин С.С.* Сравнительный анализ белкового состава скелетной и сердечной мышц человека двумерным электрофорезом //Биохимия. 1994 Т. **59**. С. 675-681

288. *Лантев А.В., Шишкин С.С., Егоров Ц.А., Ковалев Л.И., Цветкова М.Н., Галюк М.А., Мусалыамов А.Х., Ефимочкин А.С.* Поиск новых продуктов генной экспрессии в сердечной мышце человека. Микросеквенирование белков после двумерного электрофореза. //Мол. Биология. 1994. Т. **28**. С. 52–58
289. *Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S., Kovalyova M.A., Ershova E.S., Egorov T.A., Musalyamov A.K.* The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart. //Electrophoresis. 1995 Т. **16**. С. 1160-1169
290. *Kovalyova, M. A., Kovalyov, L. I., Toropygin, I. Y., Shigeev, S. V., Ivanov, A. V., & Shishkin, S. S.* Proteomic analysis of human skeletal muscle (m. vastus lateralis) proteins: Identification of 89 gene expression products //Biochemistry (Moscow). – 2009. Т. 74. №. 11. С. 1239-1252
291. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование:(практическое пособие). – Наука, 1981
292. <https://biopython.org/>
293. *Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels //Analytical chemistry. 1996. Т. 68. №. 5. С. 850-858
294. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы мед. химии. 1990. Т. 2. С. 88-91
295. *Chance B. Maehly A.C.* The assay of catalases and peroxidases // Methods Biochem Anal. 1954. V. 1. P.357-424
296. *Davis J.B.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404-427
297. *Lledías F., Rangel P., Hansberg W.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 17. P. 10630-10637
298. *Верлан Н.В.* Клинико-фармакологический анализ состояния системы глутатиона при церебральной ишемии // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Москва. 2008. 37 с.



299. *Eruslanov E., Kusmartsev S.* Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry //Advanced protocols in oxidative stress II. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. C. 57-72
300. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //Analytical biochemistry. 1976. T. 72. №. 1-2. C. 248-254
301. *Shishodia S. K., Shankar J.* Proteomic analysis revealed ROS-mediated growth inhibition of *Aspergillus terreus* by shikonin //Journal of Proteomics. 2020. T. 224. C. 103849
302. *Manirafasha E., Murwanashyaka T., Ndikubwimana T., Ahmed N.R., Liu J., Lu Y., Zeng X., Ling X., Jing K.* Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch //Bioresource technology. 2018. T. 255. C. 293-301
303. *Zhang N., Cao L.* Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity //Current genetics. 2017. T. 63. №. 5. C. 839-843
304. *Бирюкова, Е. Н., Меденцев, А. Г., Аринбасарова, А. Ю., и Акименко, В. К.* Адаптация дрожжей *Yarrowia lipolytica* к тепловому воздействию //Микробиология. 2007. Т. 76. №. 2. С. 184-190
305. *Takagi H.* Molecular mechanisms and highly functional development for stress tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2021. Т. 85. №. 5. С. 1017-1037
306. *Nishida I, Watanabe D, Tsolmonbaatar A, Kaino T, Ohtsu I, Takagi H.* // J Gen Appl Microbiol. 2016. V. 62. № 3. P. 132-139
307. *Pascual-Ahuir, A., Manzanares-Estreder, S., Timón-Gómez, A., & Proft, M.* Ask yeast how to burn your fats: lessons learned from the metabolic adaptation to salt stress //Current genetics. 2018. Т. 64. №. 1. С. 63-69
308. *Ожован С. М., Кнорре Д.А., Северин Ф.Ф., Бакаева Л.Е.* // Цитология. 2009. Т. 51. № 11. С. 912-916

