

На правах рукописи

Епремян Хорен Хачатурович

**ПЕРВЫЕ МОДЕЛИ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ БЕЛОК ВИРУСА ГЕПАТИТА В НВХ И АМИЛОИД
AV42: ИЗМЕНЕНИЯ В МОРФОЛОГИИ И ФУНКЦИЯХ МИТОХОНДРИЙ**

Специальность 1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории биоэнергетики Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор, г.н.с. лаборатории биоэнергетики ФИЦ Биотехнологии РАН **Звягильская Рената Александровна**

Кандидат биологических наук, зав. лаб. электронного транспорта НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ **Зиновкин Роман Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Сурин Александр Михайлович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Иванов Александр Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

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

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф.Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень разработанности. Митохондрии принимают участие в большинстве биохимических процессов клетки. Кроме своей основной энергетической функции, они являются ключевым звеном множества сигнальных путей, процессов пролиферации, общего обмена, апоптоза, воспаления и многих других. Высокий уровень интеграции митохондрий в жизненные процессы клетки позволяет сделать предположение об их вовлеченности и в патологические процессы. Действительно, в последние годы накопилось множество данных о ключевой роли митохондриального окислительного стресса в развитии онкологических, нейродегенеративных и ряда других социально-значимых заболеваний. И, хотя триггером патологии могут выступать структурные элементы онкогенных вирусов, амилоидные белки и другие соединения, эти заболевания на определенных этапах патогенеза развиваются по схожим путям: избыточная продукция активных форм кислорода (АФК) вследствие дисфункции митохондрий становится основным источником массивных повреждений редокс-чувствительных компонентов клетки (нуклеиновые кислоты, липиды, белки и др.), т.е. приводит к развитию генерализованного окислительного стресса, что становится основой для следующих этапов патогенеза.

Нейродегенерация и канцерогенез – это сложнейшие комплексные патологии, а многообразие и взаимозависимость процессов, связанных с митохондриями, создает серьезную преграду для верификации первичности митохондриальной патологии в развитии этих заболеваний. Следовательно, для изучения влияния митохондриальной дисфункции требуются упрощенные модели, позволяющие определить морфологические и биоэнергетические изменения в клетках под воздействием предполагаемых стимулов отдельно от факторов (хроническое воспаление, иммунный ответ и т.д.), вызывающих окислительный стресс, как вторичный процесс. В связи с этим в качестве модельного организма использовали дрожжи аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*. Эти дрожжи как нельзя лучше подходят для такого рода исследований. Они нетоксичны, являются облигатными аэробами, растут с высокой скоростью на разнообразных средах простого состава, их геном полностью секвенирован, структура дыхательной цепи этих дрожжей во многом сходна с таковой млекопитающих, что делает их репрезентативной моделью для изучения морфологии и динамики митохондрий.

В качестве объектов исследования были выбраны белок HBx вируса гепатита В, связанный с развитием гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК, рак печени) и его усеченная по С-концу форма HBx120, а также амилоиды A β 42 и A β 40, маркеры болезни Альцгеймера (БА).

Изучение биоэнергетических показателей в упрощенных клеточных моделях, экспрессирующих вышеуказанные белки, позволит проверить выявить конкретные молекулярные механизмы их воздействия на митохондрии. В совокупности с уже накопленными знаниями, это прольет свет на роль митохондрий в развитии ГЦК и БА, что поможет в поиске новых терапевтических подходов, учитывающих митохондриальный компонент патогенеза этих социально-значимых заболеваний, а также подкрепит фундаментальную основу для поиска аналогичных подходов в отношении других онкологических и нейродегенеративных заболеваний.

Цели исследования: изучить патологическое воздействие белка HBx и пептида A β 42 на митохондрии и биоэнергетические параметры клеток в упрощенной дрожжевой

модели; определить возможность предотвращения этих процессов с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов. В соответствии с этой целью были поставлены следующие **задачи исследования**

- 1) Разработка и создание моделей гетерологической экспрессии белка HВх и пептида Аβ42 на основе дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica*.
- 2) Исследование морфологии митохондрий в дрожжах *Y. lipolytica*, экспрессирующих HВх и Аβ42, а также конструкции, несущие целевые белки, слитые с зеленым флуоресцентным белком.
- 3) Определение уровней окислительного стресса и клеточной смерти в дрожжах *Y. lipolytica*, экспрессирующих HВх и Аβ42.
- 4) Комплексное исследование функциональных параметров митохондрий, выделенных из дикого штамма дрожжей *Y. lipolytica* и мутантов, экспрессирующих HВх и Аβ42.
- 5) Исследование влияния митохондриально-направленного антиоксиданта SkQThy и прооксиданта *tert*-бутилгидропероксида на состояние клеток дрожжей *Y. lipolytica*, экспрессирующих HВх и Аβ42.

Научная новизна. Впервые созданы мутанты дрожжей *Y. lipolytica*, способные экспрессировать белок HВх, HВх120 (усеченный по С-концу), пептиды Аβ42 и Аβ40, а также мутанты, экспрессирующие вышеуказанные белки, слитые с зеленым флуоресцентным белком eGFP С- и N-концов. Проведено комплексное исследование функциональных свойств митохондрий, выделенных из мутантов, определившие механизмы, лежащие в основе дисфункции митохондрий, индуцированной экспрессируемыми белками. Прослежены последствия индуцированной дисфункции митохондрий на целых клетках мутантов. На созданных мутантах протестировано действие хорошо изученного в нашей лаборатории митохондриально-направленного антиоксиданта SkQThy и показано, что он в низких концентрациях снижал уровень окислительного стресса и клеточной смерти в исследуемых клетках и предотвращал фрагментацию митохондрий в них.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты свидетельствуют о прямом патологическом действии HВх и Аβ42 на митохондрии клеток, что должно учитываться в дальнейших исследованиях и при поиске перспективных средств терапии социально-значимых заболеваний, связанных с активностью этих пептидов. Митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ могут быть эффективными агентами, снижающими проявления, характерные для экспрессии HВх и Аβ42, связанные с дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях: XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» – 2019, Москва; 3rd International Conference «Homo Sapiens Liberatus» – 2020, Москва; VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН – 2020, Санкт-Петербург.

Публикации. По материалам работы опубликовано 3 статьи в зарубежных и отечественном журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ, и 3 тезиса в материалах конференций.

Личный вклад автора. Автором лично осуществлялся сбор и анализ литературных данных, совместно с научными руководителями сформированы цели и задачи исследования. Автором самостоятельно осуществлялся дизайн праймеров для

ПЦР и секвенирования, созданы генетические конструкции, несущие гены изучаемых белков, осуществлена их трансфекция в дрожжи *Y. lipolytica* и произведены отбор и культивирование созданных мутантов дрожжей с последующим их изучением и интерпретацией полученных данных.

Методология и методы исследования. В данной работе применялся широкий комплекс молекулярно-биологических (ПЦР, секвенирование, молекулярное клонирование, трансформация, трансфекция) и биохимических (спектрофотометрия, флуориметрия, амперометрия) методов, а также методы микробиологии и клеточной биологии (проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия, культивирование микроорганизмов).

Положения, выносимые на защиту

1) Впервые созданы дрожжевые модели гетерологической экспрессии белков НВх, НВх120 и пептидов Аβ42 и Аβ40 на основе дрожжей *Y. lipolytica*, моделирующие их воздействие на митохондрии.

2) Экспрессия белков НВх и Аβ42 в клетках дрожжей *Y. lipolytica* вызывает фрагментацию митохондрий, а экспрессируемые белки образуют агрегаты.

3) Экспрессия НВх и Аβ42 повышает уровень общего окислительного стресса и клеточной гибели.

4) Экспрессия НВх и Аβ42 вызывает дисфункцию митохондрий дрожжей, которые имеют пониженные величины дыхательного контроля (степень сопряженности дыхания и фосфорилирования) и скорость синтеза АТФ, повышенный уровень образования АФК и/или сниженную устойчивость к воздействию прооксидантов.

5) Митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях частично обращал фрагментацию митохондрий, снижал окислительный стресс, увеличивая выживаемость клеток дрожжей.

Структура и объем работы. Работа изложена на 113 страницах печатного текста, содержит 29 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы (307 источников).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрено современное состояние исследований в областях, касающихся связи патогенеза ГЦК и БА с митохондриальным окислительным стрессом, морфологией, динамикой и биоэнергетическими параметрами митохондрий.

Материалы и методы

Создание модельных организмов. Дизайн праймеров проводили на основе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих НВх, НВх120, Аβ42, Аβ40 и eGFP (green fluorescent protein) таким образом, чтобы последовательность продукта ПЦР несла в себе полную исходную нуклеотидную последовательность целевых генов.

Для создания целевых генетических конструкций выбрана плазмида pZ-express++ с гибридным, зависимым от фазы роста промотором hp4d и транспозонной последовательностью ZETA, имеющей множественную гомологию в геноме *Yarrowia lipolytica*, что при рекомбинации обеспечивает высокую копияность плазмиды и, как следствие, высокий уровень экспрессии целевого белка. Также плазмида имеет ген

резистентности к ампициллину и фактор прототрофности по урацилу URA3 из генома *Y. lipolytica*.

Вставку ПЦР-продукта в вектор pZ-express++ проводили по методу Golden Gate Cloning с использованием рестриктазы II типа BbsI и T4 лигазы. Была произведена встройка в вектор последовательностей NBx, NBx-eGFP, NBx120, NBx120-eGFP, A β 42, eGFP-A β 42, A β 40, eGFP-A β 40. Данные генетические конструкции на основе плазмиды pZ-express++ и вышеуказанных вставок созданы впервые. Было осуществлено секвенирование плазмид, которое не выявило мутаций в целевых вставках.

Впервые была осуществлена трансфекция генетических конструкций pZ-NBx, pZ-NBx-eGFP, pZ-NBx120, pZ-NBx120-eGFP, pZ-A β 42, pZ-eGFP-A β 42, pZ-A β 40 и pZ-eGFP-A β 40 в дрожжи *Y. lipolytica* методом электропорации при 1500V. Компетентные клетки были получены путем последовательной инкубации с 0,1M TE-LiAc, 2,5M Dithiothreitol (DTT) и промывкой с mQ и 1M Sorbitol. Трансфицированные дрожжи высевали на чашки Петри с селективной средой, не содержащей урацил, и антибиотиками хлорамфениколом и/или G418, к которым *Y. lipolytica* имеет резистентность.

Условия выращивания бактериальных клеток. Нарращивание биомассы бактерий *E. coli*, производилось посевом ночной культуры в среде LB с ампициллином при 37 °C. После трансформации клетки высевали на чашки Петри со средой LB и ампициллином в качестве фактора селективности, после чего инкубировали в течение 16 часов при 37 °C.

