

УДК 579.258+579.222

ИНДУКЦИЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

© 2024 г. Е. Н. Бирюкова^{а, *}, А. Ю. Аринбасарова^а, А. Г. Меденцев^а

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Московская обл., Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

*e-mail: biryukovae05@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.06.2024 г.

После доработки 15.07.2024 г.

Принята к публикации 16.07.2024 г.

Впервые показано, что при стрессовых воздействиях у дрожжей *Yarrowia lipolytica* наряду с антиоксидантными ферментами проявляется активность алкогольдегидрогеназы. При росте на глюкозе в процессе перехода дрожжей из экспоненциальной в стационарную фазу роста, обусловленного истощением глюкозы, обнаружена способность клеток к окислению этанола. В условиях окислительного и теплового стрессов индукция алкогольдегидрогеназы сопряжена с увеличением активности антиоксидантных ферментов, в частности каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатион редуктазы. Показано снижение внутриклеточного уровня АТФ и цАМФ у *Y. lipolytica* при различных стрессовых воздействиях, что коррелирует с увеличением активности антиоксидантных систем и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, дрожжи, стресс, биосинтез

DOI: 10.31857/S0026365624060182

В природных экосистемах микроорганизмы постоянно подвергаются влиянию различных неблагоприятных факторов внешней среды. К ним относят широкий спектр воздействий, приводящих к снижению и прекращению роста, включая переход дрожжей из фазы экспоненциального роста в стационарную, обусловленный истощением глюкозы (Temple et al., 2005, 2022; Janapala et al., 2019), окислительный, тепловой и другие стрессы (Belazzi, 1991; Hollenstein et al., 2021; Guzikowski et al., 2022). Кроме того, также к стрессовым воздействиям относят локальное воздействие этанола. Этанол, являясь короткоцепочечным спиртом, может легко проникать в липидный бислой биологических мембран и вызывать их “дезорганизацию”. Повышенная чувствительность клеток дрожжей по отношению к спиртам и альдегидам является не только результатом нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза, вызванного индукцией окислительного стресса, но и следствием дисбаланса между пиридиннуклеотидными кофакторами (Kwolek-Mirek et al., 2022). Поэтому можно считать, что индукция и наличие фермента НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы у *Yarrowia*

lipolytica позволит клеткам быстро снижать содержание этанола и избегать его нежелательных воздействий.

В процессе эволюции путем развития адаптивных реакций грибы и дрожжи проявили удивительную способность к выживанию и развитию в неблагоприятных условиях. К адаптивным реакциям относят индукцию ферментов, участвующих в детоксикации вредных метаболитов: активных форм кислорода (каталазы, супероксид-дисмутазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, тиоредуктазы), а также энзимов, поставляющих восстановленные пиридиннуклеотиды, глутатион и др.

У грибов и дрожжей сигнал на стресс состоит из модуля активируемой митогеном протеинкиназы К (МАРК). После запуска каскада фосфорилирования сигнал индуцирует экспрессию генов, связанных с синтезом белков и специфических молекул, которые используются грибами для лучшей конкуренции в окружающей среде. Эти молекулы обычно определяются как вторичные метаболиты, такие как меланины, микотоксины и антибактериальные соединения.

Цель данной работы — исследовать динамику внутриклеточного содержания адениновых нуклеотидов и цАМФ как основных факторов, контролирующих действие защитных механизмов у дрожжей *Y. lipolytica*, а также определить участие основных антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы) и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы в защите клеток от стрессовых воздействий.

В работе изучали дрожжи *Y. lipolytica* ВКМ Y-2378 (syn. *Yarrowia lipolytica* Y-155), полученные из ВКМ ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН.

Культивирование осуществляли при 29°C в колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды Ридер с глюкозой (1%) или с этанолом (1%) на качалке (200 об./мин). Рост дрожжей оценивали по оптической плотности при длине волны 540 нм.

Стрессовые условия были смоделированы путем инкубации клеток экспоненциальной фазы роста в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7.2) при температуре 37°C, либо путем обработки в присутствии 0.5 мМ H₂O₂.

