МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Галкина Ксения Викторовна

Молекулярно-биологические основы регуляции множественной лекарственной устойчивости дрожжей в условиях дисфункции митохондрий

03.01.03 «Молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2020

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии дрожжей (электронных фотопроцессов) отдела молекулярной энергетики микроорганизмов НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель ***Кнорре Дмитрий Алексеевич***
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты ***Каменский Петр Андреевич****, доктор биологических наук, профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».*

Кушниров Виталий Владимирович*, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН)*

Манухов Илья Владимирович*, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»*

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 года в ___часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.
С диссертацией, а также со сведениями о регистрации участия в удаленном интерактивном режиме в защите можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/258215451/

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Мембранные переносчики с широкой субстратной специфичностью — одна из систем защиты клетки от токсичных соединений. Работа этих переносчиков снижает эффективность химиотерапии и антимикробных препаратов, а также приводит к появлению множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) — резистентности клеток к широкому спектру низкомолекулярных соединений с разными физико-химическими свойствами. Поэтому, понимание механизмов работы этих переносчиков и принципов их регуляции представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

Степень разработанности темы. Известно, что у грибов попадание ксенобиотика (чужеродного соединения) в цитоплазму индуцирует экспрессию генов, кодирующих переносчики с широкой субстратной специфичностью. Транскрипционные факторы Pdr1p/Pdr3p имеют неспецифический карман связывания низкомолекулярных соединений, похожий на соответствующий сайт (карман) связывания ксенобиотиков мембранными переносчиками. Связывание ксенобиотика этими транскрипционными факторами вызывает изменения их конформации и активирует экспрессию генов-мишеней, кодирующих ABC- (ATP binding cassette) и MFS- (major facilitator superfamily) переносчики с широкой субстратной специфичностью (Thakur et al., 2008). Таким образом, многие субстраты неспецифических переносчиков являются одновременно и индукторами генов, кодирующих эти самые переносчики. Представляет интерес найти такие соединения, которые бы легко проникали в клетки грибов, но при этом не обнаруживались бы данной системой и не приводили к активации генов неспецифических переносчиков. Липофильные катионы способны проникать в клетку, а в клетках — аккумулируются в митохондриях. Адресация терпенов с антигрибковыми свойствами в митохондрии в виде химерных молекул на основе липофильных катионов

позволяет использовать эти соединения против патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью, нечувствительных к обычным антигрибковым соединениям (Chang et al 2018). Однако механизмы регуляции систем МЛУ, в ответ на появление в клетки липофильных катионов мало изучены.

Цель данной работы - исследование принципов регуляции множественной лекарственной устойчивости на примере клеток дрожжей, подвергнутых воздействию липофильных катионов.

Задачи:

1. Определить динамику ингибирующего и активирующего эффектов липофильных катионов на активность неспецифических ABC-переносчиков в клетках дрожжей.
2. Выявить гены, делеция которых препятствует активации неспецифических ABC-переносчиков под действием липофильных катионов. Проверить, необходимы ли гены ретроградной сигнализации для активации системы неспецифической защиты клетки, вызванной липофильными катионами.
3. Получить и охарактеризовать штамм, в котором подавлена транслокация адениновых нуклеотидов между матриксом митохондрий и цитоплазмой. Проверить, является ли такая транслокация необходимым фактором для активации неспецифических ABC-переносчиков под действием липофильных катионов.
4. Проверить гипотезу о том, что антиоксиданты препятствуют активации неспецифической лекарственной устойчивости в клетках дрожжей *Candida glabrata*.

Научная новизна. В результате проделанной работы были выявлены принципы регуляции множественной лекарственной устойчивости клеток под воздействием липофильных катионов. Во-первых, было показано, что в

зависимости от времени воздействия данные соединения могут выступать как в роли индукторов, так и в роли конкурентных ингибиторов МЛУ-переносчиков. Во-вторых, было установлено, что ключевая роль в активации МЛУ липофильными катионами принадлежит транскрипционному фактору Pdr1p. Был получен и охарактеризован штамм, в котором ген основного ATP/ADP-антипортера *PET9* поставлен под регулируемый галактозный промотор. Было показано, что подавление обмена адениновыми нуклеотидами между матриксом митохондрий и цитоплазмой, а также нарушение путей митохондриальной ретроградной сигнализации не препятствуют активации МЛУ под воздействием липофильных катионов. Кроме того, мы показали, что добавление перекиси водорода в качестве прооксиданта способно дополнительно увеличить уровень активности МЛУ на фоне его индукции липофильными катионами. В свою очередь, добавление антиоксиданта пластохинонилдецилтрифенилфосфония снижает уровень активации МЛУ и увеличивает цитостатический эффект миконазола в штамме с делецией гена основного ABC-переносчика.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов множественной лекарственной устойчивости у дрожжей. Данные этой работы могут быть использованы для разработки более эффективных противогрибковых препаратов, а также для развития новых стратегий применения уже известных антимикотиков. В частности, согласно нашим данным, антиоксиданты или конкурентные ингибиторы МЛУ-переносчиков могут использоваться в совместной терапии с антимикотиками для увеличения их цитостатического эффекта и, соответственно, снижения рабочей концентрации антимикотиков. Более того, выявленные нами закономерности регуляции активности переносчиков с широкой субстратной специфичностью могут быть использованы не только для преодоления

проблемы множественной лекарственной устойчивости клеток при лечении микозов, но и при разработке противоопухолевых препаратов.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с использованием стандартных молекулярно-биологических, биохимических и микробиологических методов. В качестве объектов были использовали штаммы пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полученных на основе *W303* и *BY4741* и условно патогенные штаммы дрожжей *Candida glabrata*. Дрожжи растили на различных богатых и синтетических питательных средах согласно (Sherman, 2002). Штаммы, необходимые для исследования, получали согласно стандартным протоколам путем трансформации клеток ПЦР продуктом литий-ацетатным методом; скрещиванием, спорулированием и тетрадным анализом либо инкубацией с бромистым этидием (для потери митохондриальной ДНК). Цифровые изображения были получены с помощью камеры Olympus DP30BW на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51 с применением дифференциально-интерференционного контраста. Количественно интенсивность флуоресценции GFP и Нильского красного мы оценивали с помощью CytoFLEX (Beckman Coulter, США) и EC800 (Sony, Япония). Устойчивость к химическим соединениям определяли по скорости роста с помощью планшетного спектрофотометра VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific). Относительное количество мРНК генов основных МЛУ-переносчиков измеряли методом ПЦР в режиме реального времени. Данные обрабатывали с использованием пакета статистических программ R (http://www.R- project.org).