Условия выращивания дрожжевых клеток. Клетки *Y. lipolytica* выращивали, как описано ранее (Trendeelva et al., 2013) и собирали в ранней экспоненциальной фазе роста. Трансфицированные дрожжи *Y. lipolytica* высевали на чашки Петри с селективной средой, не содержащей урацил, и антибиотиками хлорамфениколом и/или G418, к которым *Y. lipolytica* имеет резистентность, и инкубировали 60-72 часа при 28 °C.

Вестерн-блоттинг. Дрожжевые клетки, собранные в фазе экспоненциального роста (OD = 0,6), инкубировали в течение 30 минут при 29 °C с зимолизой (10 ед./мл), осаждали (5600 g, в течение 5 мин), ресуспендировали в буфере для лизиса TNE (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, pH 7,5) с добавлением 0,1 M Na₃VO₄ (ингибитор протеаз), замораживали в жидком азоте и разрушали с 0,4 мм стеклянными бусами. Неразрушенные клетки и дебрис осаждали (500 g, в течение 5 мин). Супернатант (200 мкл), содержащий выделенные белки, разбавляли 200 мкл 2x SDS-гель-загрузочного буфера (50 mM Tris-HCl, 10 mM дитиотреитола, 2% SDS, 10% глицерина, 0,1% Coomassie G-250, pH 6,8) и кипятили в течение 5 мин. Вестерн-блоттинг проводили следующим образом: белки анализировали в 15% SDS-полиакриламидном геле с помощью PageRuler™ Prestained Protein Ladder (каждая лунка содержала 5 мкг общего белка); белки переносили на мембрану PVDF. Детекцию eGFP и NBx-eGFP проводили с первичными кроличьими поликлональными антителами к GFP (Anti-GFP antibody, Evrogen, Россия) и вторичными кроличьими антителами (Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody, Sigma-Aldrich, США). Иммуноблот был проявлен с использованием субстрата SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, США) в системе Chemi-Doc Touch Imaging (BioRad, США).

Визуализация митохондрий в клетках дрожжей *Y. lipolytica*. Морфология митохондрий созданных мутантов дрожжей *Y. lipolytica* и локализация агрегатов гетерологических белков при максимальном уровне их экспрессии была изучена методами микроскопии структурированного освещения (SIM) и широкопольной флуоресцентной микроскопии. Для этого использовали полученные нами мутанты, несущие генетические конструкции из целевых белков, слитых с eGFP.

Визуализация митохондрий в клетках *Y. lipolytica* с помощью микроскопии структурированного освещения (SIM). Для окрашивания митохондрий клетки *Y. lipolytica* нагружали 500 нМ MitoTracker Red CmxRos в течение 30 мин в 50 мМ PBS, pH 5,5. Окрашенные клетки фиксировали 2,5 % PFA в течение 10 мин, затем промывали 50 мМ PBS, pH 5,5, и помещали в среду, содержащую 24 % глицерина, 9,6 % Mowiol и 2,5 % DABCO в 0,1 М Tris, pH 8,5. Визуализация проводилась с помощью инвертированного моторизованного микроскопа Eclipse N-SIM с системой автофокусировки PerfectFocus (Nikon, Токио, Япония). Система микроскопии была оснащена 100-кратным объективом Apo TIRF Oil (NA1.49), диодным лазером с длиной волны 488 и 561 нм и охлаждаемой EM-CCD-камерой iXonDU-897E (Andor, Белфаст, Северная Ирландия, Великобритания) под контролем программного обеспечения NIS-Elements v. 5.11 (Nikon, Токио, Япония). Получение изображения, реконструкция SIM-изображения и выравнивание данных выполнялись с использованием NIS-Elements (Nikon, Токио, Япония). Затем была выполнена 3D-реконструкция наборов данных SIM x, y и z (z-стеки) с использованием программного обеспечения ICY v.2.5 (Группа анализа биологических изображений, Институт Пастера, Париж, Франция).

Визуализация митохондрий в клетках *Y. lipolytica* с помощью широкопольной флуоресцентной микроскопии. Для окрашивания митохондрий клетки *Y. lipolytica* нагружали 200 нМ MitoTracker Red CmxRos в течение 30 мин в 50 мМ PBS, pH 5,5. Окрашенные клетки высевали на 96-луночный планшет для микроскопии. Серийные оптические срезы были получены с использованием инвертированного моторизованного микроскопа Eclipse Ti2 (Nikon, Токио, Япония) с системой автофокусировки Perfect Focus, оснащенного 100-кратным объективом CFI Plan Apo Vc Oil (NA 1.4), диодным источником света 488 и 561 нм и CMOS-камерой с воздушным охлаждением DS-Qi2 (Nikon, Токио, Япония) под управлением программного обеспечения NIS-Elements (Nikon, Токио, Япония). Деконволюцию выполняли по алгоритму Ричардсона-Люси, включенному в пакет NIS-Elements. 3D-реконструкция была выполнена с использованием программного обеспечения Icy версии 2.0.2.0 (de Chaumont et al., 2012).

Методом проточной цитометрии с двойным окрашиванием исследовали уровень окислительного стресса в контрольных клетках и мутантах, а также действие прооксиданта *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*-BHP) и митохондриально-направленного антиоксиданта SkQThy. Одновременно анализировали выживаемость клеток.

Клетки выращивали, как описано ранее. Где указано, клетки инкубировали в течение 1 часа с 250 нМ SkQThy, промывали, добавляли 750 мкМ *t*-BHP, инкубировали в течение 2х часов, вновь осаждали, промывали и нагружали красителями 5мкг/мл Dihydroethidium (DHE), для детектирования супероксид-анион радикала, и 30 нМ Sytox Green (маркер на клеточную смерть, проникает только в клетки с нарушенной цитоплазматической мембраной). Измерения проводились на цитометре BD FACSCalibur или Beckman Cytoflex.

Выделение митохондрий дрожжей *Y. lipolytica*. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования по методике, разработанной в нашей лаборатории (Trendeleva et al., 2013). О качестве выделенных препаратов митохондрий судили по величинам дыхательного контроля, характеризующим степень сопряженности дыхания и фосфорилирования, как рекомендовано (Chance and Williams, 1955).

Анализ функциональных свойств митохондрий, выделенных из мутантов дрожжей *Y. lipolytica*.

Скорость поглощения кислорода определяли полярографическим методом в ячейке (рабочий объем 1 мл) с закрытым кислородным электродом типа Кларка. Основная среда инкубации содержала 0,6 М маннит, 2 мМ трис-фосфат, pH 7,2, 1 мМ ЭДТА.

Синтез АТФ митохондриями регистрировали, как описано (Zharova and Vinogradov, 2006). Метод основан на небольшом сдвиге pH при превращении ADP в АТФ, поэтому основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-пируватом + 5 мМ трис-малатом, 25 мкМ феноловым красным (pH-зависимым красителем), 6 мкМ Ар5А (ингибитором аденилаткиназы) и митохондриями (0.2 мг белка/мл). Среда инкубации и добавляемые растворы были тщательно доведены до значения pH 7,1. Синтез АТФ, инициированный добавлением 500 мкМ ADP, определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Beckman Coulter DU-650 (США), используя пару длин волн 557 и 618 нм.

Образование пероксида водорода митохондриями определяли флуориметрически путем измерения окисления Amplex Red до резорурфина, сопряженного с ферментативным восстановлением пероксида водорода пероксидазой хрена. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-сукцинатом, 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 М.Е./мл), 6 мМ аминотриазолом (ингибитором каталазы) и митохондриями (0,2 мг белка/мл). Флуоресценцию резорурфина, продукта окисления Amplex Red, измеряли при комнатной температуре с помощью спектрофлуорофотометра Shimadzu RF 5301 PC (Япония) при 563/587 нм длины волн возбуждения и испускания, соответственно. Сигналы калибровали с помощью 0–5 мкМ H₂O₂ (определено по поглощению при 240 нм).

Содержание белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976).

Статистический анализ: если не указано иное, все эксперименты с митохондриями дрожжей проводились не менее трех раз. Для анализа митохондриальной морфологии в каждом эксперименте исследовали не менее пятидесяти клеток. Статистический анализ проводили с использованием одностороннего теста ANOVA с апостериорным тестом Тьюки HSD. Данные были представлены как среднее ± S.E. не менее чем в трех независимых повторах.

Основные результаты исследования и их обсуждение

Создание и первичная характеристика дрожжевых моделей, экспрессирующих НВх и Аβ42.

Решена одна из основных научных задач исследования - создана простая и адекватная дрожжевая модель гетерологической экспрессии НВх и Аβ42 на основе мутантов дрожжей *Y. lipolytica*. Эти дрожжи как нельзя лучше подходят для этой задачи: сохраняя все преимущества дрожжей, они обладают рядом уникальных преимуществ (Рис. 1). Использованный в работе штамм Po1f сохраняет все преимущества дрожжей *Y. lipolytica*, но, в отличие от дикого штамма, ауксотрофен по урацилу и лейцину и имеет делецию гена *Xpr2*, кодирующего внеклеточную протеазу, что позволяет использовать селективные среды для выращивания мутантов.

Генетические конструкции для трансформации дрожжей были созданы на базе интегративной плазмиды pZexpress++ длиной 5000 п.н., содержащей ген устойчивости к ампициллину для выращивания плазмиды в бактериях, участки рекомбинации Zeta для встраивания целевых генов в геном *Y. lipolytica*. Гены целевых белков были помещены под гибридный квазиконститутивный промотор hp4d. Фактором прототрофности был

выбран ген URA3, позволяющий дрожжам *Y. lipolytica* Po1f расти на средах, не содержащих урацил. Целевые гены были клонированы в вектор методом Golden Gate cloning, подразумевающим объединение в одну стадию реакции рестрикции и лигирования продуктов рестрикции, поскольку липкие концы, оставляемые рестриктазой II типа BpiI были спроектированы так, чтобы при лигировании они отжигались в строго определенном месте (Рис. 2).