309. *Barbosa A. D., Siniossoglou S.* New kid on the block: lipid droplets in the nucleus //The FEBS journal. 2020. T. 287. №. 22. C. 4838-4843
310. *Wang, R., Huang, A., Wang, Y., Mei, P., Zhu, H., Chen, Q., & Xu, S.* High-Resolution Microscopy to Learn the Nuclear Organization of the Living Yeast Cells //Stem cells international. 2021. T. 2021
311. *Vishwakarma, A., Dalal, A., Tetali, S. D., Kirti, P. B., & Padmasree, K.* Genetic engineering of AtAOX1a in *Saccharomyces cerevisiae* prevents oxidative damage and maintains redox homeostasis //FEBS Open bio. 2016. T. 6. №. 2. C. 135-146
312. *Malecki, M., Kamrad, S., Ralser, M., & Bähler, J.* Mitochondrial respiration is required to provide amino acids during fermentative proliferation of fission yeast //EMBO reports. 2020. T. 21. №. 11. C. e50845
313. *Меденцев А. Г., Акименко В. К.* Развитие и активация цианидрезистентного дыхания у дрожжей *Yarrowia lipolytica* //Биохимия. 1999. Т. 64. №. 8. С. 1123-1131
314. *Magnan C., Yu J., Chang I., Jahn E., Kanomata Y., Wu J., Zeller M., Oakes M., Baldi P., Sandmeyer S.* Sequence assembly of *Yarrowia lipolytica* strain W29/CLIB89 shows transposable element diversity //PloS one. 2016. T. 11. №. 9. C. e0162363
315. *Medentsev, A. G., Arinbasarova, A. Y., Golovchenko, N. P., & Akimenko, V. K.* Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway //FEMS yeast research. 2002. T. 2. №. 4. C. 519-524
316. *Squarcina A., Sorarù A., Rigodanza F., Carraro M., Geremia S., Larosa V., Morosinotto T., Bonchio M.* Merged heme and non-heme manganese cofactors for a dual antioxidant surveillance in photosynthetic organisms //ACS Catalysis. 2017. T. 7. №. 3. C. 1971-1976
317. *Albi T., Serrano A.* Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer //World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016. T. 32. №. 2. C. 1-12.

318. *Tovmasyan A., Reboucas J. S., Benov L.* Simple biological systems for assessing the activity of superoxide dismutase mimics //Antioxidants & Redox Signaling. 2014. T. 20. №. 15. C. 2416-2436
319. *Mueller S., Riedel H. D., Stremmel W.* Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-removing enzyme in human erythrocytes //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. 1997. T. 90. №. 12. C. 4973-4978
320. *Santos, L. O., Silva, P. G. P., Lemos Junior, W. J. F., de Oliveira, V. S., & Anschau, A.* Glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and perspectives //Applied Microbiology and Biotechnology. 2022. C. 1-16
321. *Trip D. S. L., Youk H.* Yeasts collectively extend the limits of habitable temperatures by secreting glutathione //Nature microbiology. 2020. T. 5. №. 7. C. 943-954
322. *Bondarenko, S. A., Ianutsevich, E. A., Sinitsyna, N. A., Georgieva, M. L., Bilanenko, E. N., & Tereshina, B. M.* Dynamics of the cytosol soluble carbohydrates and membrane lipids in response to ambient pH in alkaliphilic and alkalitolerant fungi //Microbiology. 2018. T. 87. №. 1. C. 21-32
323. *Egermeier, M., Russmayer, H., Sauer, M., & Marx, H.* Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol //Frontiers in microbiology. 2017. T. 8. C. 49
324. *Tomaszewska, L., Rakicka, M., Rymowicz, W., & Rywińska, A.* A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells //FEMS yeast research. 2014. T. 14. №. 6. C. 966-976
325. *Patel T. K., Williamson J. D.* Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions //Trends in plant science. 2016. T. 21. №. 6. C. 486-497
326. *Upadhyay, R. S., Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., & Gupta, V. K.* Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions //Frontiers in microbiology. 2015. T. 6. C. 1019
327. *König P., Averhoff B., Müller V.* A first response to osmostress in *Acinetobacter baumannii*: transient accumulation of K<sup>+</sup> and its replacement by compatible solutes //Environmental Microbiology Reports. 2020. T. 12. №. 4. C. 419-423

