

СУ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
„КАТЕДРА ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ”



ДАФИНКА ИВАНОВА КОЛЕВА
РЕГУЛАЦИЯ И ЕКСПРЕСИЯ НА ГЕНИ ОТ
АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА ПРИ ДРОЖДИ С
РАЗЛИЧЕН ТИП МЕТАБОЛИЗЪМ

АВТОРЕФЕРАТ

*на дисертационен труд
за присъждане на научна и образователна степен „доктор”*

Научен ръководител
Доц. д-р А. Куюмджиева
Научен консултант:
д-р В. Петрова
Ръководител на катедра
Доц. д-р П. Мончева

София 2012

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

1. Използвани съкращения на кирилица:

АТФ –	Аденозин Три Фосфат
АСВ -	Абсолютно сухо вещество
ЕДТА –	Етил Диамин Тетраоцетна киселина
МЕ -	Меркаптоетанол
НАД(Ф)Н –	Никотинамид Аденин Флавин Динуклеотид
НАДФ –	Никотинамид Аденин Динуклеотид Фосфат
НБПМКК –	Национална Банка за Промислени Микроорганизми и Клетъчни
ПААГЕ –	Полиакриламидна гел електрофореза
СОД –	Супероксид дисмутаза
ТЕМЕД –	Тетраметилетилендиамин

2. Използвани съкращения на латиница:

ADH -	Алкохол дехидрогеназа
ACP –	Ацил-пренасящ белтък
AOX -	Алкохол оксидаза
BLAST –	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
CAT -	Каталаза
DAB –	Диаминобензидин
DAS -	Дихидроксиацетон синтаза
DNS –	Динитро салицилова киселина
EDTA –	Етилен диамин тетраоцетна киселина
FDH -	Формалдехид дехидрогеназа
FMD -	Формиат дехидрогеназа
GHS -	Глутатион
GPx –	Глутатион пероксидаза
GRX -	Глутаредоксин
GST -	Глутатион S-трансфераза
Met –	Метионин
MOX -	Метанол оксидаза

NBT –	Нитоблитеразолиева сол
NLS -	Сигнал за локализация в ядрото
Nramp –	<u>N</u> atural <u>R</u> esistance <u>A</u> ssociated <u>M</u> acrophage <u>P</u> rotein
OD -	Оптична плътност
PCR –	Полимеразна верижна реакция
PTS -	Сигнал за локализация в пероксизомите
Rb –	Рибофлавин
Rf –	електрофоретична подвижност
ROS –	Реактивни кислородни видове
SDS –	Натриев додецил сулфат
TAG –	Триацил глицерол

*Наименованията на използваните щамове, за краткост са описани само с видовите имена:

***Saccharomyces cerevisiae* НБПМКК 583**

***Kluyveromyces marxianus* НБПМКК 8263**

***Hansenula polymorpha* CBS 4732**

***Pichia pini* 77-1**

***Rhodotorula glutinis* НБПМКК 1454**

УВОД

Атмосферният кислород е жизнено необходим за всички аеробни организми. Неговите редуцирани междинни форми могат да бъдат токсични за тях, предизвиквайки директно или индиректно увреждания в живите клетки, като нарушават структурата и влияят върху функцията на макромолекулите. Основни клетъчни източници за генериране на кислородни радикали са електронтранспортните вериги в митохондриите и оксигеназните ензими в пероксизомалните мембрани. В допълнение към клетъчните източници на свободни радикали, са известни голям брой извънклетъчни индуктори на оксидативен стрес: паракват, дикват, алоксин, доксорубицин, менадион, хинонови съединения както и лекарствени препарати, и някои фунгициди.

Изследване на молекулярните механизми на стресовия отговор и особено влиянието на оксидативния стрес върху живата клетка е особено актуално в съвременната биология. Една от основните хипотези обясняващи процесите на клетъчно стареене, развитието на някои тежки заболявания като рак, Алцхаймер и др. при човека е свързана с т. н. „теория на свободните радикали”. Тя предполага, че тези процеси са резултат от несъвършената защита на клетките срещу повредите на деликатните клетъчни структури, предизвикани от свободни радикали.

Един от основните модели използвани за изучаване на механизмите на свободно – радикалови увреждания са дрождите – едноклетъчни еукариотни микроорганизми. Лесното им култивиране и крайната им репликативна продължителност на живот, водеща до остаряване и клетъчна смърт позволява отчитане на влиянието на различни ендо и екзогенни оксиданти и антиоксиданти. Способността им да усвояват голям брой традиционни (захари) и нетрадиционни субстрати (алканони) се използва за изучаване на молекулните механизми на клетъчния отговор и регулацията на антиоксидантната клетъчна защита при условията на оксидативен стрес. Чрез използване на различни молекулярни подходи се изследва вътреклетъчната локализацията на ензимите супероксиддисмутаза и каталаза при различен метаболитен статус на културата, като се създава модел за регулация на кооперативното действие на тези ензими в различните клетъчни структури.

Тези изследвания ще допринесат за изясняване на някои механизми на клетъчен отговор на нарушаването на свободнорадикаловата хомеостаза в еукариотната клетка.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Охарактеризиране на основни белтъци от ензимната и не-ензимната антиоксидантната защитна система при дрожди с различен тип метаболизъм чрез биоинформатични и биохимични подходи.

За постигане на тази цел, бяха формулирани следните задачи:

1. Да се проведе сравнителен *in silico* анализ на гени, участващи в антиоксидантната клетъчна защита при ферментативни (р. *Saccharomyces*), респираторни (р. *Kluyveromyces* и р. *Pichia*) и облигатнооксидативни (р. *Cryptococcus*) дрожди.
2. Да се изследва наличието на гени-ортолози, кодиращи ензимите супероксиддисмутаза, каталаза, цитохром С пероксидаза, глутатион пероксидаза и тиоредоксин пероксидази, както и на белтъците участващи в глутатионовия метаболизъм.
3. Да се проведе *in silico* анализ на вътреклетъчната локализация на изследваните ензими при ферментативни, респираторни и дрожди с оксидативен тип метаболизъм.
4. Да се изследва нивото на експресия и специфичните изоензимни профили на СОД и каталаза при ферментативни, респираторни и дрожди с окислителен тип на метаболизъм.
5. Да се изучи влиянието на въглеродния метаболизъм върху експресията на СОД и каталаза при ферментативни, респираторни и дрожди с оксидативен тип метаболизъм.
6. Да се изследва устойчивостта към повишени температури и концентрации на редуциращи агенти върху стабилността на СОД и каталаза при избрани щамове дрожди.

1. *In silico* модел за отговор при оксидативен стрес на респираторни и оксидативни дрожди

Съвременните постижения на експерименталната и компютърна биология позволяват изучаването на комплексни проблеми в областта на еволюцията на биологичната адаптация и отговора на стресови условия. На основата на съществуващата зависимост между метаболитните пътища и оксидативния стрес, е удачно създаването на *in silico* модел за изучаване на регулаторните механизми на оксидативния стрес при респираторни и оксидативни дрожди, разгледан в сравнителен аспект с ферментативния моделен обект *S. cerevisiae*. В основата на този модел стои създаване на биоинформатичен алгоритъм за изследване на гените, отговарящи за антиоксидантната защита на дрождевата клетка, който включва:

- идентифициране на единичните и дуплицирани гени, кодиращи ключови ензими от антиоксидантната защитна система при дрожди;
- определяне консервативността на белтъчните последователности, причисляващи ги към фамилията гени, свързани с отговора към оксидативен стрес
- установяване на сигналните последователности на изследваните белтъци, даващи им възможност за насочване към различни клетъчни участъци.