- Общие преимущества дрожжей**

 - Достаточно простые эукариотические одноклеточные организмы
 - GRAS статус (обычно считаются безопасными)
 - Разработанный генетический инструментарий, включая различные модификации геномного редактирования

Уникальные преимущества *Yarrowia lipolytica*

 - Полностью компетентная энергозапасующая дыхательная цепь с участием комплекса I
 - Способность утилизировать с высокой эффективностью широкий спектр субстратов
 - Уникальная способность переносить экстремальные условия (кислотность, щелочность, гиперсоленость, загрязнение тяжелыми металлами и др.)
 - Уникальные биосинтетическая и секретирующая способности
 - Кроме того, Po1f штамм устойчив к хлорамфениколу

Рис. 1. Преимущества дрожжей *Y. lipolytica* как модельного организма

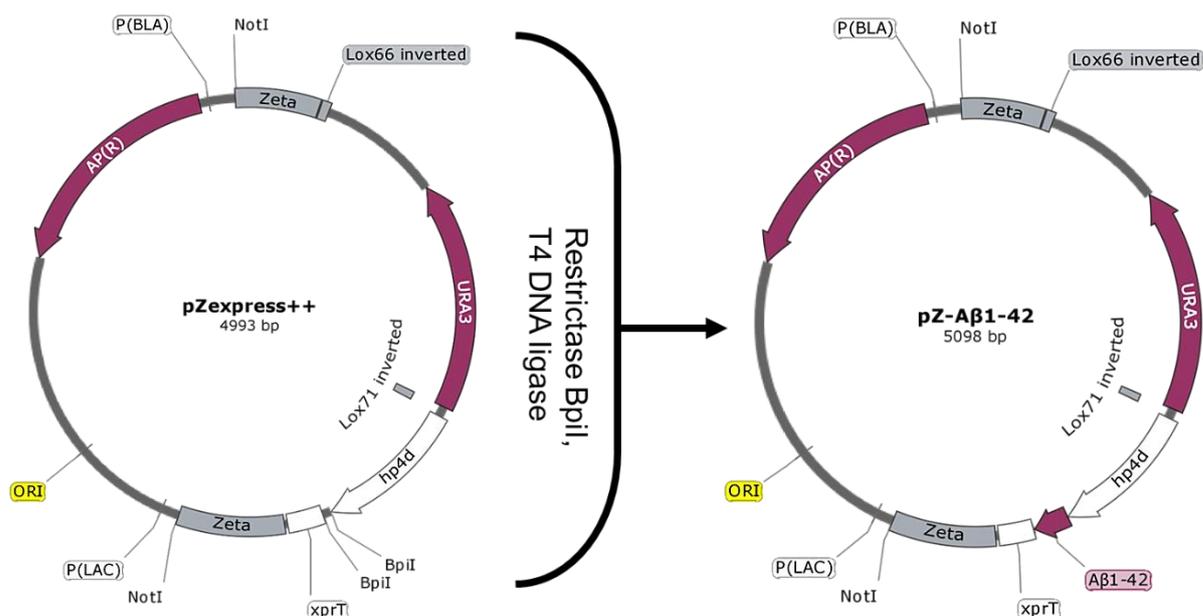


Рис. 2. Схема процесса рестрикции-лигирования продукта ПЦР в вектор pZexpress++

Впервые были созданы генетически модифицированные дрожжи *Y. lipolytica*, способные экспрессировать: Аβ42, eGFP-Аβ42, Аβ40, eGFP-Аβ40, пептиды, содержащие 42- и 40- С-концевых аминокислотных остатка бета-амилоида соответственно, а также их fusion-конструкции с зеленым флуоресцентным белком eGFP, слитых с N-концов; HBx, HBx-eGFP, HBx120, HBx120-eGFP, состоящие из последовательности белка вируса гепатита В и его усеченной с С-конца по 120 аминокислоте форме, которая, согласно литературным данным, не имеет прямого митохондриально-направленного действия, а также их fusion-конструкции с зеленым флуоресцентным белком eGFP, слитых с С-концов.

Была исследована активность hr4d-промотора в различных условиях и ее влияние на экспрессию целевых белков. Уровень экспрессии определяли, используя штамм Pol1f pZ-eGFP, измеряя интенсивность флуоресценции eGFP методом проточной цитометрии.

Для сравнения скоростей роста разных штаммов был создан контрольный штамм *Y. lipolytica* Pol1f pZ-0, не имеющий вставки целевого белка, но несущий интегративную плазмиду pZexpress++, содержащую в качестве фактора прототрофности ген URA3.

Методом вестерн-блоттинга доказана нормальная экспрессия белка HBx в исследуемых мутантах. В связи с недоступностью антитела к HBx, использовали антитела к eGFP, белку слитому с HBx. Показано, что в суммарных белках, выделенных из мутантов pZ-eGFP и pZ-HBx-eGFP, исследуемые белки соответствуют своей ожидаемой молекулярной массе (Рис. 3).

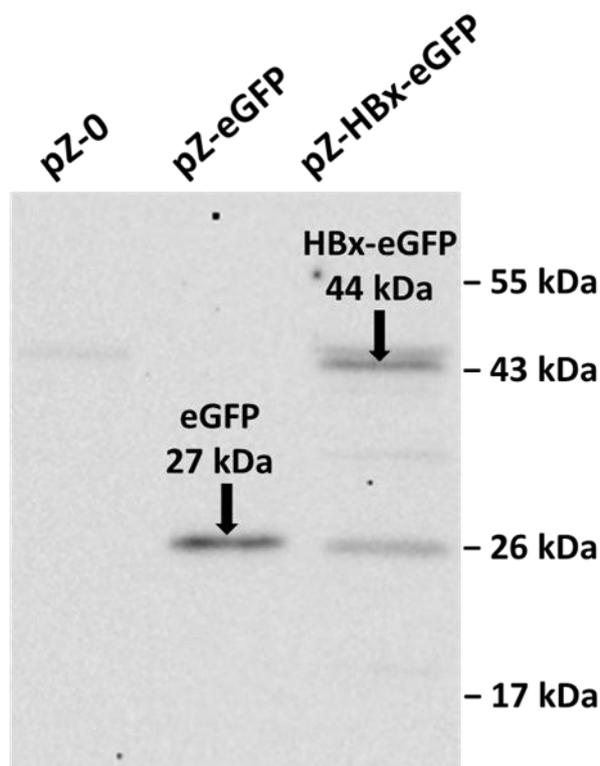


Рис. 3. Вестерн-блот анализ штаммов *Y. lipolytica* pZ-0, pZ-eGFP и pZ-HBx-eGFP. Белки eGFP и HBx-eGFP указаны стрелками. Справа показаны молекулярные массы белков-маркеров

Морфология митохондрий дрожжевых клеток экспрессирующих НВх.

Для визуализации митохондрий в клетках использовали микроскопию структурированного освещения и широкопольную флуоресцентную микроскопию с улучшенным разрешением.

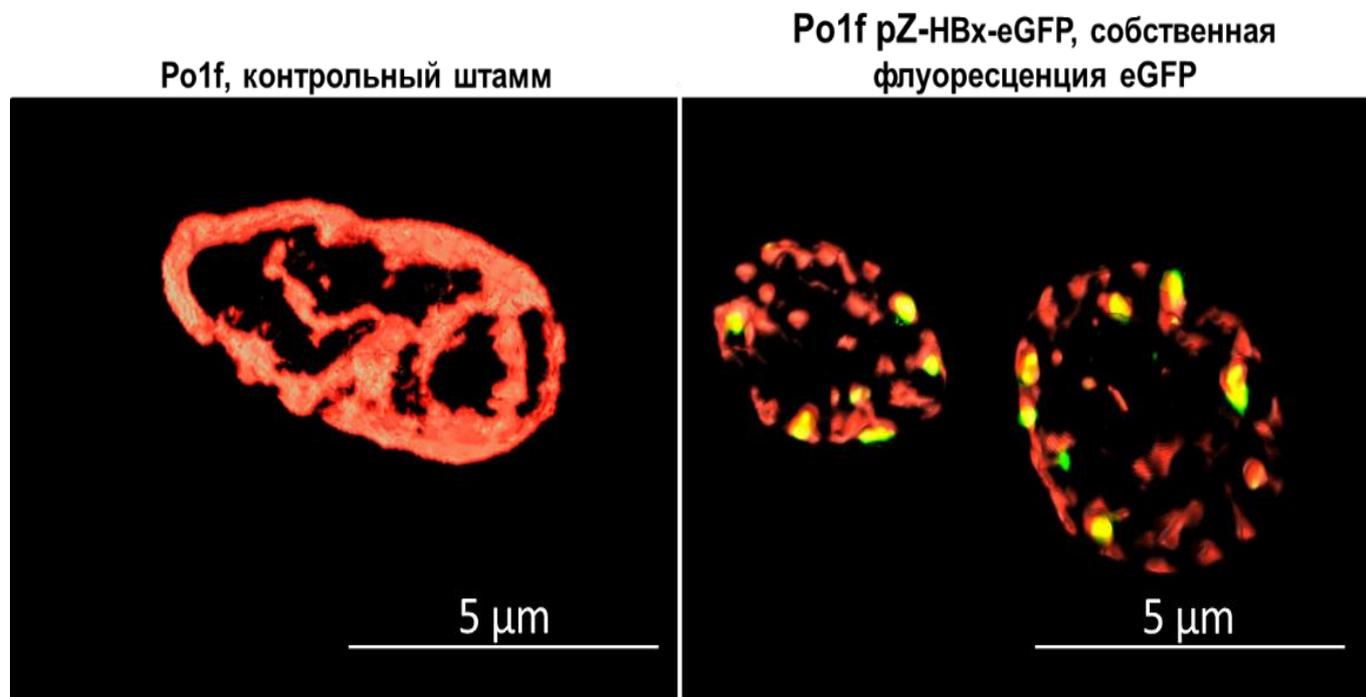


Рис. 4. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих НВх и локализация агрегатов НВх. Микроскопия структурированного освещения.

Флуоресценция eGFP показана зеленым цветом, а митохондрии визуализированы с помощью 500 нМ MitoTracker Red CmxRos, показаны красным

Клетки контрольного штамма (pZ-0) содержали многочисленные митохондрии, образующие митохондриальный ретикулум (Рис. 4, 5).

В мутантах, экспрессирующих eGFP и НВх120-eGFP морфология митохондрий не была изменена, а зеленая флуоресценция распространена в цитозоле диффузно, агрегаты отсутствовали (Рис. 4). Напротив, в мутантах, экспрессирующих НВх-eGFP, агрегаты гетерологических белков имели большие размеры и присутствовали на периферии клеток, где сконцентрированы митохондрии; митохондриальный ретикулум был нарушен, а митохондрии фрагментированы (Рис. 4, 5), что указывает на влияние НВх на структуру митохондрий. В клетках, экспрессирующих НВх-eGFP, инкубация с низкими концентрациями (250 нМ) наиболее эффективного митохондриально-направленного липофильного антиоксиданта SkQThy из семейства SkQ (Goleva et al., 2019) практически полностью восстанавливала митохондриальный ретикулум (Рис. 5).