Положения, выносимые на защиту:

1. Липофильные катионы являются одновременно конкурентными ингибиторами и индукторами МЛУ-переносчиков в клетках дрожжей *S.cerevisiae* и *C.glabrata*. Ингибирующий и активирующий эффекты разнесены во времени.

2. МЛУ, вызванная липофильным катионом C_{12}TPP, не опосредована Rtg-путем ретроградной сигнализации, но зависит от транскрипционного фактора Pdr1p.
3. Перекись водорода активирует экспрессию гена Yap1p-зависимого MFS-переносчика *FLR1* и усиливает эффект активации МЛУ под действием C_{12}TPP.
4. Делеция гена ключевого неспецифического ABC-переносчика дрожжей *C.glabrata CDR1* делает систему регуляции МЛУ чувствительной к экзогенным антиоксидантам
5. Нарушения биосинтеза эргостерина на уровне реакций, катализируемых Erg9p, Erg6p, Erg5p, Erg4p и нарушения его транспорта белками Lam-семейства приводят к изменению содержания в клетках Pdr5p — ABC-переносчика с широкой субстратной специфичностью.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы настоящей работы были представлены на V Съезде Биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), Четвёртом съезд микологов России (Москва, Россия, 2017), международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пущино, Россия, 2017), 36th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics (Мартина Франка, Италия, 2018), Biomembranes 2018 (Долгопрудный, Россия, 2018) и The 44th FEBS Congress (Краков, Польша 2019).

Публикации. По материалам научно-квалификационной работы (диссертации) опубликовано 16 работ (6 статей в рецензируемых журналах и 10 тезисов докладов).

Личный вклад автора. Основные результаты работы были получены самим автором в период с 2015 по 2019 г. Личный вклад автора заключается в самостоятельном анализе литературы, планировании и выполнении экспериментов, а также в обработке и анализе полученных данных. Автор

также самостоятельно представлял результаты исследований на конференциях и участвовал в написании статей.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 133 страницах машинописного текста и включают 36 рисунков и 10 таблиц. Диссертация состоит из разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы (последний раздел содержит 156 источников).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Липофильный катион C_{12}TPP - индуктор и конкурентный ингибитор ABC-переносчиков

Липофильные катионы являются субстратами ABC-переносчиков дрожжей *S.cerevisiae* (Kolaczkowski et al., 1996). С одной стороны, данные соединения накапливаются в матриксе митохондрий и таким образом могут избегать непосредственного связывания с транскрипционными факторами Pdr1/Pdr3p, регулирующими экспрессию генов МЛУ-переносчиков. С другой стороны, накопление липофильных катионов в митохондрии может вызывать дисфункцию этих органелл и, таким образом, запускать в клетке сигнальный каскад, приводящий к активации системы МЛУ. Поэтому, прежде всего мы решили выяснить, будут ли митохондриально-направленные липофильные соединения, подобно другим субстратам ABC-переносчиков активировать механизм множественной лекарственной устойчивости.

Мы обнаружили, что липофильный катион додецилтрифенилфосфоний (C_{12}TPP) увеличивает относительный уровень мРНК трех основных ABC-переносчиков: *PDR5, SNQ2* и *YOR1* в клетках дрожжей дикого типа, но не в клетках штамма *Δpdr1Δpdr3* (Рисунок 1A). Данные флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуорометрии подтвердили, что C_{12}TPP значительно увеличивает количество основных ABC-переносчиков в цитоплазматической мембране клеток (Рисунок 1B,C). В данных экспериментах мы использовали штаммы, в каждом из которых к

геномной копии гена ABC-переносчика был подшит ген флуоресцентного белка GFP (так, чтобы GFP оказался с C-конца белка).

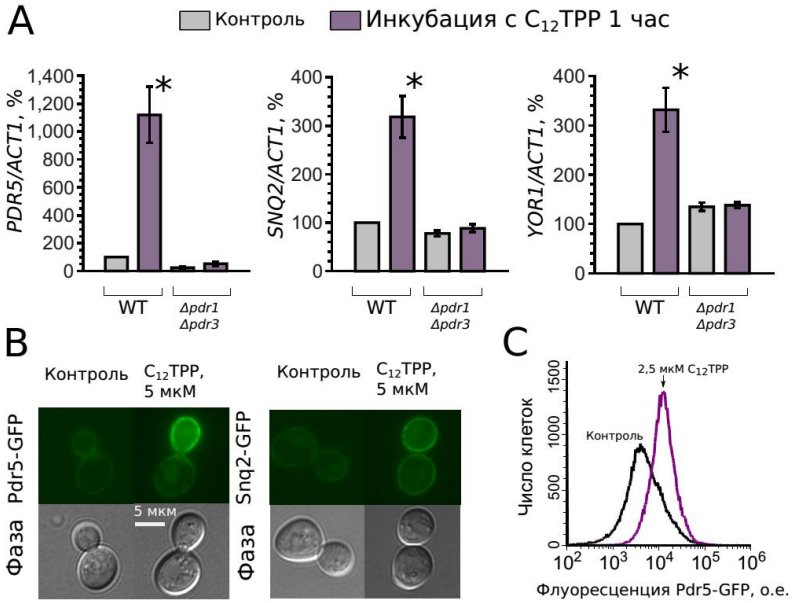

Рисунок 1. C_{12}TPP стимулирует накопление ABC-переносчиков в мембране клеток. (A) Увеличение уровня мРНК генов *PDR5*, *SNQ2*, *YOR1* в клетках под действием C_{12}TPP (5 мкМ). Уровень мРНК нормировали на количество мРНК гена *ACT1*. За 100% был взят уровень мРНК в клетках дикого типа (WT), не обработанных C_{12}TPP (среднее значение со стандартной ошибкой среднего, n=4). *P = 0,028 для сравнения с контролем согласно непарному критерию Манна-Уитни. (B) Флуоресцентная микроскопия клеток штаммов *Pdr5-GFP* и *Snq2-GFP* (время инкубации с C_{12}TPP 1 час). (C) Репрезентативный график эксперимента с клетками, экспрессирующими Pdr5-GFP с использованием проточной цитофлуорометрии (время инкубации с C_{12}TPP 1 час).