Для получения бесклеточного экстракта клетки дрожжей, выращенных на глюкозе или этаноле, дважды промывали дистиллированной водой и суспендировали в 50 мМ *трис*-фосфатном буфере (pH 7.0), содержащем 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторид (ингибитор протеаз), после чего разрушали на прессе Френча. Гомогенат центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин. Активность ферментов определяли в осадке и супернатанте.

Активность алкогольдегидрогеназы определяли по скорости потребления кислорода клетками в присутствии этанола на полярографе с помощью закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода типа Кларка и спектрофотометрически по восстановлению НАД⁺, при 340 нм. Среда измерения содержала *трис*-фосфатный буфер (50 мМ; pH 8.8), НАД⁺ (200 мкМ) и этанол (50 мМ). Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мг белка.

Экстракцию адениновых нуклеотидов и цАМФ из клеток дрожжей осуществляли 5%-ой хлорной кислотой. Для этой цели 4.5 мл клеточной суспензии, отобранной непосредственно из колбы, вносили в пробирку, содержащую 0.5 мл 50%-ой хлорной кислоты, тщательно перемешивали и инкубировали на ледяной бане. Экстракт нейтрализовали 5 н КОН при интенсивном перемешивании. Осадок удаляли центрифугированием при 15000 g, 60 мин. Экстракт хранили при –15°C. Концентрации АТФ, АДФ, АМФ определяли на флуориметре MPF-4 (“Hitachi”, Япония) по флуоресценции НАД(Ф)Н с гексокиназой, пируваткиназой и миокиназой. Определение цАМФ проводили по стандартной методике, используя набор фирмы “Amersham”.

Активность СОД (супероксиддисмутазы) определяли по ингибированию восстановления 10 мкМ цитохрома *c* (при 550 нм) в присутствии 0.5 мМ ксантина и 0.5 Е ксантиноксидазы. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее 50% ингибирование скорости восстановления цитохрома *c*.

Активность каталазы оценивали по изменению поглощения H₂O₂, E₂₄₀ = 0.32 мМ⁻¹ см⁻¹. Среда измерения содержала *трис*-фосфатный буфер (50 мМ; pH 7.0) и H₂O₂ (25 мМ).

Активность глутатионредуктазы измеряли по убыли НАДФН в присутствии окисленного глутатиона, E₃₄₀ = 6.22 мМ⁻¹ см⁻¹. Среда измерения содержала *трис*-фосфатный буфер (50 мМ; pH 7.0), НАДФН (0.15 мМ), MgCl₂ (3 мМ), окисленный глутатион (10 мМ). Концентрацию белка определяли с помощью биуретового реактива.

При исследовании дыхательной активности *Y. lipolytica* в процессе перехода из экспоненциальной фазы роста в стационарную, обусловленном истощением глюкозы, нами обнаружена способность клеток к окислению этанола.

Как видно на рисунке, у клеток из экспоненциальной фазы роста не было алкогольоксидазной активности (кривая 1), тогда как клетки из стационарной фазы в ответ на добавление этанола увеличивали скорость потребления кислорода почти в 4 раза (кривая 2).

Наши дальнейшие исследования показали, что различные стрессовые воздействия на клетки из экспоненциальной фазы роста также не приводят к развитию у *Y. lipolytica* способности к окислению этанола. Так предобработка клеток, собранных в экспоненциальной фазе роста, малой дозой H₂O₂ (0.5 мМ, 60 мин) или инкубация при 37°C в течение 60 мин также приводили к появлению у *Y. lipolytica* способности к окислению этанола (рисунок, кривые 2 и 3). Следовало ожидать, что активность алкогольдегидрогеназы в клетках может быть более высокой при выращивании на этаноле. Действительно, клетки *Y. lipolytica*, выращенные на этаноле, показали заметно более высокую скорость окисления этанола (рисунок, кривая 5).

Одновременное появление способности клеток *Y. lipolytica* к окислению этанола при их переходе в стационарную фазу роста, а также после стрессовых воздействий, приводят к активации антиоксидантных ферментов, в частности каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и глутатионредуктазы (табл. 1).