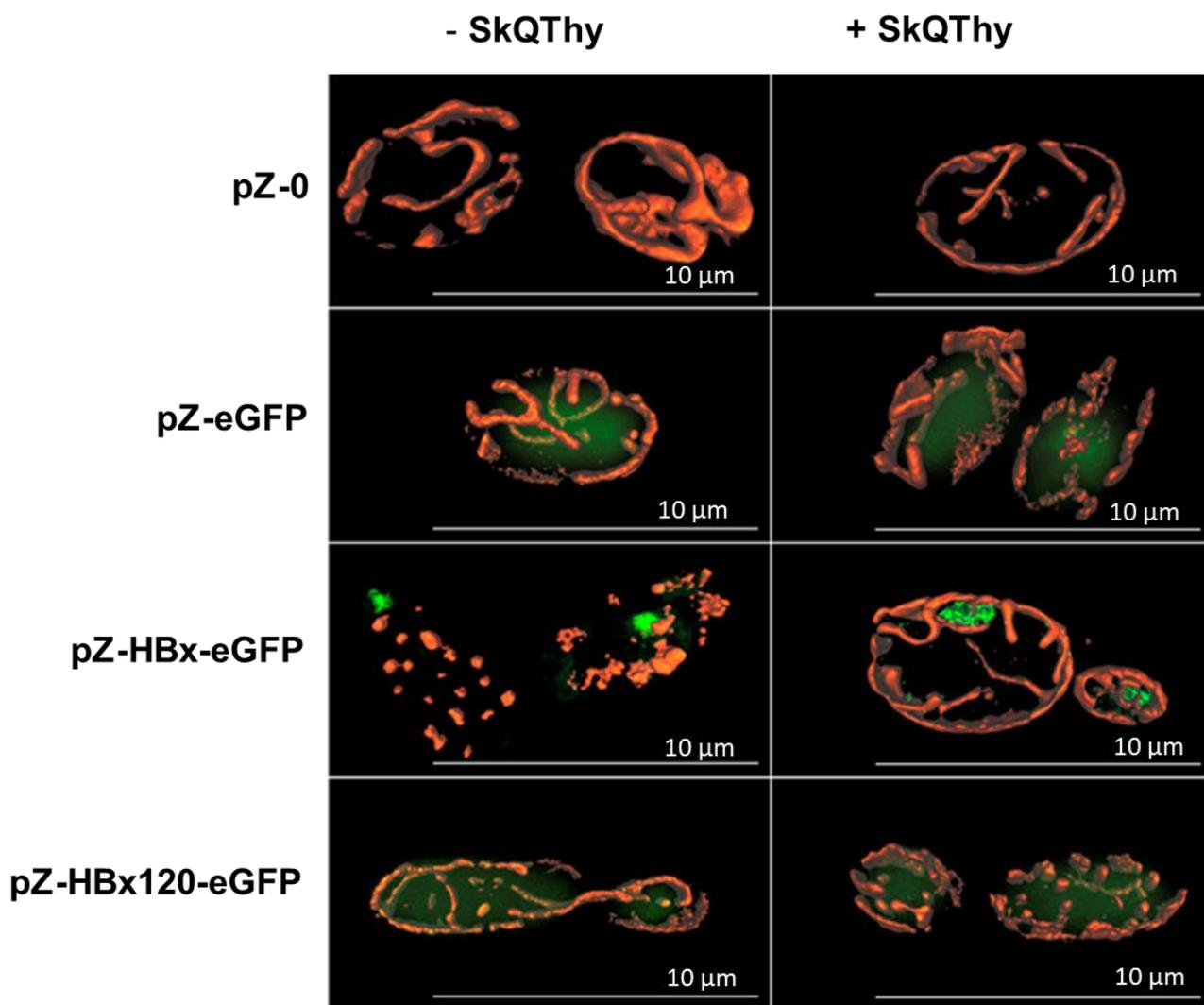


Рис. 5. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих HBx и HBx120. Эффект SkQThy. Широкопольная флуоресцентная микроскопия. Флуоресценция eGFP показана зеленым цветом, а митохондрии визуализированы с помощью 500 нМ MitoTracker Red CmxRos, показаны красным

Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжевых клеток экспрессирующих HBx.

При обработке результатов, полученных методом проточной цитометрии с двойным окрашиванием (DHE и Sytox Green для детектирования соответственно супероксид-анион радикала и выживаемости клеток), проанализированные клетки разделялись на три популяции по уровню флуоресценции красителей (Рис. 6 А). Популяция клеток с низким уровнем флуоресценции обоих красителей соответствует нормальным живым клеткам, не подверженным окислительному стрессу. Популяция клеток с высоким уровнем флуоресценции DHE и низким уровнем флуоресценции Sytox Green соответствует живым клеткам, испытывающим окислительный стресс. Популяция с высоким уровнем флуоресценции обоих красителей соответствует мертвым клеткам. При анализе преобладающего окислительного-восстановительного статуса и жизнеспособности клеток значимыми являлись размеры популяций, то есть отношение числа клеток определенной популяции к общему числу проанализированных клеток. На

рисунке 6 Б те же данные представлены в виде гистограмм результатов, полученных из трех независимых экспериментов.

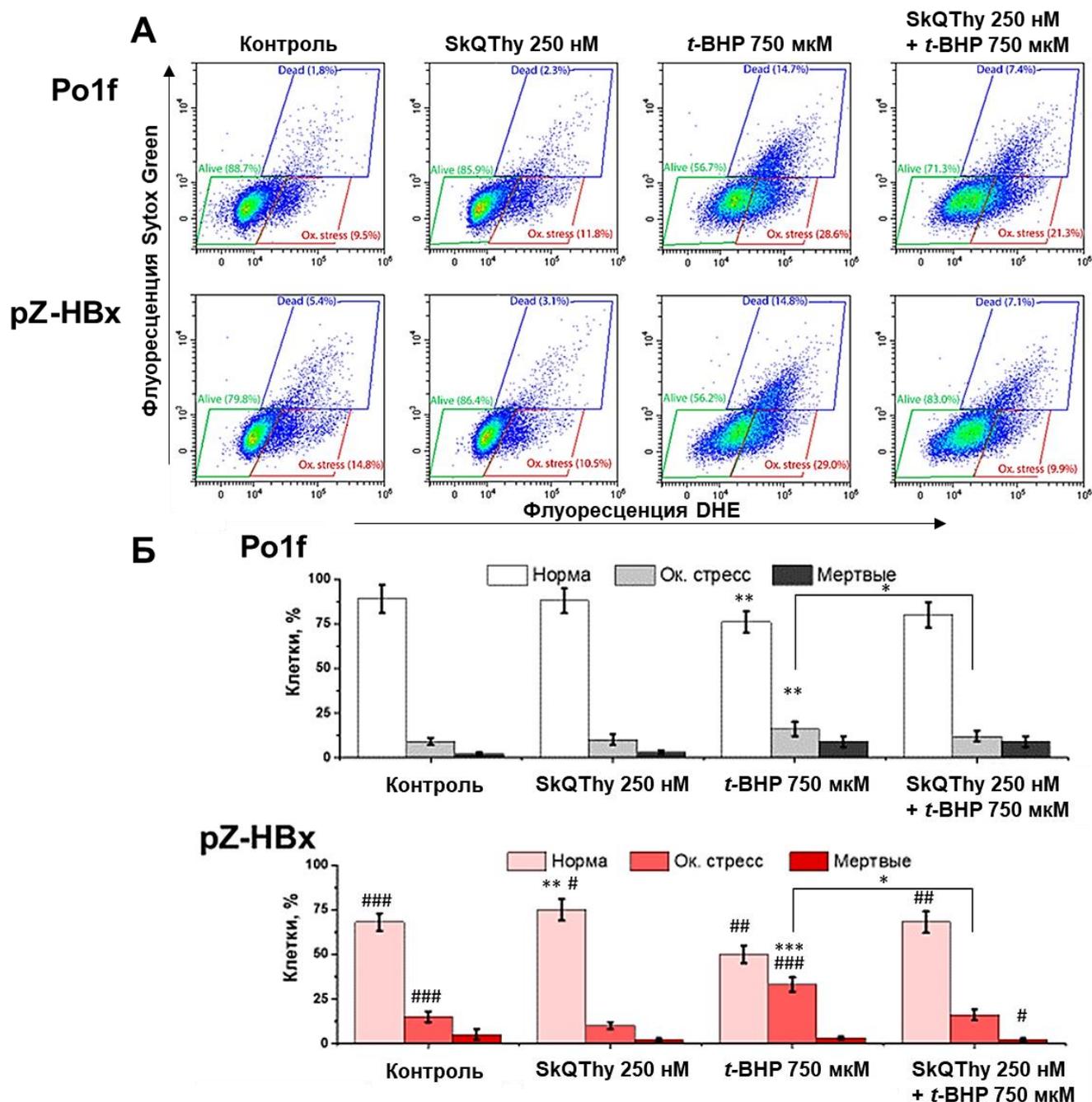


Рис. 6. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-NBx. Влияние SkQThy и t-BHP. (А) Измерения проточной цитометрии, представлены результаты одного типичного эксперимента. (Б) Гистограммы результатов, полученных из трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. Обозначения: * отмечены различия между результатами, полученными для штамма Po1f в разных условиях; *** $p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$; # отмечает различия между образцами Po1f и pZ-NBx; ### $p < 0,001$, ## $0,001 < p < 0,01$, # $0,01 < p < 0,05$

Установлено, что клетки, экспрессирующие NBx, испытывали несколько больший окислительный стресс, чем контрольный штамм (Рис. 6 Б). Однако под действием прооксиданта 750 мкМ t-BHP в течение 2 ч популяции клеток с окислительным

стрессом в образце с экспрессией НВх многократно возростала, в отличие от контрольного штамма, что свидетельствует о меньшей устойчивости клеток, экспрессирующих НВх, к окислительному стрессу.

В целях предотвращения окислительного стресса в клетках дрожжей, экспрессирующих НВх, использовали SkQThy. Предварительная инкубация с 250 нМ SkQThy в течение 1 ч уменьшала популяцию клеток, подверженных окислительному стрессу в дрожжах, экспрессирующих НВх и, более того, предотвращала прооксидантное действие *t*-ВНР. Поскольку SkQThy является митохондриальным направленным антиоксидантом, эти данные свидетельствуют о том, что исходно окислительный стресс индуцировался, по крайней мере частично, митохондриальными активными формами кислорода.

Функциональные свойства митохондрий, выделенных из дрожжевых клеток, экспрессирующих НВх.