Поскольку увеличение содержания фермента или переносчика в клетках не обязательно приводит к увеличению его активности, мы решили исследовать накопление Нильского красного (флуоресцентного незаряженного субстрата ABC-переносчиков) в клетках дрожжей, предварительно обработанных липофильным катионом C_{12}TPP. Как видно из

рисунка 2, прединкубация клеток с C_{12}TPP ингибировала накопление Нильского красного в клетках *S.cerevisiae*. В то же самое время, добавление C_{12}TPP в среду инкубации одновременно с Нильским красным приводило к резкому увеличению концентрации флуоресцентного субстрата ABC-переносчиков в дрожжевых клетках (Рисунок 2B,C). Таким образом, в зависимости от времени воздействия на клетку C_{12}TPP может быть как ингибитором, так и активатором МЛУ. Разработанный нами протокол (Рисунок 2B) позволяет определять активацию и ингибирование МЛУ в одном эксперименте и не требует больших объемов проб. Этот подход можно использовать для широкомасштабных химических скринингов, направленных на выявление соединений, которые являются ингибиторами МЛУ, но при этом не активируют компенсаторный ответ клетки.

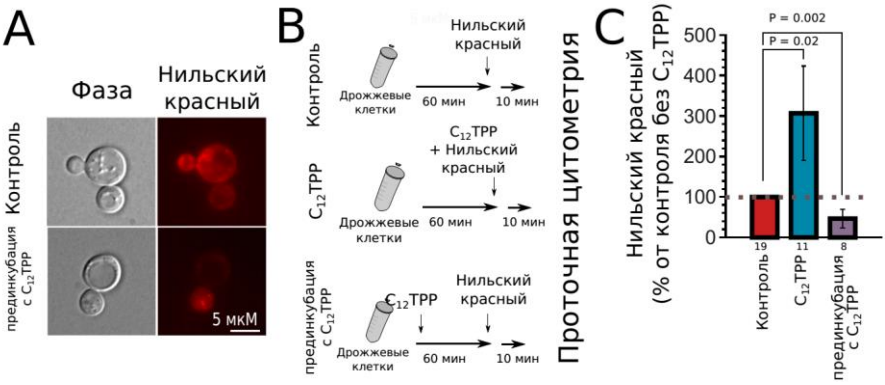

Рисунок 2. Прединкубация клеток с C_{12}TPP предотвращает накопление ими субстрата МЛУ-переносчиков Нильского красного. (A) Прединкубация клеток с 2,5 мкМ C_{12}TPP в течение 1 часа снижает уровень накопления Нильского красного в клетках. (B) Дизайн эксперимента с Нильским красным. (C) Количественный анализ данных проточной цитофлуорометрии (среднее ± стандартное отклонение). Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони.

Активация МЛУ липофильными катионами не опосредована их воздействием на митохондрии и ретроградной сигнализацией

Наши опыты показали, что липофильные катионы, подобно другим ксенобиотикам, при попадании в клетку вызывают активацию защитного ответа — повышают продукцию ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью. При этом известно, что липофильные катионы ингибируют митохондриальное дыхание (Stermitz, 2000) и, в присутствии свободных жирных кислот, разобщают окисление NADH и фосфорилирование (Severin, 2010). Дисфункция митохондрий, вызванная потерей мтДНК, активирует в клетках Rtg-зависимый сигнальный путь, который стимулирует экспрессию *PDR5* (Hallstrom and Moye-Rowley, 2000). Поэтому, мы предположили, что активация МЛУ под действием липофильных катионов может быть опосредована их воздействием на митохондрии и осуществляться белками Rtg-сигнального пути.

Чтобы проверить это предположение мы сконструировали штаммы, в которых нокаутированы гены RTG-сигнального пути, а к геномной копии гена *PDR5* подшит ген флуоресцентного белка GFP. Как оказалось, прерывание данного сигнального каскада не предотвратило накопление ABC-переносчика в клетках после инкубации их с C_{12}TPP (Рисунок 3A). Содержание Нильского красного в клетках штаммов с делециями генов *RTG* также не отличалось от контроля (Рисунок 3B). Известно, что активация Rtg-сигнального пути приводит к активации *PDR3*-зависимой экспрессии *PDR5* и не зависит от активности транскрипционного фактора *PDR1* (Panwar & Moye-Rowley, 2006). Мы обнаружили, что делеция гена *PDR1*, но не гена *PDR3* ингибировала накопление в клетках Pdr5-GFP в ответ на добавление C_{12}TPP (Рисунок 3A).

В наших экспериментах C_{12}TPP стимулировал снижение содержания Нильского красного в клетках штамма *Δpdr3*, но не оказывал подобного эффекта в клетках штамма *Δpdr1* (Рисунок 3B). На основании полученных нами данных можно утверждать, что C_{12}TPP индуцирует экспрессию *PDR5* независимо от Rtg-сигнального пути.