Сравнителният анализ на съвкупността от тези биоинформатични данни ще предостави възможност за опознаване и интерпретация на различни оксидативни събития, протичащи при стресови условия в еукариотната клетка.

Във връзка с това беше изследвана пълната геномна последователност на ферментативни (р. *Saccharomyces*) и респираторни дрожди, принадлежащи към родовете *Kluyveromyces* и *Pichia* и на дрожди с оксидативен тип метаболизъм, принадлежащи към род *Cryptococcus*. Това позволи намирането на предполагаеми ортолози на гените на *S. cerevisiae*, отговорни за детоксикацията на Реактивни Кислородни Видове (Reactive Oxygen Species, ROS) в клетката. Изследванията бяха проведени върху гените, кодиращи ензимите супероксид дисмутаза, каталаза, цитохром С пероксидаза, глутатион пероксидаза и тиоредоксин пероксидази, както и върху белтъците участващи в глутатионовия метаболизъм.

1.1. Супероксид дисмутази

Известно е, че дрождите *S. cerevisiae* експресират две форми на супероксид дисмутазни ензими: Mn СОД, кодирана от гена *SOD2*, локализирана в

митохондриалния матрикс и пероксизомите, и Cu/Zn СОД, кодирана от гена *SOD1*, налична в цитозола и в интермембранното митохондриално пространство. Двата гена не се разглеждат като хомоложни, тъй като кодираните от тях ензими нямат сходство в аминокиселинните си последователности. Анализът на генома на *K. lactis* и *P. pastoris* показва, че гените *SOD1* и *SOD2*, описани при *S. cerevisiae*, имат съответните ортолози при тези дрожди. Степента им на хомоложност с ферментативните представители е 65 – 73 % за Mn СОД и 70 - 75 % за Cu/Zn СОД (**таблица 1**). Анализът на вътреклетъчната локализация на тези два белтъка при респираторните дрожди показва, че подобно на *S. cerevisiae* Mn СОД притежава типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване на 31-ва (за *K. lactis*) и 34-та (за *P. pastoris*) позиция (**таблица 1**). Cu/Zn СОД при *K. lactis* и *P. pastoris* също притежава типичната за този ензим клетъчна локализация в цитозола. Подобно на *S. cerevisiae* при *K. lactis*, белтъчните молекули нямат сигнал за импорт в тези органели. При *P. pastoris* обаче, е установено, че Cu/Zn СОД притежава Гавел последователност за срязване на 19-та позиция, което вероятно улеснява насочването на белтъка към интермембранното митохондриално пространство (**таблица 1**).

Резултатите от сравнителния анализ на първичната структура на белтъците потвърди, че и при двата щамове респираторни дрожди основните аминокиселинни остатъци, отговорни за активността и връзката с металния кофактор (Cu^{2+}), са силно консервативни. *In silico* анализ на аминокиселинните последователности на Mn СОД и Cu/Zn СОД при оксидативния тип *C. neoformans* отново не показва наличие на сходство между двете секвенции. Следователно, те също не могат да се разглеждат като гени - паралоли. Сравнението с аминокиселинните последователности на *S. cerevisiae* показва 43 % хомоложност за Mn СОД и 60 % за Cu/Zn СОД, което дава основание да се твърди, че гените кодиращи тези ключови антиоксидантни ензими при двата метаболитно различни дрождеви щамове, са ортолози. Cu/Zn СОД при *C. neoformans* притежава типичната за този ензим клетъчна локализация в цитозола. *In silico* анализът на Mn СОД, показва Гавел последователност за срязване на 36-та позиция и клъстер от позитивно заредени аминокиселини. Наличието на типичен N-краен митохондриален сигнал при всички изследвани щамове, предполагащ локализация на изучавания белтък в дрождевите митохондрии, е доказателство за важната роля, която Sod2 изпълнява в защитата на клетките срещу супероксидни йони, генерирани в митохондриалните електрон-транспортни вериги.

Микроорганизъм	Брой гени	Ензим	Локус	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите паралоли	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>S. cerevisiae</i>	2	Cu/Zn СОД <i>SOD1</i>	YJR104C (X chr)	100 %	Няма сходство		• Цитозол (65.2 %)
		Mn СОД <i>SOD2</i>	YHR008C (VIII chr)	100 %			• Митохондриален матрикс - Гавел R 2 последователност за срязване в 35-та позиция (RRTIKV) (43.5%) • Пероксизоми PTS1 (С-краен GKI) (30.4%)
<i>K. lactis</i>	2	Cu/Zn СОД	KLLA0E05567g (V chr)	70 %	Няма сходство	Sc = 229 bits (585), Ex = $1e^{-65}$, Id = 108/154 (70%), Pos = 124/154 (80%), G = 0/154 (0%)	• Цитозол (65.2 %)
		Mn СОД	KLLA0E03609g (V chr)	73 %			• Митохондриален матрикс - Гавел R 2 последователност за срязване в 31-ва позиция (KRTIKV)(69.6%)
<i>P. pastoris</i>	2	Cu/Zn СОД	chr1-1_0275 (chr I)	75 %	Няма сходство	Sc = 238 bits (606), Ex = $5e^{-68}$, Id = 114/152 (75%), Pos = 129/152 (84%), G = 0/152 (0%)	• Цитозол (60.9%) • Митохондрии Гавел R 2 мотив на 19-та позиция (15.8%)
		Mn СОД	chr1-4_0071 (chr I)	65 %			• Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 34-та позиция (73.9%)
<i>C. neoformans</i>	2	Cu/Zn СОД	CNAG_01019.2 (V chr)	60 %	Няма сходство	Sc = 197 bits (500), Ex = $8e^{-56}$, Id = 93/153 (60%), Pos = 115/153 (75%), G = 0/153 (0%)	• Цитозол (60.9%)
		Mn СОД	CNAG_04388.2 (IX chr)	43 %			• Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 36-та позиция (91.3%)

Таблица 1. Изследване на сходството в аминокиселинните последователности (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за Cu/Zn СОД и Mn СОД в моделните дрождени щамове.

1.2. Каталази

Установено е, че в клетките на *S. cerevisiae* са налични два каталазни ензима, които катализират разграждането на водородния пероксид до вода и кислород. Двете изоформи каталаза А и каталаза Т се кодират от гените *CTA1* и *CTT1* и са с различна субклетъчна локализация: каталаза А в пероксизомите и митохондриите, а каталаза Т в цитозола. При сравнителния анализ на аминокиселинната последователност на каталаза А и каталаза Т в *S. cerevisiae* бе установено наличие на 39 % сходство, поради което гените, кодиращи тези ензими биха могли да бъдат приети за паралоги в рамките на вида (**таблица 2**).

Изследването на аминокиселинните последователности на каталаза А и каталаза Т с цел определяне на типични мотиви в секвенциите им, показва наличие на силно консервативен хем-свързващ регион в проксималния край на молекулата. Подобни региони са установени и при *K. lactis*, при който KLLA0D11660g е ортолог на *CTA1* в *S. cerevisiae* (с 80 % хомоложност, установена чрез BLASTp анализ), а KLLA0D14685g – на *CTT1* в *S. cerevisiae* (с 68 % хомоложност). Между двете каталазни изоформи на *K. lactis* е открито 43 % сходство в аминокиселинните им последователности, поради което кодиращите ги гени се приемат за паралоги (**таблица 2**). Въпреки високият процент хомоложност в аминокиселинните последователности на каталазните ензими при *S. cerevisiae* и *K. lactis* са открити и някои значителни разлики.