328. *Carla Gonçalves, Carolina Ferreira, Luís G. Gonçalves, David L. Turner, Maria José Leandro, Madalena Salema-Oom, Helena Santos and Paula Gonçalves.* A new pathway for mannitol metabolism in yeasts suggests a link to the evolution of alcoholic fermentation //Frontiers in microbiology. 2019. T. 10. C. 2510
329. *Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., & Magalhães, R.* Revisiting yeast trehalose metabolism //Current genetics. 2015. T. 61. №. 3. C. 263-274
330. *Yancey P. H., Siebenaller J. F.* Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms //The Journal of experimental biology. 2015. T. 218. №. 12. C. 1880-1896
331. *Walther T., Mtimet N., Alkim C., Vax A., Loret M.O., Ullah A., Gancedo C., Smits G.J., François J.M.* Metabolic phenotypes of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with altered trehalose 6-phosphate dynamics //Biochemical Journal. 2013. T. 454. №. 2. C. 227-237
332. *Gancedo C., Flores C. L.* The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi //FEMS yeast research. 2004. T. 4. №. 4-5. C. 351-359
333. *Conlin L. K., Nelson H. C. M.* The natural osmolyte trehalose is a positive regulator of the heat-induced activity of yeast heat shock transcription factor //Molecular and cellular biology. 2007. T. 27. №. 4. C. 1505-1515
334. *Grum-Grzhimaylo O. A., Debets A. J. M., Bilanenko E. N.* The diversity of microfungi in peatlands originated from the White Sea //Mycologia. 2016. T. 108. №. 2. C. 233-254
335. *Koganti, S., Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N., & Ju, L. K.* Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield //Applied microbiology and biotechnology. 2011. T. 90. №. 1. C. 257-267
336. *Toyoda T., Ohtaguchi K.* Effect of temperature on D-arabitol production from lactose by *Kluyveromyces lactis* //Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2011. T. 38. №. 9. C. 1179-1185

337. *Sánchez-Fresneda, R., Guirao-Abad, J. P., Argüelles, A., González-Párraga, P., Valentín, E., & Argüelles, J. C.* Specific stress-induced storage of trehalose, glycerol and D-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in *Candida albicans* //Biochemical and biophysical research communications. 2013. T. 430. №. 4. C. 1334-1339
338. *Voegele, R. T., Hahn, M., Lohaus, G., Link, T., Heiser, I., & Mendgen, K.* Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae* //Plant Physiology. 2005. T. 137. №. 1. C. 190-198.
339. *Rockenfeller P., Gourlay C. W.* Lipotoxicity in yeast: a focus on plasma membrane signalling and membrane contact sites //FEMS yeast research. 2018. T. 18. №. 4. C. foy034
340. *Bondarenko S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolkina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M.* Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH //Extremophiles. 2017. T. 21. №. 4. C. 743-754
341. *Gientka, I., Gadaszewska, M., Błażej, S., Kieliszek, M., Bzducha-Wróbel, A., Stasiak-Róžańska, L., & Kot, A. M.* Evaluation of lipid biosynthesis ability by *Rhodotorula* and *Sporobolomyces* strains in medium with glycerol //European Food Research and Technology. 2017. T. 243. №. 2. C. 275-286
342. *Kot, A. M., Błażej, S., Kieliszek, M., Gientka, I., & Bryś, J.* Simultaneous production of lipids and carotenoids by the red yeast *Rhodotorula* from waste glycerol fraction and potato wastewater //Applied biochemistry and biotechnology. 2019. T. 189. №. 2. C. 589-607
343. *Mattanna, P., Dallé da Rosa, P., Gusso, A. P., Richards, N. S., & Valente, P.* Enhancement of microbial oil production by alpha-linolenic acid producing *Yarrowia lipolytica* strains QU22 and QU137 //Food Science and Biotechnology. 2014. T. 23. №. 6. C. 1929-1934
344. *Gálvez-López, D., Chávez-Meléndez, B., Vázquez-Ovando, A., & Rosas-Quijano, R.* The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* //Brazilian Journal of Microbiology. 2019. T. 50. №. 1. C. 23-31

345. *Kieliszek, M., Błażej, S., Bzducha-Wróbel, A., & Kot, A. M.* Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells //Biological trace element research. 2019. T. 187. №. 1. C. 316
346. *Haines T. H., Dencher N. A.* Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation //FEBS letters. 2002. T. 528. №. 1-3. C. 35-39
347. *Joshi, A. S., Zhou, J., Gohil, V. M., Chen, S., & Greenberg, M. L.* Cellular functions of cardiolipin in yeast //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2009. T. 1793. №. 1. C. 212-218
348. *Rostovtseva, T. K., Gurnev, P. A., Chen, M. Y., & Bezrukov, S. M.* Membrane lipid composition regulates tubulin interaction with mitochondrial voltage-dependent anion channel //Journal of Biological Chemistry. 2012. T. 287. №. 35. C. 29589-29598
349. *McMaster C. R.* From yeast to humans—roles of the Kennedy pathway for phosphatidylcholine synthesis //FEBS letters. 2018. T. 592. №. 8. C. 1256-1272
350. *Niu, L., Nomura, K., Iwahashi, H., Matsuoka, H., Kawachi, S., Suzuki, Y., & Tamura, K.* Petit-High Pressure Carbon Dioxide stress increases synthesis of S-Adenosylmethionine and phosphatidylcholine in yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Biophysical chemistry. 2017. T. 231. C. 79-86
351. *Boumann H.A., Gubbens J., Koorengevel M.C., Oh C.S., Martin C.E., Heck A.J., Patton-Vogt J., Henry S.A., de Kruijff B., de Kroon A.I.* Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote //Molecular biology of the cell. 2006. T. 17. №. 2. C. 1006-1017
352. *Klose C., Tarasov K.* Profiling of yeast lipids by shotgun lipidomics //Yeast Functional Genomics. – Humana Press, New York, NY, 2016. C. 309-324
353. *Yang, L., Kong, W., Yang, W., Li, D., Zhao, S., Wu, Y., & Zheng, S.* High D-arabitol production with osmotic pressure control fed-batch fermentation by *Yarrowia lipolytica* and proteomic analysis under nitrogen source perturbation //Enzyme and Microbial Technology. 2021. C. 109936
354. *Vega R., Domínguez A.* Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Yarrowia lipolytica* //Archives of microbiology. 1986. T. 144. №. 2. C. 124-130