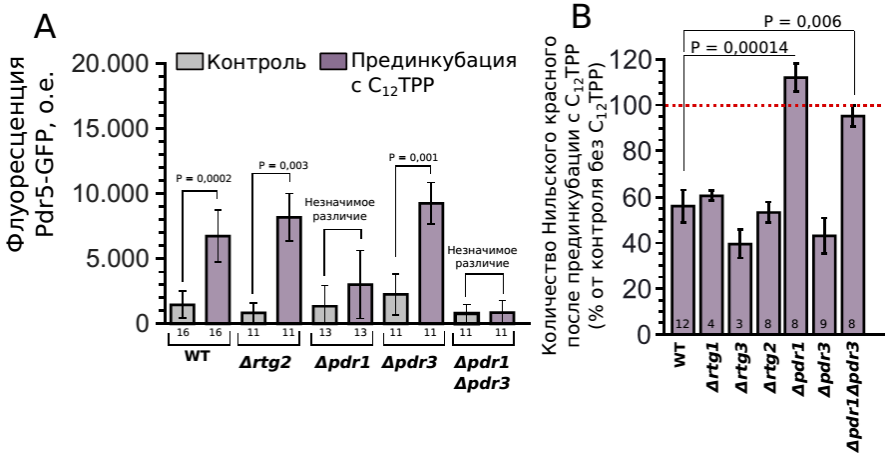

Рисунок 3. Роль генов *PDR* и ретроградной сигнализации в C_{12}TPP-зависимой активации МЛУ. (A) Уровень Pdr5-GFP в клетках после инкубации с C_{12}TPP (2,5 мкМ, 1 час). (B) Уровень Нильского красного после прединкубации клеток с C_{12}TPP (2,5 мкМ, 1 час), среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони.

В клетках эукариот основные биоэнергетические факторы: трансмембранный потенциал митохондрий, цитоплазматический и митохондриальный пул ATP сопряжены друг с другом посредством работы ATP-синтазы и ATP/ADP антипортера. Чтобы понять, является ли активация гена *PDR5* прямым следствием нарушения митохондриальной энергетики, мы сконструировали штамм, в котором ген основного митохондриального ATP/ADP-переносчика *PET9* (*AAC2*) поставлен под контролируемый галактозный промотор. Репрессия гена *PET9* подавляет обмен ATP/ADP между митохондриями и цитоплазмой и тем самым разобщает цитоплазматический и митохондриальный пул ATP. В этом штамме мы к геномной копии гена *PDR5* подшили ген флуоресцентного белка GFP и таким образом исследовали содержание Pdr5-GFP в клетках в условиях подавленного обмена адениновых нуклеотидов. Несмотря на то, что базовый уровень ABC-транспортера в клетках штамма P_{Gal}-*PET9 PDR5-GFP* был

незначительно выше, чем в контроле, в клетках обоих штаммов мы наблюдали эффект увеличения внутриклеточной концентрации Pdr5-GFP после добавления C_{12}TPP, стандартного лабораторного разобщителя пентахлорфенола и антимикотика клотримазола, который мы использовали в качестве положительного контроля (Рисунок 4). Полученные нами данные позволяют предположить, что активация МЛУ под действием C_{12}TPP не связана непосредственно с вызванной им дисфункции митохондрий и снижением концентрации ATP в цитоплазме.

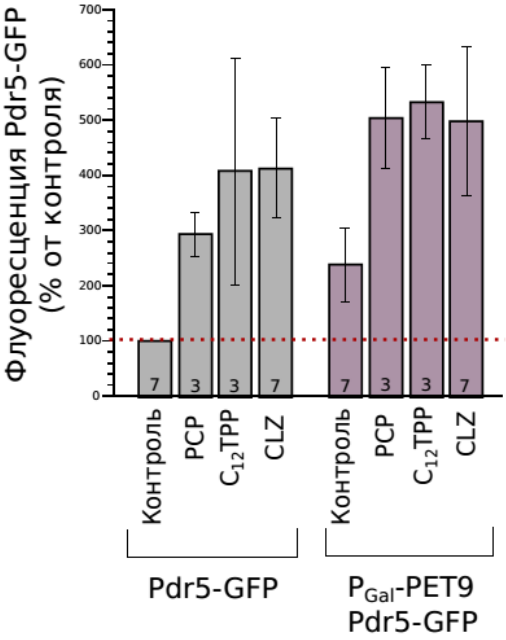

Рисунок 4. Репрессия гена переносчика адениновых нуклеотидов *PET9* не предотвращает накопление Pdr5, вызванное C_{12}TPP и PCP. Содержание Pdr5-GFP в клетках дрожжей после инкубации с C_{12}TPP (2,5 мкМ) и PCP (20 мкМ). Азольный антимикотик клотримазол (CLZ, 5 мкМ) использовали в качестве положительного контроля активации МЛУ. Время инкубации 1 час. Клетки растили в среде YPD (репрессия галактозного промотора). Столбики демонстрируют среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов.

Редокс-регуляция МЛУ в клетках *C.glabrata*

Многие ксенобиотики вызывают в клетке “вторичный” окислительный стресс, который может активировать основные ABC-переносчики. Ранее было показано, что липофильные катионы также являются индуктором окислительного стресса в клетках дрожжей (Ojovan et al., 2011). Мы предположили, что активация системы МЛУ липофильными катионами может быть опосредована образованием активных форм кислорода в клетке и активацией редокс-чувствительных сигнальных каскадов. Для исследования механизмов редокс-регуляции МЛУ мы взяли вид оппортунистического патогена — *Candida glabrata*. Данный вид дрожжей в естественных условиях часто испытывает воздействие экзогенной перекиси водорода и потому способен к быстрой активации экспрессии генов стрессового ответа (Lelandais et al., 2008). В *C. glabrata* транскрипционный фактор *PDR1* гомологичен транскрипционным факторам *PDR1* и *PDR3* дрожжей *S.cerevisiae* (Moye-Rowloy, 2019), а ген PDR-переносчика *CDR1* является паралогом гена основного ABC-переносчика *S.cerevisiae* — *PDR5*.

Мы обнаружили, что, также как и в случае *S.cerevisiae*, в клетках *C.glabrata* C_{12}TPP является индуктором МЛУ: прединкубация клеток с этим липофильным катионом вызывала активацию системы МЛУ, которую мы оценивали по содержанию Нильского красного методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 5A). При этом, добавление C_{12}TPP, а также конъюгированного с липофильным катионом антиоксиданта пластохинола (пластохинонилдецилтрифенилфосфония, SkQ1) вызывало увеличение экспрессии гена *FLR1* (Рисунок 5C), который кодирует MFS-переносчик с широкой субстратной специфичностью.