Поскольку наблюдалось несоответствие между небольшим усилением окислительного стресса и явной фрагментацией митохондрий, наблюдаемой в клетках, экспрессирующих НВх, нашим следующим шагом было изучение биоэнергетики этих клеток на митохондриальном уровне. Ранее было показано, что фрагментация митохондрий индуцируется не только окислительным стрессом, но и в присутствии разобщителя [Rogov et al., 2018]. Митохондрии, выделенные из контрольного штамма Po1f, полностью соответствовали критериям физиологической целостности, были прочно сопряжены и не отличались от митохондриальных препаратов, обычно получаемых для этого вида дрожжей (Рис. 7). Напротив, митохондрии из клеток рZ-НВх были частично разобщены, с величинами дыхательного контроля в два раза ниже по сравнению с митохондриями из контрольных клеток (Рис. 6).

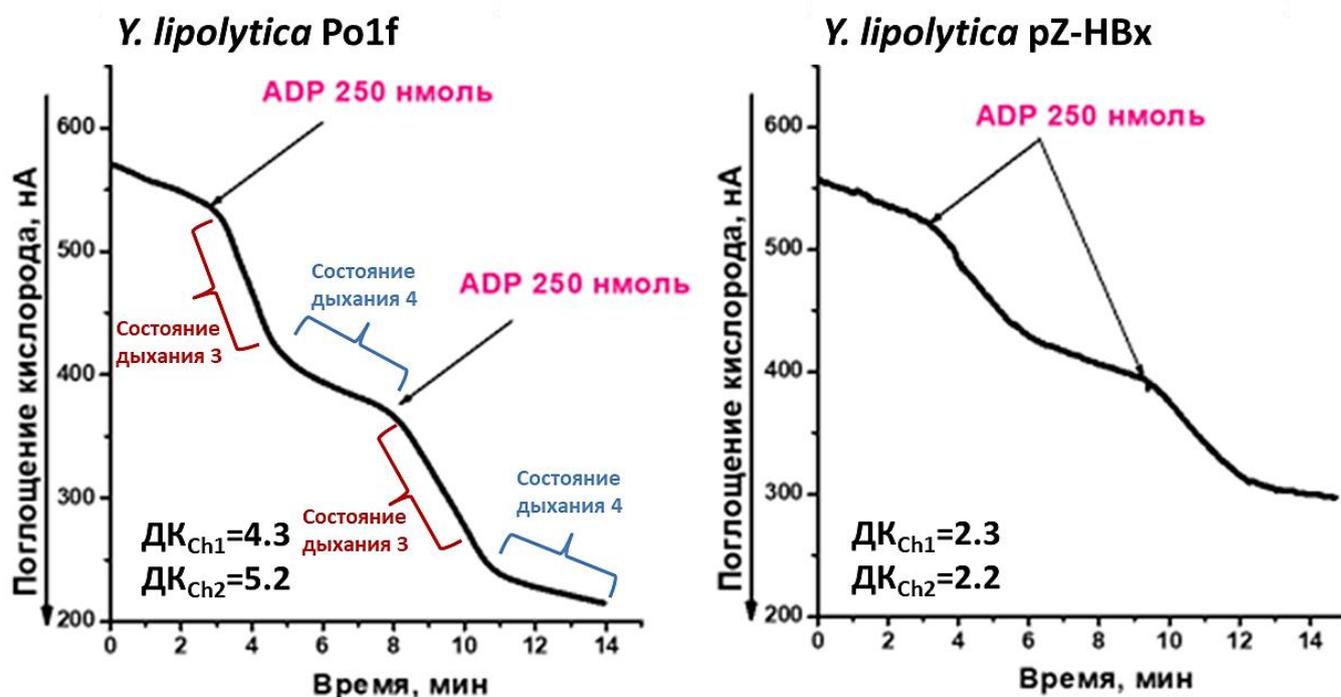


Рис. 7. Амперометрические кривые поглощения кислорода изолированными митохондриями дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-НВх. Величины дыхательного контроля. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-пируватом + 5 мМ трис-малатом и митохондриями (0,5 мг белка/мл)

Сравнение скоростей дыхания в состояниях 4, 3 (в присутствии ADP) и разобщенном (в присутствии классического разобщителя КЦХФ) митохондрий, выделенных из контрольных клеток и клеток, экспрессирующих НВх (Рис. 8), показал, что митохондрии двух штаммов имели почти одинаковую скорость дыхания в состоянии 4, тогда как скорости дыхания в состояниях 3 и особенно в состоянии разобщения были значительно ниже в препаратах митохондрий из клеток рZ-НВх.

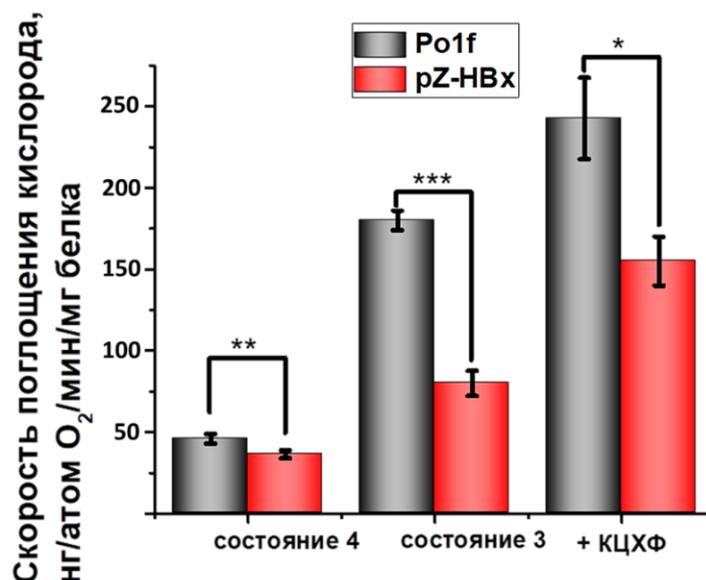


Рис. 8. Скорости дыхания митохондрий *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-НВх в состояниях 4, 3 и разобщенном. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-пируватом + 5 мМ Трис-малатом, и митохондриями (0,5 мг белка/мл). В состоянии 3 среда инкубации дополнительно содержала 1 мМ ADP, а в разобщенном состоянии - 2 мкМ разобщитель КЦХФ. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. ***: $p < 0.001$, **: $0.001 < p < 0.01$, *: $0.01 < p < 0.05$

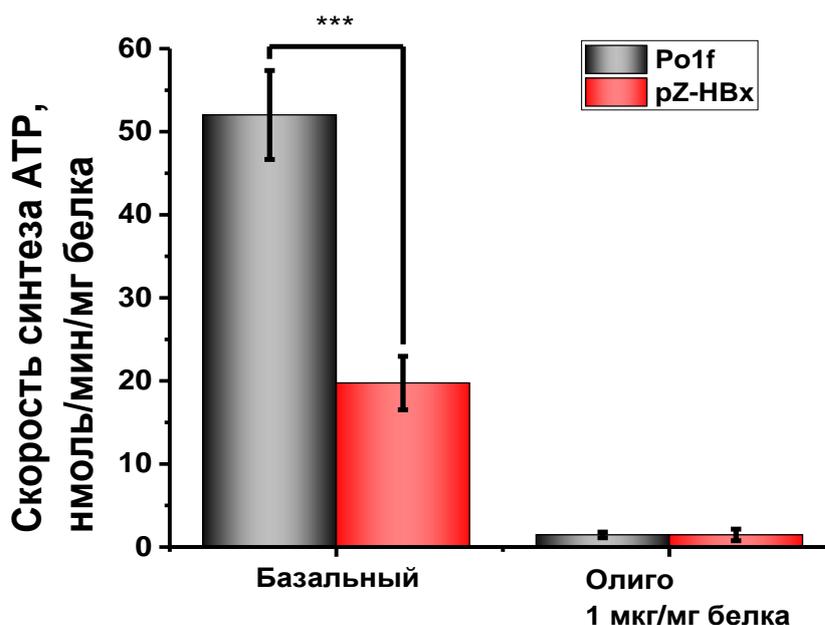


Рис. 9. Синтез АТФ митохондриями *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-НВх. Основная среда инкубации была дополнена 25 мкМ феноловым красным, 6 мкМ Ар5А (ингибитором

аденилаткиназы) и митохондриями (0.2 мг белка/мл). Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. ***: $p < 0,001$

Эти данные хорошо согласуются с более низкими значениями дыхательного контроля в митохондриях клеток, экспрессирующих НВх, по сравнению с контрольным вариантом.

Скорость синтеза АТФ в митохондриях, выделенных из мутанта рZ-НВх была ожидаемо ниже, чем в контрольном штамме (Рис. 9).

Наконец, была измерена скорость продукции пероксида водорода изолированными митохондриями дрожжей контрольного варианта и экспрессирующего НВх. Наблюдалось лишь незначительное увеличение продукции перекиси водорода митохондриями клеток, экспрессирующих НВх, по сравнению с контрольными клетками (Рис. 10). Эти, казалось бы, неожиданные результаты можно легко объяснить частичным разобщением этих митохондрий, что следует из результатов, представленных на рисунках 6, 7 и 9. Известно, что снижение мембранного потенциала всего на 10% снижает продукцию АФК на 90% (Korshunov et al., 1997). *t*-ВНР, известный модельный прооксидант, образующий АФК в результате реакции перекисного окисления липидов, усиливал продукцию перекиси водорода митохондриями, при этом митохондрии из клеток, экспрессирующих НВх, были более восприимчивы к действию прооксиданта, чем митохондрии контрольного штамма. Это также хорошо согласуется с данными проточной цитометрии (Рис. 6), где клетки, экспрессирующие НВх, также были менее устойчивы к действию *t*-ВНР.

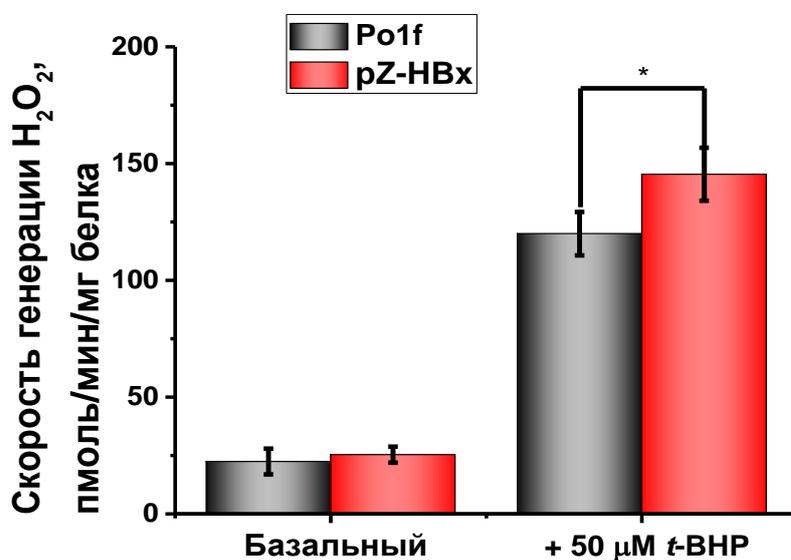


Рис. 10. Образование пероксида водорода митохондриями дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-НВх. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-сукцинатом, 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 М.Е./мл), 6 мМ аминотриазолом (ингибитором каталазы) и митохондриями (0,2 мг белка/мл). Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. **: $0.001 < p < 0.01$

Таким образом, комплексное изучение функциональных свойств митохондрий, выделенных из дрожжей, экспрессирующих НВх, показало, что НВх индуцирует митохондриальную дисфункцию, прежде всего меньшую степень сопряжения дыхания с

фосфорилированием, снижение скорости дыхания и продукции АТФ, а также меньшую устойчивость к индуцированному окислительному стрессу.