355. *Free SJ.* Fungal cell wall organization and biosynthesis// *Adv Genet.* 2013 T. 81. C. 33-82
356. *Teparić R., Lozančić M., Mrša V.* Evolutionary Overview of Molecular Interactions and Enzymatic Activities in the Yeast Cell Walls // *International Journal of Molecular Sciences.* 2020. T. 21. №. 23. C. 8996
357. *Horwich A. L., Fenton W. A.* Chaperonin-assisted protein folding: a chronologue // *Quarterly reviews of biophysics.* 2020. T. 53
358. *Seto E., Yoshida M.* Cold Spring Harbor Perspect // *Biol.* 2014. T. 6. C. a018713
359. *Workman M., Holt P., Thykaer J.* Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations // *Amb Express.* 2013. T. 3. №. 1. C. 1-9
360. *Epova, E., Guseva, M., Kovalyov, L., Isakova, E., Deryabina, Y., Belyakova, A., Zylkova, M., and Shevelev, A.,* Proteomic Applications in Biology, Croatia: InTech., 2012, pp. 209-224
361. *Endo T., Sakaue H.* Multifaceted roles of porin in mitochondrial protein and lipid transport // *Biochemical Society Transactions.* 2019. T. 47. №. 5. C. 1269-1277;  
*Grevel A., Becker T.* Porins as helpers in mitochondrial protein translocation // *Biological chemistry.* 2020. T. 401. №. 6-7. C. 699-708
362. *Sanyal SK, Kanwar P, Fernandes JL, Mahiwal S, Yadav AK, Samtani H, Srivastava AK, Suprasanna P, Pandey GK.* Arabidopsis mitochondrial voltage-dependent anion channels are involved in maintaining reactive oxygen species homeostasis, oxidative and salt stress tolerance in yeast // *Frontiers in plant science.* 2020. T. 11. C. 50
363. *A. Shevade, V. Strogolova, M. Orlova, C. T. Yeo, S. Kuchin* Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel Protein Por1 Positively Regulates the Nuclear Localization of *Saccharomyces cerevisiae* AMP-Activated Protein Kinase // *Msphere.* 2018. T. 3. №. 1. C. e00482-17
364. *Miyata N., Fujii S., Kuge O.* Porin proteins have critical functions in mitochondrial phospholipid metabolism in yeast // *Journal of Biological Chemistry.* 2018. T. 293. №. 45. C. 17593-17605