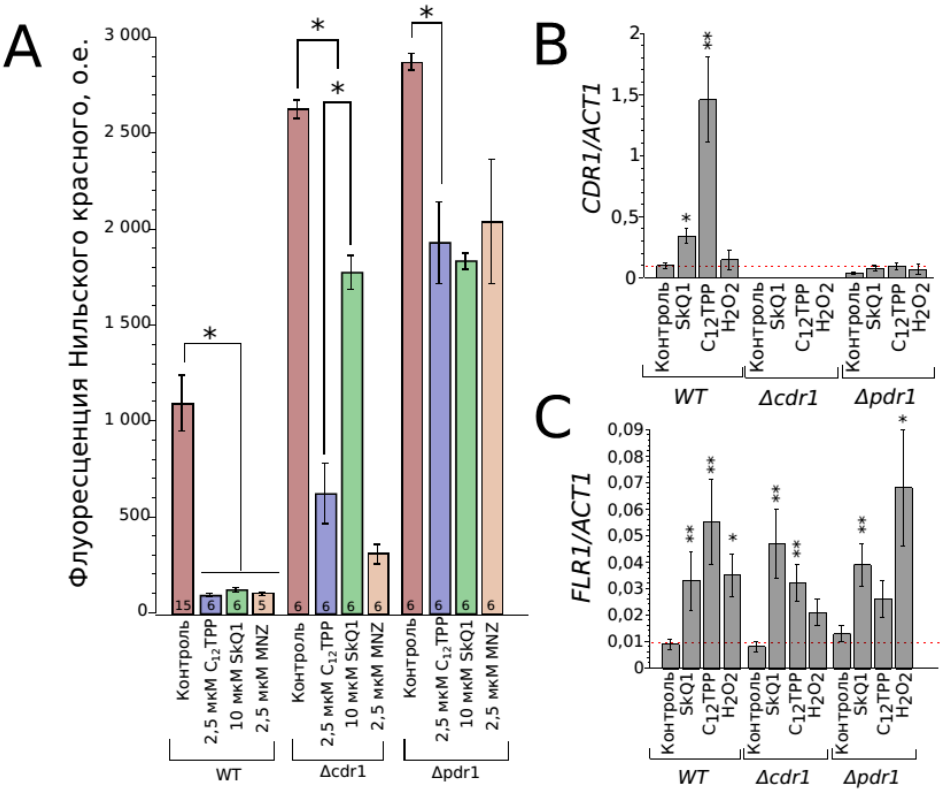

Рисунок 5. Липофильные катионы вызывают активацию МЛУ-переносчиков. (A) Активация МЛУ в клетках дикого типа (WT) и в клетках штаммов *Δcdr1* и *Δpdr1* под действием C_{12}TPP и SkQ1. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. *P value < 0,006 согласно непарному статистическому критерию Манна-Уитни. (B,C) Количественный анализ ПЦР в реальном времени для генов (B) *CDR1*; (C) *FLR1*. Все данные по экспрессии мРНК нормировали относительно уровня мРНК гена *ACT1*. За 1 принято эквивалентное соотношение мРНК гена мишени к мРНК *ACT1*. Концентрация C_{12}TPP 5 мкМ, SkQ1 12,5 мкМ, H_2O_2 10 mM (среднее значение ±стандартная ошибка среднего, n=4-8). * P < 0,05; ** P < 0,01 согласно непарному критерию Манна-Уитни.

Экспрессия *FLR1* регулируется транскрипционным фактором Yap1p, который является естественным сенсором дрожжей на H_2O_2 в цитоплазме клетки. В наших экспериментах добавление H_2O_2 увеличивало относительное содержание мРНК *FLR1* вне зависимости от наличия геномной копии *PDR1* (Рисунок 5C). При

этом, добавление к клеткам экзогенной H_2O_2 не приводило к активации *CDR1*. C_{12}TPP и SkQ1 значительно увеличивали уровень экспрессии *CDR1*. Делеция гена транскрипционного фактора *PDR1* предотвращала эффект липофильных катионов на экспрессию гена *CDR1,* но не *FLR1* (Рисунок 5B,C). Эти результаты, в совокупности с данными из литературы, предполагают, что липофильные катионы вызывают окислительный стресс в клетке, что приводит к активации гена *FLR1*.

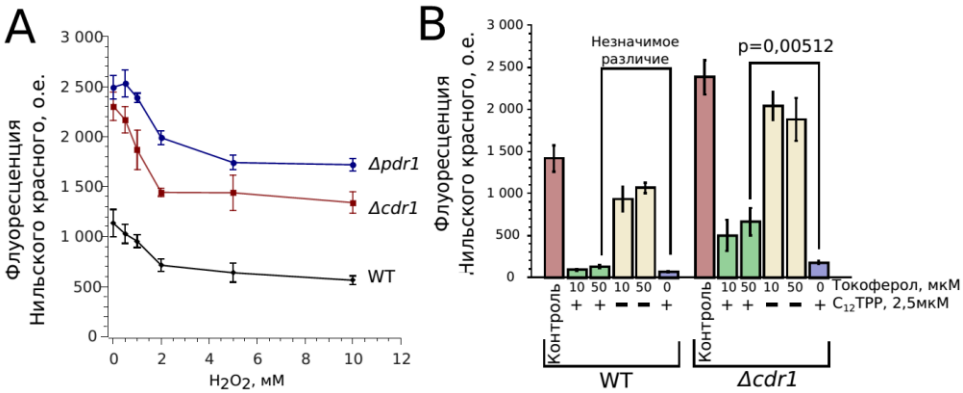

Рисунок 6. Уровень окислительного стресса в клетках влияет на активность работы МЛУ-переносчиков. (A) Накопление Нильского красного в клетках дрожжей, проинкубированных 1 час с различными концентрациями перекиси водорода (среднее ±стандартная ошибка среднего, n=6). (B) Количественный анализ данных проточной цитофлуорометрии для опытов по прединкубации с C_{12}TPP в присутствии альфа-токоферола и без него (n=6). P value рассчитано согласно непарному статистическому критерию Манна-Уитни.