Известно, что в условиях окислительного стресса для сохранения жизнеспособности клеток резко возрастает их потребность в восстановительных эквивалентах (NAD(P)H, восстановленного глутатиона) (Minard, McAlister-Henn, 2005; Minard et al., 2007). Нами установлено (табл. 1),

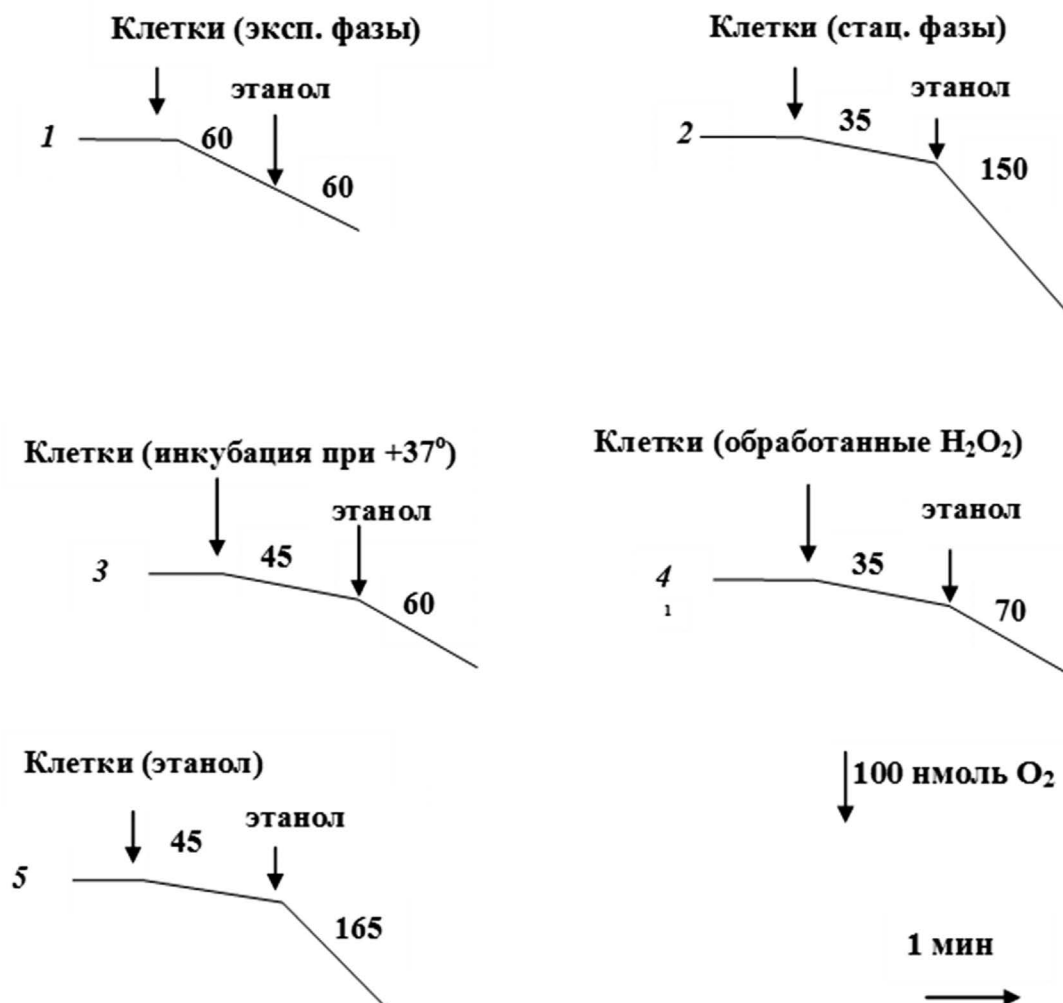


Рисунок. Окисление этанола клетками *Y. lipolytica* при росте на глюкозе и этаноле: 1 – из экспоненциальной фазы роста (эксп.); 2 – из стационарной фазы роста (стац.); 3 – обработанные 0.5 мМ H_2O_2 ; 4 – инкубированные при 37°C, 60 мин; 5 – выращенные на этаноле. Цифрами на кривых указана активность потребления кислорода, нмоль O_2 /мин/мг сухих клеток.