In silico анализът на генома на *P. pastoris* показва наличие на един ген, кодиращ каталазен ензим с 58 % хомоложност в аминокиселинната последователност с тази на *Cta1* на *S. cerevisiae* (**таблица 2**). Генът, кодиращ тази каталаза, може да се разглежда като ортолог на *CTA1* при *S. cerevisiae*.

Вътреклетъчната компартментализация на каталаза А при *K. lactis* и *P. pastoris* в пероксизомите както и при *S. cerevisiae* се определя от наличието на специфични сигнали, насочващи ензима към този органел (**таблица 2**). При *K. lactis* е установено наличие на АКІ сигнална последователност за насочване в пероксизомите. При *P. pastoris* сигналът е ARL. При същия щам е установена и предполагаема локализация на ензима в цитозола.

Микроорга низъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите паралози	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>S. cerevisiae</i>	2	Каталаза А <i>CTAI</i>	YDR256C (IV chr)	100 %	39 %		<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (56.5%) Пероксизоми - PTS1 сигнал (SKF) (17.4%)
		Каталаза Т <i>CTT1</i>	YGR088W (VII chr)	100 %			
<i>K. lactis</i>	2	Каталаза А ортолог	KLLA0D11660g (IV chr)	80 %	43 %	Sc = 867 bits (2241), Ex = 0.0, Id = 396/492 (80%), Pos = 441/492 (89%), G = 1/492 (0%)	<ul style="list-style-type: none"> Ядро (47.8%) Цитозол (17.4%) Пероксизоми - PTS1 сигнал (AKI) (8.7%)
		Каталаза Т ортолог	KLLA0D14685g (IV chr)	68 %			
<i>P. pastoris</i>	1	Каталаза А ортолог	chr2-2_0131 (II chr)	58 %	-	Sc = 591 bits (1523), Ex = $3e^{-173}$, Id = 291/494 (58%), Pos = 351/494 (71%), G = 23/494 (4%)	<ul style="list-style-type: none"> Пероксизоми PTS1 сигнал - ARL (62%) Цитозол (34.8%)
<i>C. neoformans</i>	4	Каталаза ортолог на Каталаза А при <i>S. cerevisiae</i>	CNAG_05256.2 (IV chr)	44 % сходство с Каталаза А 38 % сходство с Каталаза Т	33 % сходство с Каталаза А 34 % сходство с Каталаза 3 43 % сходство с Каталаза 4	Sc = 426 bits (1096), Ex = $8e^{-124}$ Id = 217/491 (44%), Pos = 310/491 (63%), G = 17/491 (3%) Sc = 362 bits (930), Ex = $1e^{-104}$, Id = 206/541 (38%), Pos = 290/541 (53%), G = 68/541 (12%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (52.2%) Пероксизоми – PTS2 насочващ сигнал RLGVNYQQL на 349-та позиция (8.7%)
		Каталаза А ортолог на Каталаза А при <i>S. cerevisiae</i>	CNAG_04981.2 (IVchr)	41 %	33 % сходство с Каталаза 79 % сходство с Каталаза 3 35 % сходство с Каталаза 4	Sc = 293 bits (749), Ex = $2e^{-83}$, Id = 155/378 (41%), Pos = 219/378 (57%), G = 14/378 (3%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (69,6%)
		Каталаза 3 ортолог на Каталаза Т при <i>S. cerevisiae</i>	CNAG_00575.2 (I chr)	36 % сходство с Каталаза Т 35 % сходство с Каталаза А	35% сходство с Каталаза 80 % сходство с Каталаза А	Sc = 241 bits (616), Ex = $6e^{-68}$ Id = 141/388 (36%), Pos = 207/388 (53%), G = 45/388 (11%) Sc = 229 bits (585), Ex = $2e^{-64}$, Id = 126/359 (35%), Pos = 190/359 (52%), G = 28/359 (7%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (73.9 %)
		Каталаза 4 ортолог на Каталаза Т при <i>S. cerevisiae</i>	CNAG_05015.2 (IV chr)	47 % сходство с Каталаза А 45 % сходство с Каталаза Т	43 % сходство с Каталаза 35 % сходство с Каталаза А	Sc = 442 bits (1136), Ex = $2e^{-128}$, Id = 240/501 (47%), Pos = 315/501 (62%), G = 23/501 (4%) Sc = 457 bits (1177), Ex = $4e^{-133}$, Id = 245/536 (45%), Pos = 319/536 (59%), G = 56/536 (10%)	<ul style="list-style-type: none"> Ядро (43.5 %) Митохондрии - Гавел R 3 последователност за срязване в 55-та позиция (30.5%) Цитозол (21.7%)

Таблица 2. Изследване на сходството в аминокиселинната последователност (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за каталаза в моделните дрождеви шамове.

In silico анализът на сходството в аминокиселинните последователности показва средно 42 % хомоложност в секвенциите на четирите каталазни ензима при *S. neoformans* и Cta1 при *S. cerevisiae* и 40 % хомология между Ctt1 и Cat1, Cat2, Cat3 и Cat4 (**таблица 2**). Тези данни сочат, че каталазните гени в двата типа дрожди могат да се разглеждат като ортолози.

Установено е, че четирите каталазни ензима при *S. neoformans* са локализиращи в цитозола. *In silico* анализът на каталаза А (кодирана от CNAG_05256.2) установи, наличие на PTS2 сигнал (RLGVNYQQL) с начало на 349-та позиция за пероксизомално насочване на ензима.

В аминокиселинната секвенция на каталаза 4, кодирана от CNAG_05015.2, е установена Гавел R 3 последователност за срязване в 55-та позиция: сигнал за насочване към митохондриите. Локализацията на ензима в този клетъчен органел е с вероятност от 30,5 %. Наличието на региони богати на основни бази, в нуклеотидната последователност е причина за ограничаване локализацията на каталаза 4 в ядрото с вероятност от 43,5 %.

Първичната структура на каталазните ензими при всички изследвани дрождени щамове, показва наличие на силно консервативни домени, отговорни за активността и връзката с металния кофактор – хем.

1.3. Пероксидази

1.3.1. Цитохром С пероксидаза

Клетките на *S. cerevisiae* съдържат една цитохром С пероксидаза, кодирана от гена *CCP1*, локализираща в единадесета хромозома (**таблица 3**). Наличието на клъстер от позитивно заредени аминокиселини в N края, Гавел R2 последователност за срязване в 53-та позиция предполага митохондриално насочване.

In silico анализът на генома на *K. lactis* установи наличие на една цитохром С пероксидаза, кодирана от KLLA0B07557g, локализираща във втора хромозома (**таблица 3**). Сравнението на аминокиселинните последователности на ензимите при *K. lactis* и *S. cerevisiae* чрез Blastp, показва 72 % хомоложност. Високият процент на сходство позволява да се допусне, че гените кодиращи цитохром С пероксидаза при двата щамове, са ортолози.

Сравнителният анализ на първичната структура на белтъците потвърди наличие на високо консервативни региони, определящи активния център на ензимната молекула. Получените резултати предполагат, че в процеса на еволюция дивергенцията

на гените, кодиращи цитохром С пероксидаза при *K. lactis* и *S. cerevisiae*, е била по-слаба и те са останали еволюционно близки.