Морфология митохондрий дрожжевых клеток экспрессирующих Аβ42.

Была исследована морфология митохондрий клеток, экспрессирующих Аβ42. Клетки контрольного штамма (pZ-0) содержали многочисленные митохондрии, образующие митохондриальный ретикулум (Рис. 11, 12).

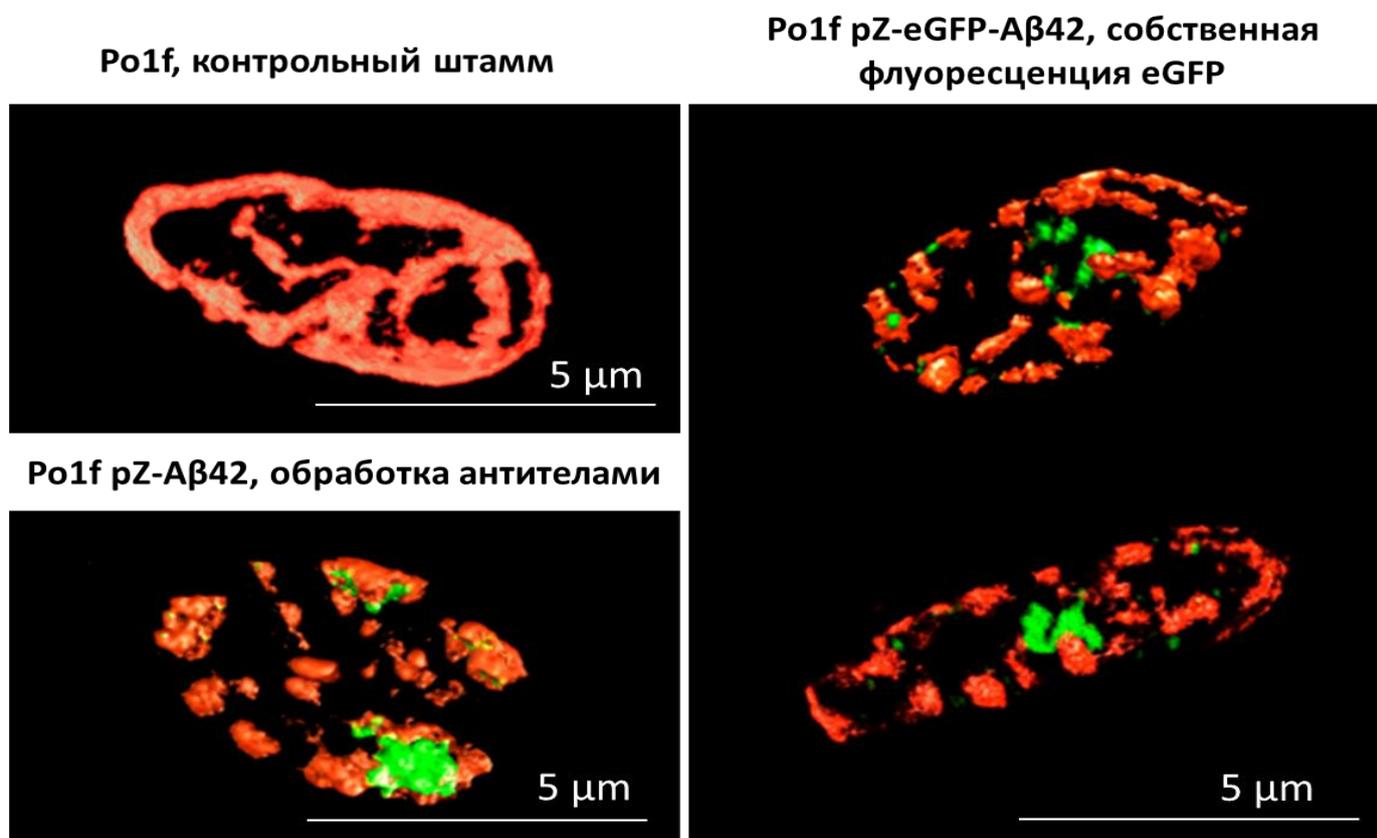


Рис. 11. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих Аβ42 и локализация агрегатов Аβ42. Микроскопия структурированного освещения.

Напротив, митохондриальный ретикулум был нарушен в клетках, экспрессирующих Аβ42 и eGFP-Аβ42, а митохондрии были фрагментированы (Рис. 11). Эти клетки также были отмечены наличием одного или нескольких крупных агрегатов и нескольких мелких агрегатов. Аналогичные результаты были получены при обработке клеток, экспрессирующих Аβ42 антителами к Аβ42 (Рис. 11), что в совокупности указывает на сильное негативное влияние Аβ42 на структуру митохондрий.

Экспрессия eGFP не изменяла морфологию митохондрий и eGFP был диффузно распределен в цитозоле (Рис. 12). Мутант, экспрессирующий eGFP-Аβ42 характеризовался фрагментированными митохондриями и агрегацией Аβ42 (Рис. 12).

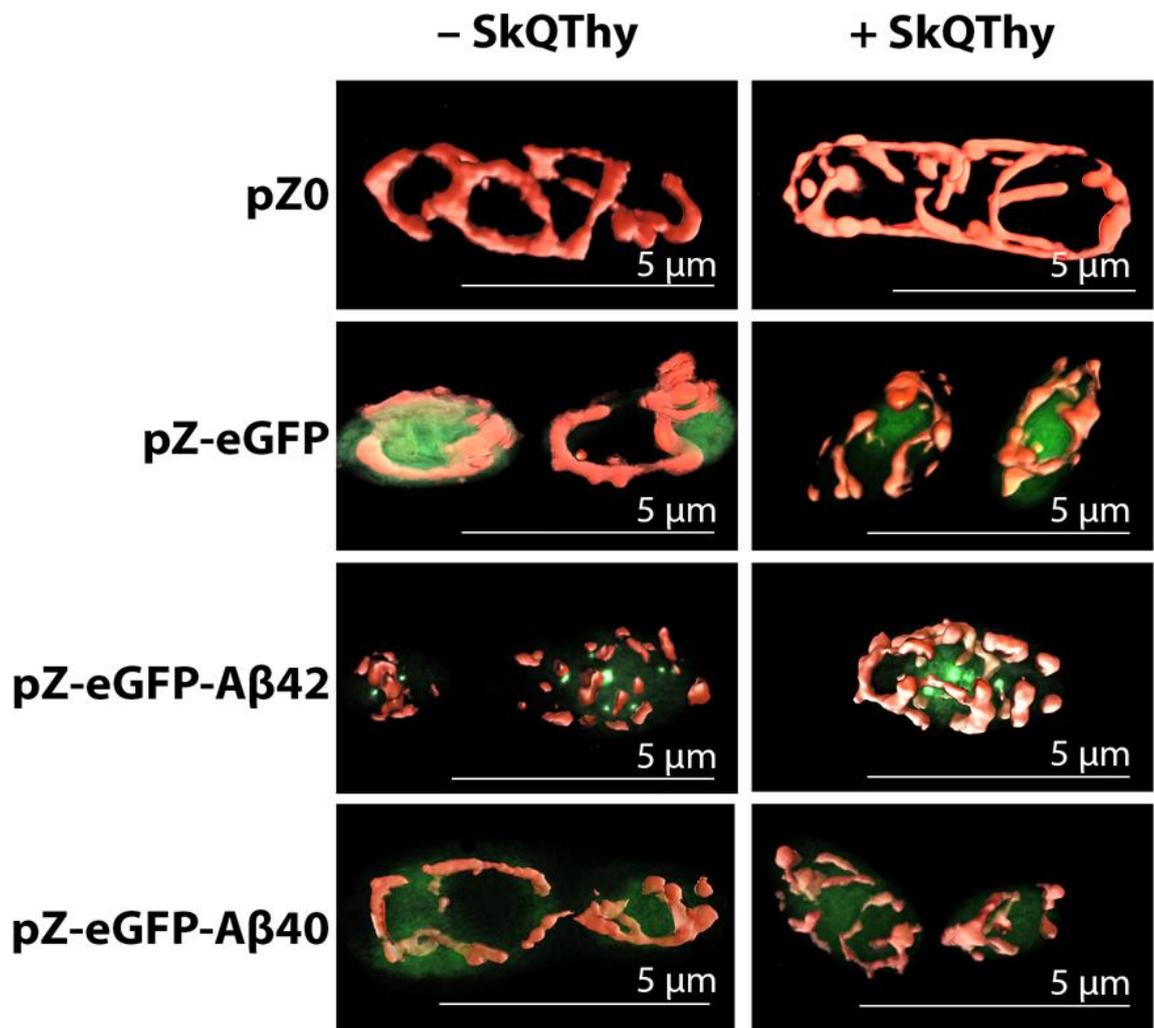


Рис. 12. Морфология митохондрий мутантов *Y. lipolytica* экспрессирующих Аβ42 и Аβ40. Эффект SkQThy. Широкопольная флуоресцентная микроскопия. Флуоресценция eGFP показана зеленым цветом, а митохондрии визуализированы с помощью 500 нМ MitoTracker Red CmxRos, показаны красным

Мутант, экспрессирующий eGFP-Aβ40, имел разветвленный митохондриальный ретикулум и диффузную внутриклеточную флуоресценцию, связанную с eGFP, сходную с контролем pZ-eGFP, что позволяет предположить, что экспрессия eGFP-Aβ40 не оказывала существенного влияния на митохондриальную структуру. Предварительная инкубация клеток с 250 нМ SkQThy в значительной степени восстанавливая митохондриальный ретикулум в клетках, экспрессирующих Аβ42 (Рис. 12).

Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжевых клеток экспрессирующих Аβ42.

С помощью метода проточной цитометрии и двойного окрашивания клеток (DHE и Sytox Green) был определен уровень окислительного стресса и клеточной смерти в мутантах дрожжей *Y. lipolytica*, экспрессирующих Аβ42 (Рис. 13).