что уровень активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и глутатионредуктазы в клетках увеличивался более чем в 2 раза, как при переходе из экспоненциальной фазы роста в стационарную (убыль глюкозы), так и в условиях теплового (37°C, 60 мин) и окислительного стрессов (обработка 0.5 мМ H_2O_2 , 60 мин).

Для выявления возможного механизма появления алкогольдегидрогеназной активности у *Y. lipolytica* была изучена динамика содержания в клетках адениновых нуклеотидов и цАМФ в условиях теплового стресса (инкубация при 37°C, 60 мин) (табл. 2). Оказалось, что в процессе инкубации наблюдается заметное снижение содержания АТФ, АДФ и цАМФ.

Известно, что уровень цАМФ в клетке определяется соотношением активностей аденилатциклазы

(синтез цАМФ) и фосфодиэстеразы (распад цАМФ). В стрессовых условиях, когда в клетках наблюдается снижение содержания АТФ, отмечается падение активности аденилатциклазы и стимуляция фосфодиэстеразы (Belazzi, 1991; Janapala et al., 2019; Yaakoub et al., 2022), что приводит в конечном итоге к падению уровня цАМФ.

Действие цАМФ (с участием цАМФ-зависимой протеинкиназы А) на стрессовые гены связано с наличием регуляторной последовательности CREs (cAMP-responsive elements) (Belazzi, 1991). У эукариотных микроорганизмов эта последовательность действует как “выключатель” определенных защитных генов при высокой концентрации глюкозы и повышенном уровне АТФ и цАМФ.

Таблица 1. Активность антиоксидантных ферментов и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы *Y. lipolytica* в стрессовых условиях (представлены средние данные трех независимых определений)

Условия, фаза роста культуры	Активность, мкмоль/мин на 1 мг белка				
	Каталаза	СОД	НАД ⁺ -зависимая алкогольдегидрогеназа	Глутатионредуктаза	Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа
Клетки экспоненциальной фазы роста	28.0 ± 1.3	4.2 ± 0.45	1.2 ± 1.2	24.1 ± 2.1	70 ± 4.1
Клетки стационарной фазы роста	75.0 ± 4.3	8.4 ± 1.1	120 ± 10.0	69.2 ± 1.3	110 ± 5.3
Клетки экспоненциальной фазы роста, обработка H ₂ O ₂ (0.5 мМ, 60 мин)	93.0 ± 0.5	6.5 ± 0.7	116.0 ± 10.9	58.1 ± 6.4	120 ± 5.8
Клетки экспоненциальной фазы роста, инкубация (37°C, 60 мин)	120.0 ± 1.6	21.6 ± 2.3	99 ± 2.1	66.3 ± 7.6	105 ± 4.8

Таблица 2. Содержание адениновых нуклеотидов и цАМФ в клетках *Y. lipolytica* в условиях теплового стресса (инкубация при 37°C, 60 мин); представлены средние данные трех независимых определений

Условия инкубации клеток, 37°C	Содержание адениновых нуклеотидов и цАМФ, нмоль/мг сухих клеток			
	цАМФ	АТФ	АДФ	АМФ
0 мин	4.2 ± 0.2	7.0 ± 0.7	2.10 ± 0.2	0.75 ± 0.08
30 мин	3.4 ± 0.2	5.0 ± 0.5	1.55 ± 0.2	0.65 ± 0.07
60 мин	2.8 ± 0.12	4.0 ± 0.4	1.30 ± 0.12	0.50 ± 0.06
90 мин	2.6 ± 0.1	3.5 ± 0.3	0.85 ± 0.1	0.40 ± 0.045
120 мин	2.5 ± 0.2	3.3 ± 0.3	0.80 ± 0.1	0.40 ± 0.05