В процеса на обезвреждане на водородния пероксид, генериран в резултат от метаболизма на токсичния субстрат метанол, в клетките на метилотрофните дрожди *P. pastoris* се индуцира каталаза и цитохром С пероксидаза. *In silico* анализът на генома на *P. pastoris* установи наличие на една цитохром С пероксидаза, кодирана от chr2-1_0115 (таблица 3).

Сравнителният анализ на CDS за ензима в геномите на *P. pastoris* и *S. cerevisiae* с помощта на Blastp показва наличие на 41 % сходство. Независимо от по – ниския процент на сходство, анализът на първичната структура на цитохром С пероксидазата при *P. pastoris* и *S. cerevisiae* потвърди висока хомоложност в архитектурата на домените, причисляващи изучавания ензим към класа на растителните хем пероксидази (фигура 1).



Фигура 1. Архитектура на домен, определящ цитохром С пероксидаза в *P. pastoris* като растителна хем пероксидаза.

Полученият резултат предполага и еволюционно сходство между гените, кодиращи цитохром С пероксидаза при *P. pastoris* и *S. cerevisiae*.

При анализа на вътреклетъчната локализация на глутатион С пероксидазите при дрождевите щамове с респираторен метаболизъм бе доказана локализация на ензима в цитозола. Установено бе също така, че цитохром С пероксидазата в *K. lactis* и *P. pastoris* притежава типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване съответно на 21-ва и 37-ма позиция (таблица 3). Изучаването на дрождевите цитохром С пероксидази продължи с прилагане на биоинформатични техники за определяне на хомолози на *CCPI* от *S. cerevisiae* в генома на *C. neoformans*. *C. neoformans* притежава два гена - паралоги, кодиращи цитохром С пероксидаза - CNAG_02147.2 и CNAG_01138.2, съответно в шеста и пета хромозома (таблица 3). Сравнителният анализ на аминокиселинните последователности на двата паралога показва 43 % хомоложност в секвенцията, както и наличие на високо консервативни региони, определящи активния център на ензимната молекула и висок процент сходство в архитектурата на домените, причисляващи изучавания ензим към класа на растителните хем пероксидази.

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S.</i>	Сходство (в %) между аминокиселините последователности на	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>S. cerevisiae</i>	1	Цитохром С пероксидаза <i>CCP1</i>	YKR066C (XI chr)	100 %	-		<ul style="list-style-type: none"> Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 53-та позиция, KRS SS (69.6%)
<i>K. lactis</i>	1	Цитохром С пероксидаза	KLLA0B07557g (II chr)	72 %	-	Sc = 431 bits (1107), Ex = 2e-125, Id = 201/276 (72%), Pos = 231/276 (83%), G = 1/276 (0%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (47.8%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 21-ва позиция (21.7%)
<i>P. pastoris</i>	1	Цитохром С пероксидаза	chr2-1_0115 (XI chr)	41 %	-	Sc = 194 bits (492), Ex = 6e-54, Id = 110/265 (41%), Pos = 150/265 (56%), G = 7/265 (2%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (34.8%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 37-ма позиция (30.4%)
<i>C. neoformans</i>	2	Цитохром С пероксидаза ортолог (2 паралога)	CNAG_02147.2 (VI chr)	35 %	43 % сходство между двата паралога	Sc = 171 bits (433), Ex = 3e-47, Id = 106/295 (35%), Pos = 148/295 (50%), G = 63/295 (21%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (47.8%) Пероксисоми – насочващ сигнал в C-края (AKL) (21.7%)
			CNAG_01138.2 (V chr)	40 %		Sc = 238 bits (608), Ex = 2e-67, Id = 143/353 (40%), Pos = 203/353 (57%), G = 26/353 (7%)	<ul style="list-style-type: none"> Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 41-ра позиция (82.6%) Цитозол (4.3%)

Таблица 3. Изследване на сходството в аминокиселинната последователност (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за цитохром С пероксидаза в моделните дрождени шамове.

Хомоложността между аминокиселинните секвенции на кодираните от CNAG_02147.2 и CNAG_01138.2 цитохром С пероксидази и *CCPI* при *S. cerevisiae* определена чрез Blastp е съответно 35 % и 40 %, което дава основание да се твърди, че въпросните гени при двата метаболитно различни дрождеви щама са ортолози.

Анализът на вътреклетъчната локализация на цитохром С пероксидазите при оксидативни дрожди показва, че подобно на *S. cerevisiae*, ензимът кодиран от CNAG_01138.2 притежава типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване на 41-ва позиция. (**таблица 3**).

Що се отнася до локализацията на ензима кодиран от CNAG_02147.2 в *S. neoformans*, бе установено наличие на AKL сигнална последователност за насочване към пероксизомите, съответно с 21,7 %, както и вероятна цитозолна локализация - 47,8 %.

1.3.2. Глутатион пероксидази

В клетките на *S. cerevisiae* е доказана експресията на три глутатион пероксидазни ензима: Gpx1, Gpx2 и Hup1 (Gpx3). Беце установено, че трите гена кодиращи глутатион пероксидази при *S. cerevisiae* са паралоли, със средно 65 % хомоложност в транслираните кодиращи ДНК последователности (**таблица 4**). Високият процент на сходство обуславя и сходните функции, които изпълняват тези ензими. Анализът на вътреклетъчното разпределение на изучаваните белтъци показва тяхната цитозолна локализация (**таблица 4**).

Геномният анализ на *K. lactis* показва наличие на два гена, кодиращи глутатион пероксидазни ензими - ортолози на глутатион пероксидазите в клетките на *S. cerevisiae* с различна степен на сходство. Най-висок процент хомоложност показва кодираният от KLLA0D06732g глутатион пероксидазен ензим: 80 % идентичност с Hup1 (Gpx3), 75 % с Gpx2 и 59 % с Gpx1. Продуктът на KLLA0D03905g, аотиран като Gpx2 белтък, е сходен с Gpx2 и Hup1 (Gpx3) (57 %) и Gpx1 (46 %) при *S. cerevisiae*. Установена е 76 % хомоложност между аминокиселинните последователности на двата паралога. Резултатите от анализа са доказателство за високия процент на сходство в структурата на гените при *K. lactis* и *S. cerevisiae*.

Анализът на първичната структура на глутатион пероксидазите при *K. lactis* и *S. cerevisiae* показва висок процент сходство в архитектурата на домените, определящи тези ензими към класа на глутатион пероксидазите (**фигура 2**).



Фигура 2. Архитектура на домен, причисляващ глутатион пероксидазите при *K. lactis* и *S. cerevisiae* към класа на глутатион пероксидазите.

Тези резултати предполагат еволюционно сходство между гените, кодиращи глутатион пероксидази при респираторни и ферментативни дрожди. Доказателство за това са данните, получени от сравнителния анализ на аминокиселинните последователности за глутатион пероксидазите в другия респираторен модел *P. pastoris*. При *P. pastoris* е установено наличие на ензим - тиолова пероксидаза, която функционира като хидропероксиден рецептор и осъществява връзка с транскрипционен фактор Уар1. Тази пероксидаза (анотирана като тиолова пероксидаза, функционираща като тиопероксиден рецептор) се кодира от chr2-2_0382 и BLASTр анализът показва хомоложност (средно 70 %) с Gpx1, Gpx2 и Hup1 в *S. cerevisiae* (**таблица 4**)

Подобно на ферментативните дрожди *S. cerevisiae*, глутатион пероксидазите при *K. lactis* и *P. pastoris* вътреклетъчната локализация на ензимите е в цитозола. Освен това, при метилотрофния щам са открити последователности за актин свързващи протеини, улесняващи насочването на глутатион пероксидазата към цитоскелета. Установени са и С–крайни дилизинови KKXX последователности за насочване към ендоплазматичния ретикулум (**таблица 4**).