Изменения экспрессии генов далеко не всегда приводит к функциональным перестройкам клетки. Поэтому, мы решили исследовать воздействие окислительного стресса и липофильных катионов на способность клеток накапливать флуоресцентный субстрат МЛУ — Нильский красный. Прединкубация клеток с перекисью водорода активировала МЛУ в клетках дикого типа и клетках штаммов *Δcdr1* и *Δpdr1* (Рисунок 6A). Эти данные хорошо согласуются с результатами количественного РТ-ПЦР. Мы предположили, что, добавление низкомолекулярных антиоксидантов приведет, наоборот, к снижению активации МЛУ и потому предотвратит снижение концентрации Нильского красного в клетках, вызванное добавлением липофильных катионов. Однако добавление

антиоксиданта α-токоферола не влияло на накопление Нильского красного в клетках дикого типа, прединкубированных с C_{12}TPP (Рисунок 6B). При этом, делеция генов *PDR1* и *CDR1* не полностью ингибировали C_{12}TPP-зависимую активацию МЛУ в клетках дрожжей *C.glabrata*, как это наблюдалось у *S.cerevisiae* (Рисунки 3B, 5A).

Мы предположили, что в клетках дикого типа активность защитного механизма, включающая в себя активацию транскрипционного фактора *PDR1* и повышенную экспрессию гена *CDR1*, маскирует второй путь МЛУ. Чтобы проверить это предположение, мы оценили уровень накопления Нильского красного в клетках штамма *Δcdr1* после 1 часа инкубации с C_{12}TPP в присутствии и отсутствии антиоксиданта альфа-токоферола. Добавление к клеткам альфа-токоферола частично препятствовало активации МЛУ под действием C_{12}TPP в штамме *Δcdr1*, как и в диком типе (Рисунок 6B). C_{12}TPP часто используют в качестве контроля в экспериментах с SkQ1 для разделения антиоксидантных и неспецифических эффектов этого соединения (Zakharova, 2017). Чтобы проверить, не будет ли наличие редокс-группы в структуре молекулы SkQ1, способной восстанавливаться дыхательной цепью митохондрий, мешать активации системы МЛУ мы исследовали активность МЛУ-переносчиков в штаммах *Δcdr1* и дикого типа. По аналогии с результатом с C_{12}TPP и α-токоферолом, мы обнаружили, что в штамме *Δcdr1* добавление к клеткам SkQ1 приводит к более слабой активации МЛУ в сравнении с действием C_{12}TPP (Рисунок 5A). Таким образом, в наших экспериментах антиоксиданты оказались способны снизить уровень активации МЛУ, но этот эффект наблюдался только в клетках с делецией гена основного PDR-переносчика *CDR1*.

Каким образом делеция гена ABC-переносчика *CDR1* может способствовать детекции ксенобиотика или активации МЛУ? Мы предполагаем, что в штамме дикого типа основная петля отрицательной обратной связи, включающая в себя Cdr1p, препятствует накоплению ксенобиотика в клетке. Это делает вклад других регуляционных механизмов, в том числе и редокс-зависимый механизм, несущественным (Рисунок 7). Делеция гена *CDR1*, в свою очередь, увеличивает роль альтернативных механизмов.

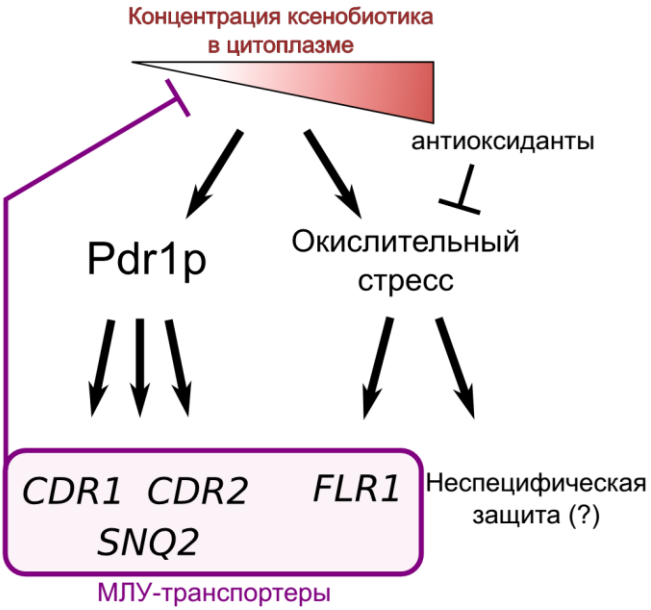

Рисунок 7. Предполагаемая схема активации системы МЛУ в дрожжах *C.glabrata*. Увеличение концентрации ксенобиотика в цитоплазме клеток стимулирует экспрессию генов основных ABC-переносчиков и препятствует его последующему накоплению. Совместно система детекции и откачивания чужеродного соединения формируют петлю отрицательной обратной связи. Делеция гена основного ABC-переносчика *CDR1* проявляет дополнительную петлю регуляции МЛУ, активирующуюся в клетках в ответ на эндогенный окислительный стресс

В ходе работы мы показали, что липофильные катионы являются субстратами и активаторами МЛУ-транспортеров в клетках *C. glabrata*. При этом наши данные предполагают, что МЛУ может возникать в результате вторичного окислительного стресса, вызванного ксенобиотиками. Адаптивный ответ на этот вторичный стресс обеспечивает альтернативный путь активации системы МЛУ и делает механизмы активации лекарственной устойчивости у дрожжей вырожденными.