После исчерпания глюкозы и снижения уровня АТФ и цАМФ происходит дефосфорилирование белка CREB. Этот белок диссоциирует от элемента CRE, в результате чего происходит активация транскрипции генов и синтезом защитных белков. В настоящее время у грибов известно более 5 белков, транскрипция генов которых регулируется цАМФ по отрицательному (негативному) механизму. Учитывая особенности действия цАМФ у дрожжей как негативного фактора транскрипции ряда генов (Belazzi, 1991; Janapala et al., 2019; Yaakoub et al., 2022), можно полагать, что именно снижение уровня этого метаболита приводит к включению единого центра, ответственного за синтез и функционирование защитных белков, включая активности ферментов антиоксидантной системы и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы. Однотипность стрессового ответа при воздействии различных негативных факторов является доказательством наличия у дрожжей общего центра активации защитных механизмов для повышения устойчивости клеток (Thevelein, 1994; Emri et al., 2022). Оценивая наличие активности алкогольдегидрогеназы

в комплексном ответе клеток на окислительный и другие стрессы, необходимо отметить, что этанол и другие короткоцепочечные спирты могут легко проникать в липидный бислой биологических мембран и вызывать дезорганизацию внешней и внутренней мембраны (Minard et al., 2007). Поэтому можно предположить, что наличие фермента позволяет клеткам дрожжей быстро снижать содержание этанола и избегать нежелательных последствий его воздействия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Belazzi T.* Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 585–592.
- Emri T., Forgács K., Pócsi I.* Combinatorial stress responses in fungi // *Biologia Futura.* 2022. V. 73. P. 207–217.
- Guzikowski A.R., Harvey A.T., Zhang J., Zhu S., Begovich K., Cohn M.H., Wilhelm J.E.* Differential translation elongation directs protein synthesis in response to acute glucose deprivation in yeast // *Zid. BM. RNA Biol.* 2022. V. 19. P. 636–649.
- Hollenstein D.M., Gérecová G., Romanov N., Ferrari J., Veis J., Janschitz M., Beyer R., Schüller C., Ogris E., Hartl M., Ammerer G., Reiter W.* A phosphatase-centric mechanism drives stress signaling response // *EMBO Rep.* 2021. V. 22. Art. 52476.
- Janapala Y., Preiss T., Shirokikh N.E.* Control of translation at the initiation phase during glucose starvation in yeast // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. Art. 4043.
- Kwolek-Mirek M., Bednarska S., Dubicka-Lisowska A., Maslanka R., Zadrag-Tecza R., Kaszycki P.* Unbalance between pyridine nucleotide cofactors in the SOD1 deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes hypersensitivity to alcohols and aldehydes // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 24. Art. 659.
- Minard K.I., Carroll C.A., Weintraub S.T., McAlister-Henn L.* Changes in disulfide bond content of proteins in a yeast strain lacking major sources of NADPH // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 42. P. 106–117.
- Minard K.I., McAlister-Henn L.* Sources of NADPH in yeast vary with carbon source // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 39890–39896.
- Temple M.D., Perrone G.G., Dawes I.W.* Complex cellular responses to reactive oxygen species // *Trends Cell Bio.* 2005. V. 15. P. 319–326.
- Thevelein J.M.* Signal transduction in yeast // *Yeast.* 1994. V. 10. P. 1753–1790.
- Yaakoub H., Mina S., Calenda A., Bouchara J.P., Papon N.* Oxidative stress response pathways in fungi // *Cell Mol. Life Sci.* 2022. V. 79. Art. 333.

SHORT COMMUNICATIONS

Induction of Alcohol Dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* Yeast under Stress Conditions

E. N. Biryukova^{1, *}, A. Yu. Arinbasarova¹, A. G. Medentsev¹

¹Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

*e-mail: biryukovae@rambler.ru

It has been shown for the first time that under stress conditions, the yeast *Yarrowia lipolytica* exhibits activity of alcohol dehydrogenase along with antioxidant enzymes. During growth on glucose, during the transition of yeast from the exponential to the stationary growth phase, caused by glucose depletion, the ability of cells to oxidize ethanol was detected. Under conditions of oxidative and thermal stress, the induction of alcohol dehydrogenase is associated with an increase in the activity of antioxidant enzymes, in particular, catalase, superoxide dismutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase. A decrease in the intracellular level of ATP and cAMP in *Y. lipolytica* under various stress conditions was shown, which correlates with an increase in the activity of antioxidant systems and NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase.

Keywords: alcohol dehydrogenase, yeast, stress, biosynthesis