Сравнителният анализ на първичната структура на белтъците потвърди, че при двата щам респираторни дрожди съществува висок процент сходство в архитектурата на домените, определящ изследваните ензими към класа на глутатион пероксидазите (**фигура 2**). Проведените изследвания при *P. pastoris* показаха наличие на високо консервативни региони, формиращи активния център на ензима. Такива региони са открити и при трите глутатион пероксидази при ферментативни дрожди.

In silico анализът на генома на *C. neoformans* показва наличие на два гена паралози, кодиращи глутатион пероксидазни ензими. Сходството в аминокиселинните последователности на белтъците, кодирани от CNAG_06287.2 (ортолог на *GPX1* в *S. cerevisiae*) и CNAG_02503.2 (ортолог на *GPX2*) е 49 %. (BLASTр анализ) Хомоложността с аминокиселинните секвенции на Gpx1 и Gpx2 при *S. cerevisiae* е средно 50 %.

Подобно на изучените респираторни дрожди *K. lactis* и *P. pastoris* в *C. neoformans* ензимите са с цитозолна локализация (**таблица 4**).

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите паралоги	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.j
<i>S. cerevisiae</i>	3	Глутатион пероксидаза <i>GPX1</i>	YKL026C (XI chr)	100 %	65 % сходство между <i>GPX</i> гените		• Цитозол (60.9 %)
		Глутатион пероксидаза <i>GPX2</i>	YBR244W (II chr)	100 %			• Цитозол (60.9)
		Глутатион пероксидаза <i>HYR1 (GPX3)</i>	YIR037W (IX chr)	100 %			• Цитозол (60.9 %)
<i>K. lactis</i>	2	Глутатион пероксидаза (<i>GPX2</i>) ортолог на <i>GPX2</i> , <i>GPX1</i> и <i>HYR1</i>	KLLA0D03905g (IV chr)	57 % сходство с <i>GPX2</i> и <i>HYR1 (GPX3)</i> 46 % сходство с <i>GPX1</i>	76 % сходство между <i>GPX2</i> и <i>GPX3</i>	Sc = 197 bits (502), Ex = 6e-56, Id = 92/160 (57%), Pos = 118/160 (73%), G = 0/160 (0%) Sc = 158 bits (400), Ex = 3e-44, Id = 77/164 (46%), Pos = 110/164 (66%), G = 0/164 (0%)	• Цитозол (65.2 %)
		Глутатион пероксидаза ортолог на <i>HYR1 (GPX3)</i> , <i>GPX2</i> и <i>GPX1</i>	KLLA0F06732g (VI chr)	80 % сходство с <i>HYR1 (GPX3)</i> 75 % сходство с <i>GPX2</i> 59 % сходство с <i>GPX1</i>			Sc = 276 bits (702), Ex = 3e-79, Id = 129/161 (80%), Pos = 148/161 (91%), G = 0/161 (0%) Sc = 258 bits (660), Ex = 2e-74, Id = 120/160 (75%), Pos = 145/160 (91%), G = 0/160 (0%) c = 199 bits (507), Ex = 1e-56. Id = 95/161 (59%), Pos = 118/161 (73%), G = 0/161 (0%)
<i>P. pastoris</i>	1	Глутатион пероксидаза ортолог на <i>GPX1</i> , <i>GPX2</i> и <i>HYR1 (GPX3)</i>	chr2-2_0382 (II chr)	80 % сходство с <i>HYR1</i> 57 % сходство с <i>GPX1</i> 73 % сходство с <i>GPX2</i>	-	Sc = 274 bits (701), Ex = 5e-79, Id = 129/161 (80%), Pos = 145/161 (90%), G = 0/161 (0%) Sc = 196 bits (499), Ex = 1e-55, Id = 93/161 (57%), Pos = 116/161 (73%), G = 0/161 (0%) Sc = 249 bits (636), Ex = 2e-71, Id = 117/160 (73%), Pos = 140/160 (88%), G = 0/160 (0%)	• Цитоскелет - (55.6%) • Цитозол (44.4%) • ЕПР - ККХХ мотив в С-края
<i>C. neoformans</i>	2	Глутатион пероксидаза ортолог на <i>GPX1</i>	CNAG_06287.2 (XII chr)	44 % сходство с <i>GPX1</i> 52 % сходство с <i>GPX2</i>	49 % сходство между двата паралога	Sc = 123 bits (309), Ex = 1e-33, Id = 62/139 (44%), Pos = 87/139 (62%), G = 4/139 (2%) Sc = 149 bits (377), Ex = 2e-41, Id = 73/140 (52%), Pos = 94/140 (67%), G = 3/140 (2%)	• Цитозол (52.2%)
		Глутатион пероксидаза ортолог на <i>GPX1</i>	CNAG_02503.2 (VI chr)	46 % сходство с <i>GPX1</i> 61 % сходство с <i>GPX2</i>			Sc = 137 bits (344), Ex = 1e-37, Id = 67/145 (46%), Pos = 94/145 (64%), G = 4/145 (2%) Sc = 195 bits (495), Ex = 4e-55, Id = 101/165 (61%), Pos = 118/165 (71%), G = 7/165 (4%)

Таблица 4. Изследване на сходството в аминокиселинната последователност (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за глутатион пероксидаза в моделните дрождени щамове.

1.3.3. Тиоредоксин пероксидази

В клетките на *S. cerevisiae* е доказана експресията на пет тиоредоксин пероксидазни ензима, локализиращи в различни клетъчни органели. Кодираните от *TSA1*, *TSA2* и *AHP1* ензими са локализиращи в цитозола. Prx1 (пероксиредоксин с тиоредоксин пероксидазна функция) е разположен в митохондриите, а Dot5 (тиолов пероксид с тиоредоксин пероксидазна функция) в ядрото. (таблица 5).

In silico анализът на аминокиселинните последователности на тиоредоксин пероксидазите при *S. cerevisiae* показва наличие на 68 % хомоложност между паралозите *TSA1* и *TSA2*, и 29 % сходство между *PRX1* и двата *TSA* паралога. Не беше открита съществена идентичност в секвенциите, кодиращи двата пероксиредоксина, както и между *AHP1* / *DOT5* и тиоредоксин пероксидазите. Въпреки наличието на общи каталитични функции, липсата на сходство в аминокиселинните последователности на пероксиредоксините и тиоредоксин пероксидазите, кодиращи от *TSA1*, *TSA2* и *PRX1*, не позволява гените да бъдат приети за паралоги. (таблица 5)

Локализиращият във втора хромозома KLLA0B01628g кодираща *Tsa1* като степента на хомоложност в аминокиселинните последователности на *Tsa1* при респираторния и ферментативния щам, установено чрез BLASTp анализ е 88 %. *Tsa1* при *K. lactis* показва висок процент на сходство и с *Tsa2* при *S. cerevisiae* (83 % хомоложност). Транскрипцията на *TSA1* както при ферментативни, така и при респираторни дрожди, се индуцира в присъствие на водороден пероксид. При геномния анализ на *K. lactis* бяха установени и два гена, ортолози на *PRX1* при *S. cerevisiae*, като степента им на хомоложност с ферментативните представители изведени чрез BLASTp анализ е 44 % за KLLA0A02651g и 66 % за KLLA0E20285g. Идентичността на аминокиселинните последователности, кодиращи от двата паралога, е 44 %. Регистрирани бяха и два гена, ортолози на *AHP1* при *S. cerevisiae*: KLLA0A07271g (с 40 % сходство) и KLLA0F20009g (с 51 % сходство), както и KLLA0F14333g, ортолог на *DOT5* при *S. cerevisiae* с 58 % хомоложност BLASTp анализ (таблица 5). В генома на *P. pastoris* посредством биоинформатични техники е доказано наличие на шест гена, кодиращи ензими с тиоредоксин пероксидазна активност (таблица 5).