365. *Liszka A, Schimpf R, Cartuche Zaruma KI, Buhr A, Seidel T, Walter S, Knuesting J, Dreyer A, Dietz KJ, Scheibe R, Selinski J.* Three cytosolic NAD-malate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*: on the crossroad between energy fluxes and redox signaling //Biochemical Journal. 2020. T. 477. №. 19. C. 3673-3693
366. *Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL.* Regulation of clathrin-mediated endocytosis //Annual review of biochemistry. 2018. T. 87. C. 871-896
367. *Shishkin S., Eremina L., Pashintseva N., Kovalev L., Kovaleva M.* Cofilin-1 and Other ADF/Cofilin Superfamily Members in Human Malignant //International journal of molecular sciences. 2017. T. 18. №. 1. C. 10
368. *Wang Q, Yuan W, Yang X, Wang Y, Li Y, Qiao H.* Role of Cofilin in Alzheimer's Disease. //Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020. T. 8. C. 1357
369. *Flores CL, Gancedo C, Petit T.* Disruption of *Yarrowia lipolytica* TPS1 gene encoding trehalose-6-P synthase does not affect growth in glucose but impairs growth at high temperature //PLoS One. 2011. T. 6. №. 9. C. e23695
370. *Araiza-Olivera D., Sampedro J. G., Mújica A., Peña A., Uribe-Carvajal S.* The association of glycolytic enzymes from yeast confers resistance against inhibition by trehalose //FEMS yeast research. 2010. T. 10. №. 3. C. 282-289
371. *Jastrzqb A., Skrzydlewska E.* Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors //Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2021. T. 36. №. 1. C. 362-371
372. *Tishkov V. I., Popov V. O.* Protein engineering of formate dehydrogenase //Biomolecular engineering. 2006. T. 23. №. 2-3. C. 89-110
373. *Takacs, M., Makhlynets, O. V., Tolbert, P. L., & Korendovych, I. V.* Secretion of functional formate dehydrogenase in *Pichia pastoris* //Protein Engineering, Design and Selection. 2017. T. 30. №. 3. C. 279-284
374. *Jakoblinnert, A., Bocola, M., Bhattacharjee, M., Steinsiek, S., Bönitz- Dulat, M., Schwaneberg, U., & Ansorge- Schumacher, M. B.* Who's Who? Allocation of Carbonyl Reductase Isoenzymes from *Candida parapsilosis* by Combining Bio- and Computational Chemistry //ChemBioChem. 2012. T. 13. №. 6. C. 803-809



375. *Dhoke, G. V., Ensari, Y., Davari, M. D., Ruff, A. J., Schwaneberg, U., & Bocola, M.* What's my substrate? Computational function assignment of *Candida parapsilosis* ADH5 by genome database search, virtual screening, and QM/MM calculations //Journal of chemical information and modeling. 2016. T. 56. №. 7. C. 1313-1323
376. *Nirody J. A., Budin I., Rangamani P.* ATP synthase: Evolution, energetics, and membrane interactions //Journal of General Physiology. 2020. T. 152. №. 11. C. e201912475
377. *Andersson R, Eisele-Bürger AM, Hanzén S, Vielfort K, Öling D, Eisele F, Johansson G, Gustafsson T, Kvint K, Nyström T.* Differential role of cytosolic Hsp70s in longevity assurance and protein quality control //PLoS genetics. 2021. T. 17. №. 1. C. e1008951
378. *Timón-Gómez, A., Bartley-Dier, E. L., Fontanesi, F., & Barrientos, A.* HIGD-driven regulation of cytochrome c oxidase biogenesis and function //Cells. 2020. T. 9. №. 12. C. 2620
379. *De Pinto V.* Renaissance of VDAC: new insights on a protein family at the interface between mitochondria and cytosol //Biomolecules. 2021. T. 11. №. 1. C. 107
380. *McNeilly D., Schofield A., Stone S. L.* Degradation of the stress-responsive enzyme formate dehydrogenase by the RING-type E3 ligase Keep on Going and the ubiquitin 26S proteasome system //Plant molecular biology. 2018. T. 96. №. 3. C. 265-278
381. *Rashid M.A., Haque M., Akbar M.* Detoxification of Carbonyl Compounds by Carbonyl Reductase in Neurodegeneration //Adv Neurobiol. 2016. T. 12. C. 355-365
382. *Kwon J.H., Lee J., Kim J., Kirchner V.A., Jo Y.H., Miura T., Kim N., Song G.W., Hwang S, Lee S.G., Yoon Y.I., Tak E.* Upregulation of Carbonyl Reductase 1 by Nrf2 as a Potential Therapeutic Intervention for Ischemia/ Reperfusion Injury during Liver Transplantation. //Mol Cells. 2019. T. 42. №.9. C. 672-685
383. *Jacob F., Monod J.* Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins //J Mol Biol. 1961 T. 3 C. 318-356

384. *Fukushima, T., Yamada, K., Hojo, N., Isobe, A., Shiwaku, K., & Yamane, Y.*  
Mechanism of cytotoxicity of paraquat: III. The effects of acute paraquat exposure on  
the electron transport system in rat mitochondria //Experimental and Toxicologic  
Pathology. 1994. T. 46. №. 6. C. 437-441