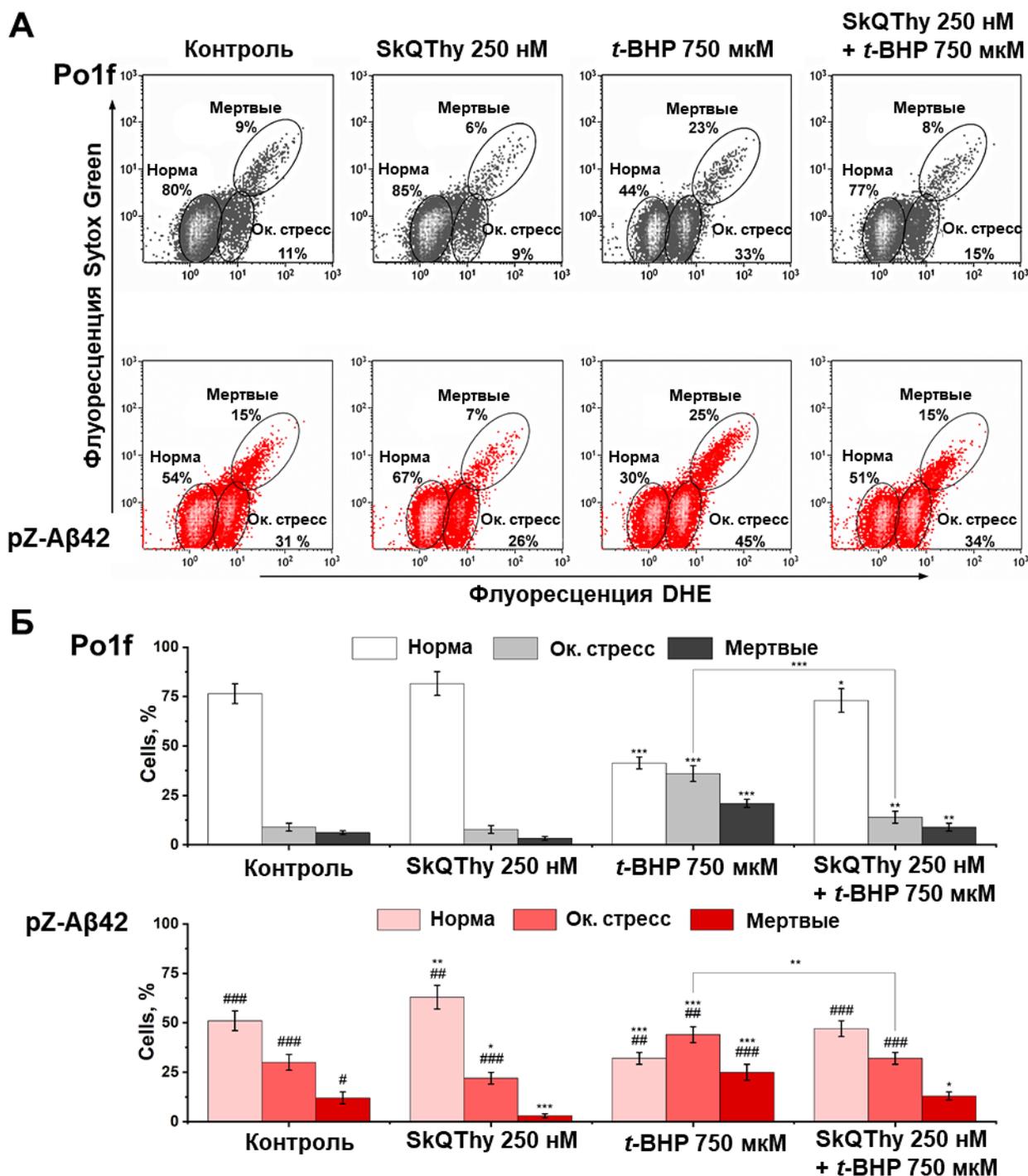


Рис. 13. Окислительный стресс и клеточная смерть дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ- Aβ42. Влияние SkQThy и t-BHP. (А) Измерения проточной цитометрии. Представлены результаты одного показательного эксперимента. (Б) Гистограммы результатов, полученных с помощью измерений проточной цитометрии из трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. Обозначения: * отмечены различия между результатами, полученными для штамма Po1f в разных условиях; * $p < 0,001$, ** $0,001 < p < 0,01$, * $0,01 < p < 0,05$; # отмечает различия между образцами Po1f и pZ-Aβ42; ### $p < 0,001$, ## $0,001 < p < 0,01$, # $0,01 < p < 0,05$**

Установлено, что уже в исходном состоянии клетки, экспрессирующие Аβ42, были подвержены значительно большим уровням окислительного стресса и клеточной смерти, чем контрольный штамм (Рис. 13). Под действием прооксиданта 750 мкМ *t*-ВНР в течение 2 ч популяция клеток с окислительным стрессом и клеточной смертью в образце с экспрессией Аβ42 многократно возрастала, причем более значительно по сравнению с контролем в тех же условиях. Это свидетельствует о меньшей устойчивости клеток, экспрессирующих Аβ42, к окислительному стрессу.

Предварительная инкубация с 250 нМ SkQThy в течение 1 ч значительно уменьшала популяцию клеток, подверженных окислительному стрессу и клеточной смерти в дрожжах, экспрессирующих Аβ42 и почти полностью предотвращала действие прооксиданта *t*-ВНР, что также хорошо согласуется с данными о восстановлении митохондриального ретикулума под действием SkQThy (Рис. 12).

Функциональные свойства митохондрий, выделенных из дрожжевых клеток, экспрессирующих Аβ42.

Для лучшего понимания влияния экспрессии Аβ42 на биоэнергетику клеток были сравнены энергетические параметры митохондриальных препаратов, выделенных из контрольного штамма Po1f и клеток pZ-Аβ42 (Рис. 14). Митохондрии из контрольных клеток были прочно сопряжены и не отличались от митохондриальных препаратов, обычно получаемых в предыдущих исследованиях. Напротив, митохондриальные препараты из клеток pZ-Аβ42 были слабо связаны (частично разобщены), как следует из пониженных величин дыхательного контроля.

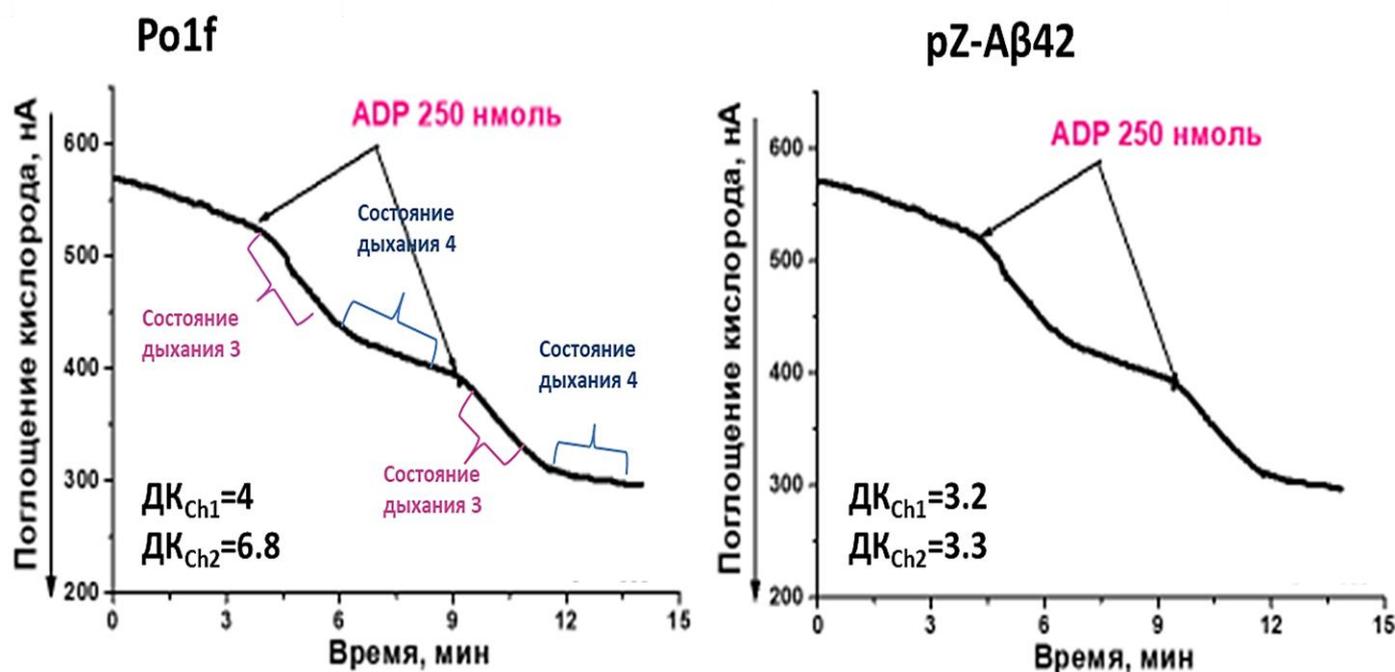


Рис. 14. Амперометрические кривые поглощения кислорода изолированными митохондриями дрожжей *Y. lipolytica* Po1f и Po1f pZ-Аβ42. Величины дыхательного контроля. В основную среду инкубации, содержащую 0,6 М маннит, 2 мМ Трис-фосфат, рН 7,2, 1 мМ ЭДТА, добавляли 20 мМ Трис-пируват + 5 мМ Трис-малат и митохондрии (0,5 мг белка/мл). Где указано, добавляли 250 нмоль ADP

Было исследовано действие классического разобщителя КЦХФ на дыхание митохондрий в состоянии 4 (Рис. 15). Для контрольного штамма наблюдалось

увеличение скорости дыхания в 6 раз по сравнению с исходным состоянием 4, а для дрожжей, экспрессирующих A β 42, в 3,4 раза. Различия в действии одного и того же разобщителя может свидетельствовать либо об изначальной разобщенности митохондрий, либо об ингибировании комплексов дыхательной цепи.