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>S. cerevisiae</i>	5	Тиоредоксин пероксидаза <i>TSA1</i>	YML028W (XIII chr)	100 %	68 % сходство между <i>TSA1</i> и <i>TSA2</i> 29 % сходство между <i>PRX1</i> и <i>TSA1/TSA2</i> Няма съществена хомоложност между гените, кодиращи перокси-редоксини и тиоредоксини		<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (11.1%) • Апарат на Голджи (33.3 %)
		Тиоредоксин Пероксидаза <i>TSA2</i>	YDR453C (IV chr)	100 %			<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (22.2%) • Апарат на Голджи (33.3 %)
		Тиоредоксин пероксидаза <i>PRX1</i>	YBL064C (II chr)	100 %			<ul style="list-style-type: none"> • Митохондрии (65.2%) • Вакуоли
		Тиол – специфичен пероксиредоксин с тиоредоксин пероксидазна активност <i>AHP1</i>	YLR109W (XII chr)	100 %			<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (56.5%)
		Тиол – специфичен пероксиредоксин с тиоредоксин пероксидазна активност <i>DOT5</i>	YIL010W (X chr)	100 %			<ul style="list-style-type: none"> • Ядро (39.1%) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 26-та позиция (30.4%)
<i>K. lactis</i>	6	Тиоредоксин пероксидаза ортолог на <i>TSA1</i> и с <i>TSA2</i>	KLLA0B01628g (II chr)	88 % сходство с <i>TSA1</i> и 83% с <i>TSA2</i>	29 % сходство между <i>TSA1</i> и <i>PRX1</i>	Sc = 365 bits (936), Ex = 4e-106, Id = 174/196 (88%), Pos = 186/196 (94%), G = 0/196 (0%) Sc= 349 bits (896), Ex = 2e-101, Id= 163/195 (84%), Pos = 182/195 (93%), G= 0/195 (0%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (22.2%) • Апарат на Голджи (33.3%)
		Тиоредоксин пероксидаза ортолог на <i>PRX1</i>	KLLA0A02651g (I chr)	44 %	44 % сходство между двата паралога	Sc = 190 bits (482), Ex = 2e-53, Id = 95/212 (44%), Pos = 134/212 (63%), G = 7/212 (3%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (47.8 %) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 12-та позиция (34.8)
		Тиоредоксин пероксидаза ортолог на <i>PRX1</i>	KLLA0E20285g (V chr)	66 %		Sc = 343 bits (881), Ex = 1e-99, Id = 161/242 (66%), Pos = 197/242 (81%), G = 3/242 (1%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (17.4%) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 38-ма позиция (73.9%)
		Пероксиредоксин ортолог на <i>AHP1</i>	KLLA0A07271g (I chr)	40 %	41 % сходство между двата паралога	Sc = 84.3 bits (207), Ex = 3e-17, Id = 58/145 (40%), Pos = 83/145 (57%), G = 9/145 (6%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (43.5%) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 23-та позиция (30.4%)
		Пероксиредоксин ортолог на <i>AHP1</i>	KLLA0F20009g (VI chr)	51 %		Sc = 171 bits (432), Ex = 8e-48, Id = 83/162 (51%), Pos = 111/162 (68%), G = 4/162 (2%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (52.2%) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 25-та позиция (30.4%)
		Пероксиредоксин ортолог на <i>DOT5</i>	KLLA0D14333g (IV chr)	58 %		Sc = 236 bits (603), Ex = 3e-67, Id = 119/205 (58%), Pos = 156/205 (76%), G = (2%)	<ul style="list-style-type: none"> • Ядро (47.8%)

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>P. pastoris</i>	6	Тиоредоксин пероксидаза ортолог на <i>TSAI</i>	chr2-2_0220 (II chr)	77 %	~ 27% идентичност между ортолога на <i>TSAI</i> и двата паралога на <i>PRXI</i>	Sc = 315 bits (808), Ex = 3e-91, Id = 148/191 (77%), Pos = 176/191(92%), G = 0/191(0%)	<ul style="list-style-type: none"> • Ендоплазматичен ретикулум - KKXX- мотив в С-края: FSKS (34.8%) • Апарат на Голджи (21.7%) • Митохондрии (17.4%) • Цитозол (13%)
		Тиоредоксин пероксидаза ортолог на <i>PRXI</i>	chr1-1_0433 (I chr)	59 %	59 % сходство между двата паралога	Sc = 266 bits (680), Ex = 3e-76, Id = 126/211 (59%), Pos = 163/211(77%), G = 2/211 (0%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (56.5%) • Митохондрии (4.3%)
		Тиоредоксин пероксидаза ортолог на <i>PRXI</i>	chr3_0906 (III chr)	64 %		Sc = 313 bits (803), Ex = 2e-90, Id = 144/222 (64%), Pos = 179/222(80%), G = 1/222(0%)	<ul style="list-style-type: none"> • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 41-ва позиция (87%)
		Пероксиредоксин ортолог на <i>AHP1</i>	chr1-4_0547 (I chr)	35 %	35 %	Sc = 74.7 bits (182), Ex = 7e-19, Id = 47/135(35%), Pos = 74/135 (55%), G = 7/135 (5%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (43,5%) • Пероксизоми - С-краен AKL насочващ сигнал (21.7%) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 20-та позиция (21.7%)
		Пероксиредоксин ортолог на <i>AHP1</i>	chr2-1_0502 (II chr)	36 %		Sc = 69.7 bits (169), Ex = 2e-17, Id = 51/140(36%), Pos = 76/140 (54%), G = 11/140 (8%)	<ul style="list-style-type: none"> • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 22-ра позиция (52.2%) • Цитозол (21.7%)
		Ядрен тиолов пероксид ортолог на <i>DOT5</i>	chr1-1_0155 (I chr)	55 %		Sc = 191 bits (484), Ex = 1e-53, Id = 100/182 (55%), Pos = 124/182(68%), G = 13/182(7%)	<ul style="list-style-type: none"> • Ядро (47.8%) • Цитозол (26.1%) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 17-та позиция (21.7%)
<i>C. neoformans</i>	2	Тиоредоксин пероксидаза ортолог на <i>TSAI</i> и <i>TSA2</i>	CNAG_03482 .2 (VIII chr)	55 % сходство с <i>TSAI</i> 50 % сходство с <i>TSA2</i> 38% сходство с <i>AHP1</i>	28 %	Sc = 211 bits (538), Ex = 6e-60, Id = 98/178 (55%), Pos = 133/178 (75%), G = 1/178(1%) Sc = 201 bits (510), Ex = 9e-57, Id = 96/189 (50%), Pos = 134/189 (70%), G = 3/189(2%) Sc = 12.3 bits (20), Ex = 5.0, Id = 5/13 (38%), Pos = 8/13 (62%), G = 0/13(0%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (56.5%) • Цитоскелет (17.4%)
		Тиол – специфичен антиоксидантен белтък 3	CNAG_06917 .2 (III chr)	28 % сходство с <i>TSAI</i> 28 % сходство с <i>TSA2</i> 24 % сходство с <i>DOT5</i>		Sc = 68.6 bits (166), Ex = 9e-17, Id = 44/156 (28%), Pos = 76/156(49%), G = 10/156 (6%) Sc = 69.7 bits (169), Ex = 4e-17, Id = 45/152 (30%), Pos = 77/152 (51%), G = 10/152 (7%) Sc = 27.7 bits (60), Ex = 2e-04, Id = 19/80 (24%), Pos = 35/80(44%), G = 3/80 (4%)	<ul style="list-style-type: none"> • Цитозол (34.8%) • Митохондрии - Гавел R 2 последователност за сръзване в 14-та позиция (30.4%)