## ПРИЛОЖЕНИЕ

№	условия	М эксп.	Pi эксп.	М теор.	Pi теор.	"Score"	Название белка	функция	локализация	метаболический путь	организм- хозяин	комментарий
1	Контроль	27	8	29.60	8.8	303	YALI0F17314p	митохондриальный порин (VDAC)	МТХ	митохондриальный транспорт	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
2	Контроль	30	7	35.80	8.5	554	YALI0D16753p	малатдегидрогеназа	МТХ/ЦТП	ЦТК	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
3	Контроль	32	7	35.80	6.6	227	YALI0C06369p	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	ЦТП	гликолиз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
4	Контроль	33	4	34.10	4.5	154	YALI0B03564p	проявляет активность 1,3-бета-глюканозилтрансферазы	КС/экскретир уемый	метаболизм углеводов/белок клеточной стенки	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
5	Контроль	50	4	29.70	4.2	169	YALI0B20306p	маннопротеин клеточной стенки (Pir1)	КС	белок клеточной стенки	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
6	Контроль	60	5.6	60.50	6.6	233	YALI0F02805p	шаперон 60 кДа-БТШ	МТХ	фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
7	Контроль	21	4.2	70.40	4.6	96	YALI0F25289p	70 кДа БТШ	цтп/ядро/ЦПМ	фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	фрагмент
8	Контроль	21	4.8	18.60	4.9	196	YALI0F27049p	тропомиозин	ЦС	белок цитоскелета	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
9	Контроль	16	4	14.80	4.4	97	YALI0D22022p	δ-субъединица АТФ-синтазы	МТХ	окислительное фосфорилирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
10	Контроль	12	4.5	58.00	4.8	149	YALI0F03179p	α-субъединица АТФ-синтазы	МТХ	окислительное фосфорилирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси/фрагмент
10	Контроль	12	4.5	17.00	4.8	90	YALI0E10144p	VI субъединица цитохром С-оксидазы	МТХ	окислительное фосфорилирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
11	Контроль	10	4.2	11.50	4.6	181	YALI0F01496p	тиоредоксин		редокс-гомеостаз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	

12	Контроль	15	5	17.60	5.2	103	YALI0E19723p	цепь IV цитохром- ц-оксидазы	МТХ	окислительное фосфорилировани е	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
13	Контроль	9	5.8	13.40	5.7	108	YALI0B07183p	профилин	ЦС	белок цитоскелета	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
13	Контроль	9	5.8	15.40	5.7	77	A0A1H6Q0M6	40S рибосомальный белок S14	рибосома	трансляция	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
14	Контроль	11	6.1	11.60	6	215	YALI0B10450p	пептидил-пролил- цис-транс-изомераз		фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
15	Контроль	9	7	14.80	9.8	384	ubiquitin-60S ribosomal protein L40 fusion protein	убиквитин	ядро/цтп	трансляция/убикв итинирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
16	Контроль	16	5.9	17.20	6.8	76	YALI0F09229p	нуклеозид- дифосфаткиназа		синтез нуклеотидов	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
16	Контроль	15	6.7	15.90	5.9	152	YALI0E12133p	Cu/Zn супероксиддисмута а	цтп	редокс-гомеостаз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
16	Контроль	15	7	17.80	6.9	179	YALI0C10230p	пептидил-пролил- цис-транс-изомераз		фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
18	Контроль	23	6.5	26.70	6.3	190	YALI0F05214p	триозофосфатизомер аза	цтп	гликолиз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
19	Контроль	23	6.7	24.60	5.9	118	YALI0A19426p	тиолспецифичная пероксидаза	цтп/мтх	редокс-гомеостаз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
20	ЩС	27	8	29.60	8.8	303	YALI0F17314p	митохондриальный порин (VDAC)	МТХ	митохондриальны й транспорт	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
21	ЩС	30	7	35.80	8.5	554	YALI0D16753p	малатдегидрогеназа	МТХ/цтп	ЦТК	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
22	ЩС	32	7	35.80	6.6	227	YALI0C06369p	глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназ а	цтп	гликолиз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
23	ЩС	33	4	34.10	4.5	154	YALI0B03564p	проявляет активность 1,3-бета- глюканозилтрансфе разы	КС/экскретир уемый	метаболизм углеводов/белок клеточной стенки	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
24	ЩС	30	4	31.00	4.4	79	YALI0B09339p	проявляет активность активатора эндопептидазы	ядро/цтп	убиквитинировани е	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси

24	ЩС	32	4	70.20	4.9	70	YALI0D08184p	70-кДа БТШ (SSA4)	цтп/ядро/ЦП М	фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси/фрагмент
25	ЩС	60	6	57.00	6.6	178	YALI0D00451p	неохарактеризованный белок			<i>Yarrowia lipolytica</i>	
26	ЩС	50	5.5	60.50	6.6	532	YALI0F02805p	шаперон 60 кДа-БТШ	mtx	фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	фрагмент
27	ЩС	21	4.8	18.60	4.9	300	YALI0F27049p	тропомиозин	ЦС		<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
27	ЩС	21	4.8	70.20	4.9	115	YALI0D08184p	70-кДа БТШ (SSA4)	цтп/ядро/ЦП М	фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси/фрагмент
27	ЩС	21	4.8	21.80	5.9	81	YALI0B07007p	Активность НАДФН-дегидрогеназы		редокс-гомеостаз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
28	ЩС	20	4.5	14.60	4.61	111	YALI0F08327p	неохарактеризованный белок			<i>Yarrowia lipolytica</i>	
29	ЩС	16	4	18.40	4.4	81	YALI0A10879p	SCF-субъединица комплекса убиквитин-лигазы E3	ядро/цтп	убиквитинирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
29	ЩС	16	4	14.80	4.4	79	YALI0D22022p	δ-субъединица АТФ-синтазы	mtx	окислительное фосфорилирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
30	ЩС	15	4.8		5.3	163	YALI0E32736p	бис(5'-аденозил)-трифосфатаза			<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси/фрагмент
30	ЩС	15	5	17.60	5.2	116	YALI0E19723p	цепь IV цитохром-с-оксидазы	mtx	окислительное фосфорилирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
31	ЩС	12	4.5	16.10	4.8	162	YALI0E03388p	легкая цепь миозина			<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
31	ЩС	12	4.5	17.00	4.8	90	YALI0E10144p	VI субъединица цитохром С-оксидазы	mtx/mim	окислительное фосфорилирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
32	ЩС	10	4.2	11.50	4.6	162	YALI0F01496p	тиоредоксин		редокс-гомеостаз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
33	ЩС	9	5.8	15.40	5.7	287	A0A1H6Q0M6	40S ribosomal protein S14	рибосома	трансляция	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
34	ЩС	11	5.8	13.00	5.2	193	YALI0A10747p	неохарактеризованный белок			<i>Yarrowia lipolytica</i>	

35	ЩС	16	5.9	17.20	5.6	135	YALI0C03443p	малый 20-кДа БТШ		фолдинг/ответ на стресс	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
35	ЩС	16	5.9	17.20	6.3	76	YALI0F09229p	нуклеозид-дифосфаткиназа		синтез нуклеотидов	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
36	ЩС	17	6.5	17.30	5.5	279	YALI0F08393p	β-субъединица незрелого полипептид-ассоциированного комплекса	ядро/цтп	фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
37	ЩС	9	7	14.80	9.8	384	ubiquitin-60S ribosomal protein L40 fusion protein	убиквитин	ядро/цтп	трансляция/убиквитинирование	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
38	ЩС	15	6.7	15.90	5.9	200	YALI0E12133p	Cu/Zn супероксиддисмутаза	цтп	редокс-гомеостаз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
38	ЩС	15	6.7	17.80	6.9	108	YALI0C10230p	пептидил-пролил-цис-транс-изомераза		фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	в составе смеси
39	ЩС	15	6.7	17.80	6.9	176	YALI0C10230p	пептидил-пролил-цис-транс-изомераза		фолдинг	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
40	ЩС	23	6.5	26.70	6.3	401	YALI0F05214p	триозофосфатизомераза	цтп	гликолиз	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
41	ЩС	23	6.5	70.00	5.4	148	YALI0C17347p	70-кДа БТШ (SSA1)	мтх/цтп	фолдинг/ответ на стресс	<i>Yarrowia lipolytica</i>	var/фрагмент
42	ТС	34	5.0	70.10	5.1	112	YALI0D22352p	70-кДа БТШ (SSA4)	ядро/цтп	фолдинг/ответ на стресс	<i>Yarrowia lipolytica</i>	фрагмент
43	ТС	36	5.0	61.20	5	141	CPAR2_700380	70-кДа БТШ	цтп	фолдинг/ответ на стресс	<i>Candida parapsilosis</i>	фрагмент/в составе смеси
43	ТС	36	5.0	33.40	5.2	129	CPAR2_106080	проявляет активность дисульфид-оксидоредуктазы	мтх/mim	митохондриальный транспорт	<i>Candida parapsilosis</i>	в составе смеси
44	ТС	23	4.5	70.10	5	84	YALI0E35046p	70-кДа БТШ (SSA4)	цтп/ядро/ЦПМ	фолдинг/ответ на стресс	<i>Yarrowia lipolytica</i>	фрагмент
45	ТС	18	5.0	17.02	5.3	83	YALI0F20856p	кофилин	ядро/цтп/ЦС	регуляция клеточного цикла/деление	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
46	ТС	17	5.0	15.0	5.7	95	CPAR2_203450	формиатдегидрогеназа		катаболизм формиата	<i>Candida parapsilosis</i>	