Поиск генов — функция которых необходима для C_{12}TPP-зависимой активации МЛУ

На основе специально разработанной системы скрининга авторами другой лаборатории был составлен список генов, делеция которых при добавлении ксенобиотиков (не липофильных катионов) изменяла уровень активации ABC-переносчиков Pdr5 и Yor1 (Yibmantasiri et al., 2014). Предполагается, что продукты данных генов, вовлечены в дополнительные пути активации системы МЛУ и/или взаимодействуют с транскрипционными факторами Pdr1/3. Мы воспользовались доступным нам набором штаммов из делецонной коллекции Invitrogen (Huh et al., 2003) и проверили, влияет ли делеция генов, опубликованных в вышеупомянутой работе, на C_{12}TPP-индуцированную активацию системы МЛУ. Кроме того, у нас была возможность оценить эффект делеции гена *MDM39* (*GET1*), продукт которого регулирует встраивание белков в мембрану эндоплазматического ретикулума, и, кодирующего белок семейства Hsp70, гена *SSZ1* на активацию системы МЛУ под действием C_{12}TPP. Делеция данных генов в совокупности с делециями *PDR1* и *PDR3* повышала чувствительность клеток к азольным антимикотикам по сравнению с клетками штамма *Δpdr1Δpdr3* (Yibmantasiri et al., 2014). Используя концентрацию Нильского красного в клетках в качестве показателя активности МЛУ-переносчиков мы обнаружили, что делеция генов *MDM39, SPT8* и *ERG3* предотвращает активацию системы МЛУ липофильным катионом C_{12}TPP (Рисунок 8А).

Причиной, по которой прединкубация с C_{12}TPP не привела к активации МЛУ в данных штаммах могло быть (1) нарушение механизма детекции липофильного катиона в клетке или (2) нарушение экспрессии генов, необходимых для множественного лекарственного ответа. Вероятно, последнее произошло в штамме *Δspt8,* так как Spt8p является субъединицей SAGA-комплекса и вовлечен в регуляцию транскрипции (Sterner & Belotserkovskaya, 2002). В случае с геном *MDM39* известно, что его продукт является субъединицей GET комплекса и участвует во вставке белков в мембрану эндоплазматического ретикулума (Schuldiner et al., 2008). Мы предполагаем, что в данном случае отсутствие белка Mdm39 может приводить к нарушению процессинга основных ABC-переносчиков и, таким образом, препятствовать их накоплению в цитоплазматической мембране в ответ попадание ксенобиотика в клетку. Ген *ERG3*, в свою очередь, участвует в

биосинтезе эргостерина, компонента клеточной мембраны дрожжей (Lees et al., 1995). Так как в наших экспериментах делеция гена *ERG3* не препятствовала накоплению Нильского красного в клетках после прединкубации с C_{12}TPP, мы оценили вклад делеций генов, кодирующих ферменты конечных реакций биосинтеза эргостерина в C_{12}TPP-индуцируемой активации МЛУ. Делеция генов *ERG6, ERG3* и *ERG4* препятствовала накоплению Pdr5-GFP в клетках под воздействием C_{12}TPP (Рисунок 8B). В тоже время добавление клотримазола - азольного антимикотика, ингибирующего путь синтеза эргостерола, приводило к увеличению интегральной флуоресценции Pdr5-GFP во всех протестированных штаммах (Рисунок 8B). Это позволило нам предположить, что механизм активации МЛУ в ответ на добавление липофильного катиона отличается от механизма активации МЛУ азольными антимикотиками.

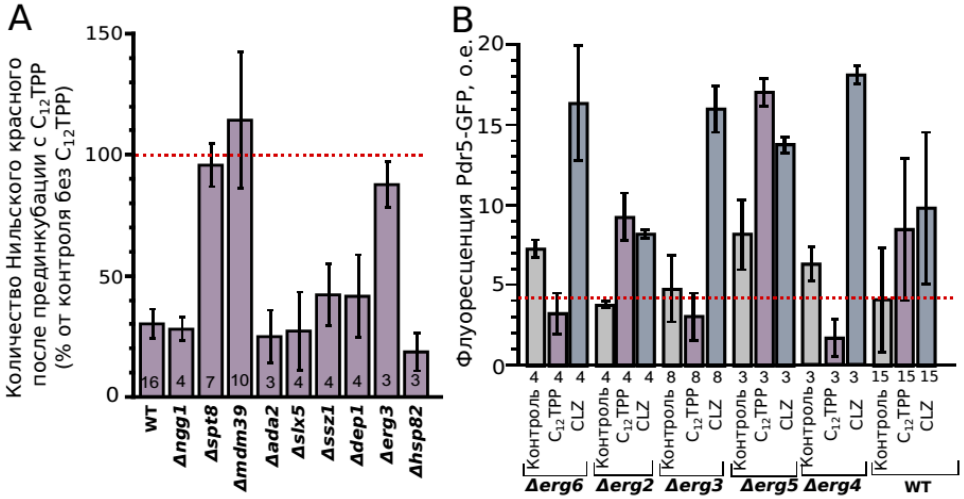

Рисунок 8. Роль потенциальных генов-регуляторов в C_{12}TPP-зависимой активации МЛУ. (A) Уровень Нильского красного после прединкубации клеток с C_{12}TPP (2,5 мкМ, 1 час). (B) Содержание Pdr5-GFP в клетках после инкубации 1 ча с C_{12}TPP (2,5 мкМ) и клотримазолом (CLZ, 5 мкМ). Столбики демонстрируют среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов.

В наших экспериментах в *S. cerevisiae* делеция генов *ERG6, ERG5* и *ERG4* приводила к увеличению интегральной флуоресценции Pdr5-GFP в клетках, по

сравнению с клетками дикого типа (Рисунок 8B). Так как делеции генов, кодирующих ферменты ранних стадий синтеза эргостерина, являются летальными для клеток, мы сконструировали штамм, в котором ген *ERG9* поставлен под регулируемый промотор P_{GAL}. Мы обнаружили, что ингибирование биосинтеза эргостерина на этапе синтеза сквалена с помощью репрессии белка Erg9p приводит к существенному накоплению Pdr5-GFP в клетке (Рисунок 9A). Нарушение транспорта стеринов также вызывало подобные изменения: мы обнаружили увеличение содержания Pdr5-GFP в штамме, в котором нокаутированы все четыре гена семейства *LAM*, отвечающие за транспорт стеринов между плазматической мембраной и эндоплазматическим ретикулумом (Рисунок 9B).