Таблица 5. Изследване на сходството в аминокиселинната последователност (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за тиоредоксин пероксидаза в моделните дрождеви щамове

При BLASTp анализа се установи, че един от гените (chr2-2_0220) кодира белтък с тиоредоксин пероксидазна активност, който показва 77 % хомоложност с *TSA1* при *S. cerevisiae*. Ортолозите на *PRX1* са два, кодирани от chr1-1_0433 и chr3_0906 със съответно 59 % и 64 % хомоложност. Семейството на тиоредоксините при *P. pastoris* се допълва от още три ензима, кодирани от гени, ортолози на пероксиредоксините при *S. cerevisiae*: chr1-4_0547 и chr2-1_0502 - на *AHP1* със съответно 35 % и 36 % хомоложност и chr1-1_0155 - на *DOT5* с 55 % хомоложност в аминокиселинните последователности (данни от BLASTp анализ).

Въпреки високия процент идентичност в аминокиселинните последователности на белтъците от тиоредоксиновото ензимно семейство в респираторни и ферментативни дрожди, анализът на вътреклетъчната им локализация показва някои разлики. *Tsa1* при *S. cerevisiae* се локализира в цитозола, както и неговия ортолог в *K. lactis*, кодиран от KLLA0B01628g. В допълнение обаче *in silico* анализът на KLLA0B01628g сигнали за насочване на белтъка и към Апарата на Голджи. Анализът на аминокиселинната секвенция на *Tsa1* при *P. pastoris* не показва ясен сигнал за локализация на белтъка в митохондриите (вероятност от 17,4 %). Беше установен обаче C-краен FSKS мотив, определящ 34,8 % вероятност за локализация на ензима в ендоплазматичния ретикулум. Вероятността за насочване на ензима към Апарата на Голджи е 21,7 % (таблица 5).

Анализът на аминокиселинните последователности на кодираните от KLLA0A02651g и KLLA0E20285g при *K. lactis* и chr-3_0906 при *P. pastoris* ортолози на *PRX1* при *S. cerevisiae* показва, че те притежават типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване на 12-та и 38-ма позиция, съответно за *K. lactis* и на 41-ва за *P. pastoris*. При определяне на вътреклетъчната локализация на *Prx1* кодиран от chr1-1_0433, при метилотрофния щам отново бяха установени разлики със *S. cerevisiae*. След анализ с PSORT II Prediction Software беше установено, че вероятността за насочване към митохондриите е 4,3 % и не се установява насочващ сигнал. Вероятността за локализация на ензима в цитозола е 56,5 %. Предполагаемо разпределение на *Prx1* в цитозола, се установи и при KLLA0A02651g (таблица 5).

Изследването на аминокиселинните последователности на ортолозите на *AHP1* при респираторни дрожди доказва наличие на сигнали за насочване към цитозола. За разлика от ферментативния представител в три от секвенциите бяха открити типични N-крайни митохондриални сигнали с Гавел последователности за срязване на 23-та и 25-та позиция при KLLA0A07271g и KLLA0F20009g, и в 22-ра и 20-та позиция

съответно при chr2-1_0502 и chr1-4_0547. Изследване чрез BLASTp анализ на аминокиселинната последователност на втория ортолог на *AHP1* при *P. pastoris*, кодиран от chr1-4_0547, установи и типичен C-краен AKL пероксизомален сигнал, определящ 21,7 % вероятност за насочване на белтъка към пероксизомите (**таблица 5**).

Резултатите от сравнителния анализ на първичната структура на белтъците потвърдиха, че и при двата щама респираторни дрожди основните аминокиселинни остатъци, отговорни за тиоредоксин пероксидазната активност на всички изучени ензими, са силно консервативни и еволюционно запазени (**фигура 3**).



Фигура 3. Архитектура на домен, обобщаващ тиоредоксин пероксидазите при *K. lactis* и *P. pastoris* към класа на глутатион пероксидазите.

Изучаването на аминокиселинните последователности на тиоредоксин пероксидазните ензими при *C. neoformans* доказва наличие на два тиол-специфични антиоксидантни белтъка. Кодираният от CNAG_03482.2 белтък показва 55 % хомоложност с Tsa1 и 50 % с Tsa2 при *S. cerevisiae* (данни от BLASTp анализ). Високият процент на сходство позволява CNAG_03482.2 да бъде приет като ортолог и на двата гена, кодиращи тиоредоксин пероксидази при ферментативния щам. Установеното сходство в аминокиселинните последователности между втория тиол-специфичен антиоксидантен протеин и Tsa1 и Tsa2 при *S. cerevisiae* е около 27 %, което също позволява кодиращият го ген CNAG_06917.2 за тиол специфичен антиоксидантен протеин 3, да бъде приет за ортолог на тези при *S. cerevisiae* (**таблица 5**).

Резултатите от сравнителния анализ на първичната структура на белтъците потвърди, че както при респираторните дрожди от родове *Kluyveromyces* и *Pichia*, основните аминокиселинни остатъци, отговорни за тиоредоксин пероксидазната активност на тиол-специфичните антиоксидантни протеини при *C. neoformans*, са силно консервативни и еволюционно запазени (**фигура 3**).

Изследването на вътреклетъчната локализация на ензимите с тиоредоксин пероксидазна активност показва, че подобно на Tsa1 и Tsa2 при *S. cerevisiae* тиол-специфичните антиоксидантни белтъци са локализирани в цитозола. Освен това при

изучаване на CNAG_06917.2 беше открит и типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване на 14–та позиция (таблица 5).

1.4. Биосинтеза и регулация на вътреклетъчната концентрация на глутатион

1.4.1. γ – глутамил синтетаза и глутатион синтетаза

Синтезата на глутатион протича двуетапно в дрождевата клетка. Първата стъпка е формирането на γ –глутаминцистеин от L–глутамин и L–цистеин под действие на ензима γ –глутамилцистеин синтетаза. Вторият етап е синтезата на глутатион от ензима глутатион синтетаза. Дрождите *S. cerevisiae* експресират една γ –глутамилцистеин синтетаза, кодирана от *GSH1* и една глутатион синтетаза, кодирана от *GSH2*. И двата ензима, участващи в глутатионовата биосинтеза, са локализирани в цитозола.

Анализът на генома на *K. lactis* и *P. pastoris* показва, че γ –глутамилцистеин синтетаза на *S. cerevisiae* има съответните ортолози и в респираторните дрожди, като степента им на хомоложност е съответно 62 % и 46 %, установена чрез BLASTp анализ (таблица 6). Анализът на вътреклетъчната локализация на Gsh1 при *K. lactis*, показва наличие на ензима в цитозола. Установен беше и допълнителен сигнал (фигура 4) RINYDVLHL PTS2 на 625–та позиция, улесняващ насочването на белтъка към пероксизомите (таблица 6).