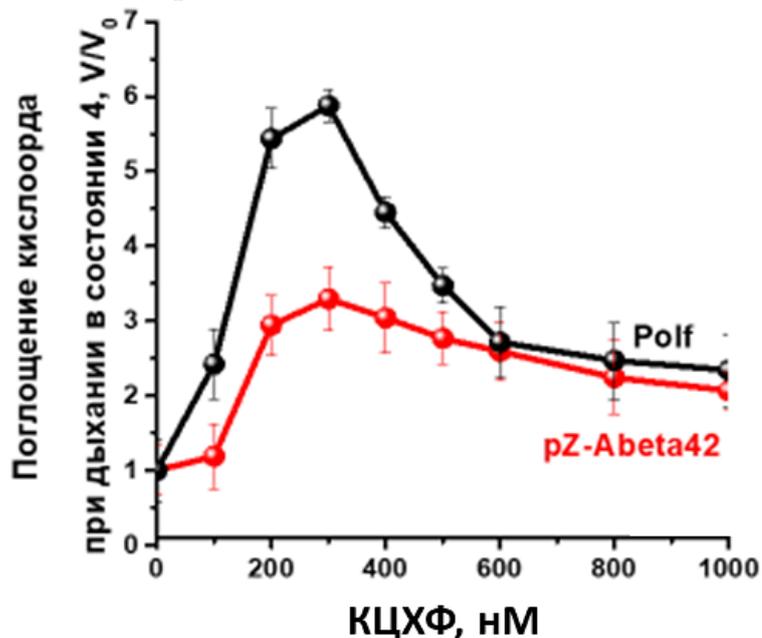


Рис. 15. Скорость поглощения кислорода изолированными митохондриями дрожжей *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-A β 42 при дыхании в состоянии 4. В инкубационную среду добавляли 20 мМ Трис-пируват + 5 мМ Трис-малат и митохондрии (0,2 мг белка/мл)

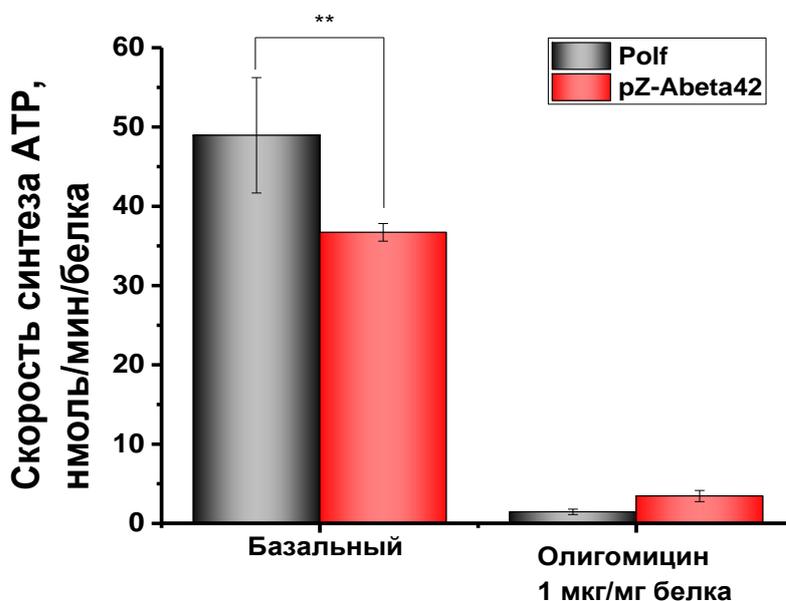


Рис. 16. Синтез АТФ митохондриями *Y. lipolytica* Polf и Polf pZ-A β 42. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-пируватом + 5 мМ трис-малатом, 25 мкМ феноловым красным, 6 мкМ Ар5А (ингибитором аденилаткиназы) и митохондриями

(0.2 мг белка/мл. Статистический анализ проводили с помощью одностороннего теста ANOVA. ** 0,001 < p < 0,01

Поскольку контрольные эксперименты показали, что ротенон и антимицин А, соответственно ингибиторы комплексов I и III дыхательной цепи в одинаковой степени ингибировали поглощение кислорода митохондриями контрольного и мутантного штаммов, был сделан вывод о том, что экспрессия клеткой Аβ42 приводит к частичному разобщению митохондрий.

Продукция АТФ митохондриями клеток, экспрессирующих Аβ42, была в среднем на 25% ниже, чем у контрольного штамма (Рис. 16). В качестве контроля использовали олигомицин, специфический ингибитор АТФ-синтазы. Различия между двумя штаммами были небольшими, но достоверными. В митохондриях контрольного штамма олигомицин почти полностью ингибировал синтез АТФ, тогда как в митохондриях клеток, экспрессирующих Аβ42, степень ингибирования была достоверно ниже, что еще раз свидетельствовало о частичном разобщении этих митохондрий.

Наконец, флуорометрически измеряли продукцию пероксида водорода митохондриальными препаратами, выделенными из контрольного штамма и клеток, экспрессирующих Аβ42. Для достижения максимального образования перекиси водорода митохондриальную каталазу (разлагающую перекись водорода) ингибировали аминотриазолом. Было обнаружено, что в митохондриях клеток, экспрессирующих Аβ42, скорость продукции перекиси водорода была выше, чем в контроле (Рис. 17). Преокидатор *t*-ВНР усиливал образование пероксида водорода митохондриями обоих штаммов, при этом митохондрии клеток, экспрессирующих Аβ42, были более чувствительны к прооксиданту, чем митохондрии контрольного штамма.

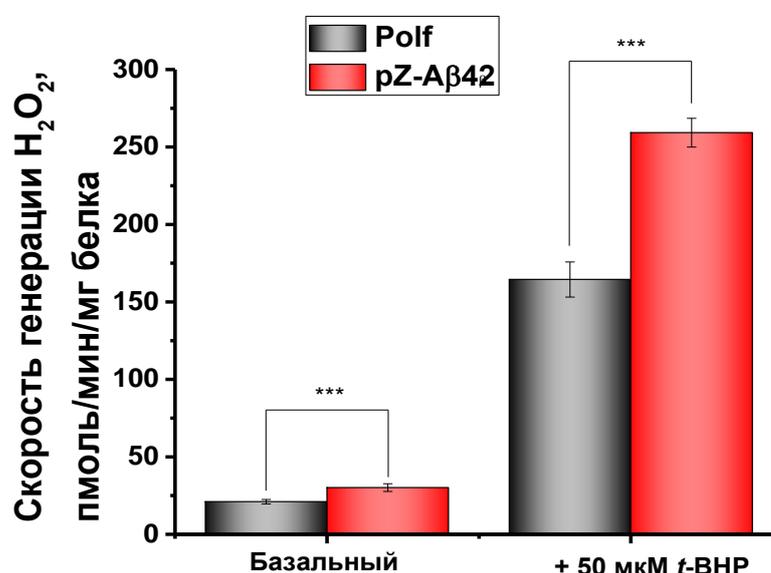


Рис. 17. Образование пероксида водорода митохондриями *Y. lipolytica* P01f и P01f pZ-Aβ42. Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ Трис-сукцинатом, 6 мМ аминотриазолом (ингибитором каталазы), 5 мкМ Amplex Red, пероксидазой хрена (9 М.Е./мл) и митохондриями (0,2 мг белка/мл). Статистический анализ проводился с помощью одностороннего теста ANOVA. *** p < 0,001.

Таким образом, комплексное сравнительное изучение функциональных свойств митохондрий, выделенных из клеток контрольного штамма, и клеток, экспрессирующих Аβ42, показало, что экспрессия Аβ42 индуцирует митохондриальную дисфункцию, о чем свидетельствуют частичное разобщение дыхания и фосфорилирования, снижение скорости продукции АТФ и повышение восприимчивости к индуцированному окислительному стрессу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы были созданы адекватные жизнеспособные модели гетерологической экспрессии белка НВх и Аβ42 на основе дрожжей аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*. На всех этапах исследования были выявлены комплексные нарушения морфологии и функций митохондрий. При этом факт обнаружения этих нарушений в дрожжевой модели, практически полностью исключает комплексные меж- и внутриклеточные взаимодействия, свойственные более сложным моделям и организмам, свидетельствует о прямом и специфическом воздействии НВх и Аβ42 на митохондрии. Этот факт также подтверждается агрегацией экспрессируемых белков в непосредственной близости с митохондриями клеток, а также эффективным предотвращением части описанных патологических эффектов митохондриально-направленным антиоксидантом SkQThy.

ВЫВОДЫ

- 1) Впервые созданы мутанты дрожжей *Y. lipolytica*, способные экспрессировать НВх, НВх120, Аβ42, Аβ40 и варианты, слитые с eGFP.
- 2) Митохондрии в клетках дрожжей, экспрессирующих НВх и Аβ42 фрагментированы, а экспрессируемые белки образуют агрегаты.
- 3) Дрожжевые клетки, экспрессирующие НВх и Аβ42, отличались повышенным уровнем окислительного стресса и клеточной смерти, а также пониженной устойчивостью к индуцированному окислительному стрессу.
- 4) Митохондрии, выделенные из дрожжей, экспрессирующих НВх и Аβ42, характеризовались разобщением дыхания и фосфорилирования, сниженной продукцией АТФ, избыточной продукцией H₂O₂ и повышенной чувствительностью к индуцированному окислительному стрессу.
- 5) Митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях частично обращал фрагментацию митохондрий, значительно снижал уровни окислительного стресса и клеточной смерти, а также увеличивал устойчивость клеток к индуцированному окислительному стрессу. SkQThy может быть рекомендован как перспективное терапевтическое соединение при дальнейших исследованиях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Епремян Х.Х.**, Голева Т.Н., Звягильская Р.А. Влияние Тау-белка на функции митохондрий // Биохимия. – 2022. – Т. 87(6). – С. 1014–1029.
2. **Епремян К.К.**, Goleva T.N., Rogov A.G., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. The First *Yarrowia lipolytica* Yeast Models Expressing Hepatitis B Virus X Protein: Changes in Mitochondrial Morphology and Functions // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10(9). – P. 1817.
3. **Епремян К.К.**, Rogov A.G., Goleva T.N., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. Altered Mitochondrial Morphology and Bioenergetics in a New Yeast Model Expressing A β 42 // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24(2). – P. 900.

Тезисы конференций

1. **Епремян Х.Х.**, Зиновкин Р.А. Создание дрожжевой модели для изучения роли митохондриального окислительного стресса в развитии гепатоцеллюлярной карциномы // XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» 11-14 февраля 2019 г. / сост. к.б.н. Стукачева Е.А. – печатный сборник тезисов, 2019. – С. 149 (постерный доклад).
2. **Епремян К.К.**, Rogov A.G., Zvyagilskaya R.A., Zinovkin R.A. Yeast model for studying the role of mitochondrial oxidative stress in the development of hepatocellular carcinoma // Proceedings of the 3rd International Conference «Homo Sapiens Liberatus» in celebration of the 85th birthday of professor V.P. Skulachev: February 20-21, 2020 / Moscow: TORUS PRESS, 2020. – P. 53-54 (постерный доклад).
3. **Епремян Х.Х.**, Зиновкин Р.А. Дрожжевая модель гепатоцеллюлярной карциномы // VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института Цитологии РАН: 12-15 октября 2020г. / научно-практический журнал Гены & Клетки: Том XV, №3, Приложение – С. 88 (постерный доклад).