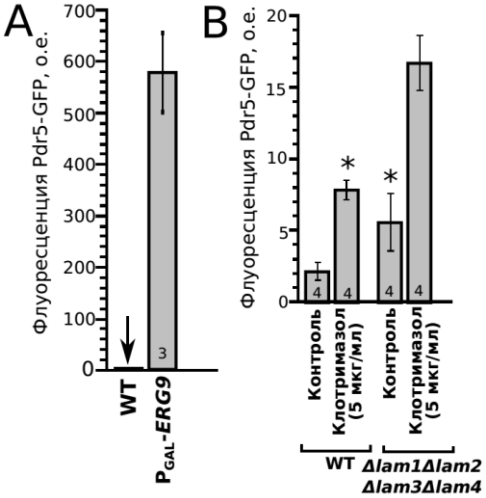

Рисунок 9. Роль метаболизма и транспорта эргостерина в активации МЛУ. (A) Увеличение уровня Pdr5-GFP в клетках штамма с нарушением синтеза эргостерина за счет репрессии белка Erg9, среднее значение ± стандартная ошибка среднего, n=3. (B) Увеличение уровня Pdr5-GFP в клетках штамма с нарушением транспорта эргостерина за счет делеции генов *LAM*. *P value = 0,057, сравнение с диким типом, рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони.

Так как накопление Pdr5-GFP в клетках происходит не во всех вариантах нарушения биосинтеза эргостерина, возможно, индукция системы МЛУ осуществляется за счет накопления конкретного интермедиата метаболизма,

который наравне с чужеродными соединениями способен индуцировать гены ABC-переносчиков. При этом делеция некоторых генов, например, гена стерин C-5 десатуразы Erg3p, препятствует накоплению этого интермедиата.

Таким образом, проведенный нами анализ показал, что нарушение биосинтеза эргостерина само по себе может быть стимулом, вызывающим в клетке активацию систем МЛУ, даже в отсутствие ксенобиотика. Одновременно с нашей работой, в соответствии с нашими наблюдениями на *S.cerevisiae,* было показано, что в клетках *C.glabrata* транскрипционный фактор Upc2, способен активировать гены *PDR1* и *CDR1* в ответ на дефицит эргостерина в клетке (Vu et al., 2019). В совокупности, полученные нами данные демонстрируют вырожденность механизмов, а следовательно и высокую надежность, регуляции МЛУ в клетках дрожжей.

ВЫВОДЫ

1. Липофильные катионы являются одновременно конкурентными ингибиторами и индукторами множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) в клетках дрожжей *S.cerevisiae* и *C.glabrata*. Ингибирующий и активирующий эффекты разнесены во времени.
2. Додецил-трифенилфосфоний (C_{12}TPP) вызывает транскрипционный ответ, опосредованный Pdr1 и приводящий к активации системы МЛУ дрожжей *S.cerevisiae* независимо от функционирования Rtg-сигнального пути и транскрипционного фактора Pdr3.
3. Репрессия гена *PET9* (*AAC2*) блокирует обмен адениновых нуклеотидов между матриксом митохондрий и цитоплазмой, но не препятствует активации системы МЛУ под действием C_{12}TPP в клетках дрожжей *S.cerevisiae*.
4. В отличие от липофильных катионов, перекись водорода активирует МЛУ независимо от наличия гена транскрипционного фактора *PDR1*. Липофильные катионы и перекись водорода активируют экспрессию гена Yap1p-зависимого MFS-переносчика *FLR1* в клетках дрожжей *C. glabrata*.
5. Низкомолекулярные антиоксиданты препятствуют активации МЛУ в клетках дрожжей *C. glabrata* при условии делеции гена ключевого неспецифического

АВС-переносчика *CDR1*. Наличие редокс-регуляции МЛУ у *C.glabrata* предполагает вырожденность путей активации системы МЛУ и, следовательно, устойчивость механизмов регуляции к внешним воздействиям.

6. Нарушения биосинтеза и транспорта эргостерина в клетках дрожжей *S.cerevisiae* приводят к избыточному накоплению в них Pdr5-GFP и изменяют чувствительность системы активации МЛУ к липофильным катионам.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Karavaeva I.E., **Shekhireva K.V.**, Severin F.F., Knorre D.A., “Does mitochondrial fusion require transmembrane potential?”, 2015, *Biochemistry (Moscow)*, том 80, № 5, с. 549-558. IF=1,886
2. Azbarova A.V., **Galkina K.V.**, Sorokin M.I., Severin F.F., Knorre D.A., “The contribution of Saccharomyces cerevisiae replicative age to the variations in the levels of Trx2p, Pdr5p, Can1p and Idh isoforms”, 2017, *Scientific Reports*, том 7, № 13220, с. 1-10. IF=4,011
3. **Galkina K.V.**, Besedina E.G., Zinovkin R.A., Severin F.F., Knorre D.A., “Penetrating cations induce pleiotropic drug resistance in yeast”, 2018, *Scientific Reports*, том 8, № 8131, с. 1-11. IF=4,011
4. **Galkina K.V.**, Okamoto M., Chibana H., Knorre D.A., Kajiwara S., “Deletion of CDR1 reveals redox regulation of pleiotropic drug resistance in Candida glabrata”, 2020, *Biochimie*, № 170, с. 49-56. IF=3,362
5. Sokolov S.S., Vorobeva M.A., Smirnova A.I., Smirnova E.A., Trushina N.I., **Galkina K.V.**, Severin F.F., Knorre D.A., “LAM Genes Contribute to Environmental Stress Tolerance but Sensibilize Yeast Cells to Azoles”, 2020, *Frontiers in Microbiology*, том 11, № 38, с. 1-14. IF=4,076
6. **Galkina K.V.**, Zyrina A.N., Golyshev S.A., Kashko N.D., Markova O.V., Sokolov S.S., Severin F.F., Knorre D.A., “Mitochondrial dynamics in yeast with repressed adenine nucleotide translocator AAC2”, 2020, *European Journal of Cell Biology*. IF=3,024