47	ТС	17	9.0	39.8	5.4	147	CPAR2_401230	фруктозо- бифосфатальдолаза	МТХ/ЦТП	гликолиз	<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	фрагмент
48	ТС	23	8.7	27.40	8.5	148	Q0ZIC1_CANP A	фактор α-1 элонгации цитоплазматическо й ГТФ-азы	ЦТП	трансляция	<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	
49	ТС	20	7.0	56.40	6.5	250	CPAR2_802980	неохарактеризованн ый белок			<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	фрагмент
50	ТС	20	4.0	40.30	6.5	86	YALI0B22506p	формиатдегидроген аза		катаболизм формиата	<i>Yarrowia lipolytica</i>	фрагменты одного белка с различным Pi
51	ТС	20	5.3	40.30	6.5	86	YALI0B22506p	формиатдегидроген аза		катаболизм формиата	<i>Yarrowia lipolytica</i>	фрагменты одного белка с различным Pi
52	ТС	11	6	11.30	5.3	172	CPAR2_200490	тиоредоксин		редокс-гомеостаз	<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	
53	ТС	23	6.2	70.50	5.1	173	YALI0D22352p	70-кДа БТШ (SSA4)	ядро/ЦТП	фолдинг/ответ на стресс	<i>Yarrowia lipolytica</i>	фрагмент
54	ТС	16	6.5	16.20	5.4	201	CPAR2_500390	Cu/Zn супероксиддисмутаза	ЦТП	редокс-гомеостаз	<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	
55	КС	20	9.5	23.10	9.7	182	CPAR2_503440	субъединица 5 АТФ-синтазы	МТХ	окислительное фосфорилирование	<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	
56	КС	14	8.7	37.10	6.3	92	CPCR1	карбонилредуктаза			<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	
57	КС	14	8.5	50.00	9.1	125	CPAR2_20706 0	фактор α-1 элонгации цитоплазматическо й ГТФ-азы		трансляция	<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	фрагмент
58	КС	12	8.7	37.10	6.3	99	CPCR1	карбонилредуктаза			<i>Candida parapsilosi</i> <i>s</i>	фрагмент или субъединица

58	КС	12	8.7	43.00	8.6	94	CPAR2_502580	карбонилредуктаза			<i>Candida parapsilosis</i>	фрагмент
59	КС	13	7	16.80	6.7	142	CPAR2_101390	нуклеозид-дифосфаткиназа	МТХ/ЦТП	синтез нуклеотидов	<i>Candida parapsilosis</i>	фрагмент
60	КС	13	6.5	36.10	6.2	114	CPAR2_808670	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	ЦТП	гликолиз	<i>Candida parapsilosis</i>	
61	КС	16	6.9	16.00	5.4	148	CPAR2_500390	Cu/Zn супероксиддисмутаза	ЦТП	редокс-гомеостаз	<i>Candida parapsilosis</i>	фрагмент
62	КС	13	5.3	12.50	4.8	82	CPAR2_406210	белок, содержащий SBDS-домен		биогенез рибосом	<i>Candida parapsilosis</i>	
63	КС	30	5	61.00	5	146	CPAR2_700380	70 кДА БТШ		фолдинг/ответ на стресс	<i>Candida parapsilosis</i>	
64	КС	30	4.7	61.00	5	92	CPAR2_700380	70 кДА БТШ		фолдинг/ответ на стресс	<i>Candida parapsilosis</i>	фрагмент
65	КС	40	5	42.10	5	142	CPAR2_402950	компонет β-субъединицы E1 пируватдегидрогеназы			<i>Candida parapsilosis</i>	фрагмент
66	КС	23	5	22.70	5.7	132	hsp70 chaperone	70 кДА БТШ		фолдинг/ответ на стресс	<i>Candida orthopsilosis</i>	