SFANFIRTYILNHPEYDQTSSVSQ**RINYDVLHL**SYRITHYDDSKNELSAF

Фигура 4. Аминокиселинна последователност в секвенцията на γ глутамилцистеин синтетаза при *K. lactis*, предполагаща насочване на ензима към пероксизомите.

Установено е, че глутамат цистеин лигазата при *C. neoformans*, кодирана от CNAG_06300.2, показва идентични функции с γ –глутаминцистеин синтетаза при *S. cerevisiae*, тъй като катализира първата реакция в процеса на синтеза на глутатион. (таблица 6). Сравнителният анализ на аминокиселинните последователности на двата ензима не показва наличие на съществено сходство в секвенциите, което предполага, че кодиращите гени не са представители на близкородствено семейство и са претърпели значителна еволюционна дивергенция. Проучването на вътреклетъчното разпределение на глутамин цистеин лигазата потвърди филогенетичните разлики в гените, кодиращи ензима при ферментативни и оксидативни дрожди. Установено е наличие на базични

аминокиселинни остатъци, насочващи ензима към клетъчното ядро. Открит бе и PTS2 сигнал KLASHIGHL на 427–ма позиция, предполагащ възможна локализация на ензима в пероксизомите (таблица 6) (фигура 5):

YHDIDVPVNQKVRQRLLEHGIDDKLASHIGHLFIRDPLVQ

Фигура 5. Аминокиселинна последователност в секвенцията на глутамат цистеин лигаза при *C. neoformans*, предполагаща насочване на ензима към пероксизомите.

Близкото филогенетично родство между ензимите, участващи в глутатионовата биосинтеза при респираторни и ферментативни дрожди, беше потвърдено от сравнителния анализ на аминокиселинните секвенции на Gsh2 при *S. cerevisiae* и глутатион синтетазните ензими при *K. lactis* и *P. pastoris*. Чрез BLASTp анализ бе установена висока степен на хомоложност – 54 % за продукта, кодиран от KLLA0F07557g, и 46 % за този, кодиран от chr1-4_0496 (таблица 7). Ето защо тези гени могат да се приемат за ортолози на *GSH2* при *S. cerevisiae*.

Изследването на KLLA0F07557g установи, локализация на глутатион синтетазата в цитозола, подобно на Gsh2 при *S. cerevisiae*. При *P. pastoris* ензимът също е цитозолен.

Филогенетичният анализ на генома на *C. neoformans* показва наличие на един глутатион синтазен ензим, кодиран от локализирания в десета хромозома CNAG_04647.2. Извършеният сравнителен BLASTp анализ на аминокиселинните последователности на изучавания белтък и продукта на *GSH2* при *S. cerevisiae* доказва 38 % сходство, което определя CNAG_04647.2 като ортолог на *GSH2*.

Анализът на втреклетъчната локализация на глутатион синтазата при *C. neoformans* показва съществени различия с ензима при ферментативните дрожди. В белтъка на *C. neoformans* беше установена N–крайна сигнална последователност, определяща висок процент вероятност за насочването му към клетъчната стена.

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>S. cerevisiae</i>	1	γ -глутамил цистеин синтетаза <i>GSH1</i>	YJL101C (X chr)	100%	-		• Цитозол (43.5%)
<i>K. lactis</i>	1	γ -глутамил цистеин синтетаза ортолог на <i>GSH1</i>	KLLA0F14058g (VI chr)	62%	-	Sc = 892 bits (2306), Ex = 0.0, Id = 423/673 (62%), Pos = 529/673 (78%), G = 14/673 (2%)	• Цитозол (47.8%) • Пероксизоми – PTS2 RINYDVLHL сигнал на 625–та позиция
<i>P. pastoris</i>	1	γ -глутамил цистеин синтетаза ортолог на <i>GSH1</i>	chr1-1_0184 (I chr)	46%	-	Sc = 575 bits (1483), Ex = 2e-168, Id = 319/680 (46%), Pos = 427/680 (62%), G = 47/680 (6%)	• Цитозол (82.6%)
<i>C. neoformans</i>	1	Глутаматцистеин лигаза	CNAG_06300.2 (XIII chr)	-	-		• Ядро (69.6%) • Пероксизоми – PTS2 KLASHIGHL сигнал на 427–ма позиция

Таблица 6. Изследване на сходството в аминокиселинната последователност (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за γ -глутамил цистеин синтетаза в моделните дрождеви щамове.

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>S. cerevisiae</i>	1	Глутатион синтетаза <i>GSH2</i>	YOL049W (XV chr)	100%	-		• Цитозол (65.2%)
<i>K. lactis</i>	1	Глутатион синтетаза ортолог на <i>GSH2</i>	KLLA0F07557g (VI chr)	54%	-	Sc = 528 bits (1359), Ex = 5e-154, Id = 262/479 (54%), Pos = 350/479 (73%), G = 14/479 (2%)	• Цитозол (65.2%)
<i>P. pastoris</i>	1	Глутатион синтетаза ортолог на <i>GSH2</i>	chr1-4_0496 (I chr)	46%	-	Sc = 432 bits (1112), Ex = 9e-126, Id = 226/496 (46%), Pos = 336/496 (68%), G = 23/496 (5%)	• Цитозол (60.9%)
<i>C. neoformans</i>	1	Глутатион синтаза ортолог на <i>GSH2</i>	CNAG_04647.2 (Xchr)	38 %	-	Sc = 342 bits (876), Ex = 3e-98, Id = 201/525 (38%), Pos = 299/525 (57%), G = 52/525 (10%)	• Клетъчна стена (66.7%)

Таблица 7. Изследване на сходството в аминокиселинната последователност (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за глутатион синтетаза в моделните дрождеви щамове.

1.5. Глутатион трансфераза

Чрез анализ на генома на *K. lactis* и *P. pastoris* беше установено, че глутатион трансферазните ензими имат съответните ортолози и в респираторните дрожди. При *K. lactis* са открити два белтъка, кодирани от KLLA0A00264g и KLLA0A11396g, ортолози на *GTT1* и *GTT3*, които показват 64 % и 27 % идентичност в аминокиселинните последователности с Gtt1 и Gtt3. BLASTp анализът на метилотрофния щам показва наличие на един ортолог на *GTT1*, кодиран от chr2-2_0116, чийто продукт е с хомология от 39 % с Gtt1 при ферментативни дрожди. Изследването на вътреклетъчното разпределение на изучените ензими показва, че Gtt1 при двата респираторни щама притежава типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване на 28-ма и 32-ра позиция, съответно за *K. lactis* и *P. pastoris*. Освен митохондриалния сигнал, в аминокиселината секвенция на Gtt1 при метилотрофния щам е установена възможност за локализация на ензима в цитозола. Предвидената от PSORT II Prediction Software вътреклетъчна локализация на продукта на гена при *K. lactis*, ортолог на *GTT3*, показва наличие на насочващи сигнали към четири клетъчни компартмента, като насочването на ензима към ендоплазматичния ретикулум е с най - голяма вероятност (33 %).

Ортолози на *GTT1* и *GTT3* са открити и при биоинформатичен анализ на *C. neoformans*. CNAG_00921.2 кодира ензим с глутатион трансферазна активност с 38 % сходство в аминокиселинната последователност с Gtt1. CNAG_01005.2 и CNAG_03848.2 кодират белтъци с повече от 60 % хомоложност с Gtt3. При анализ на генома на *C. neoformans* беше доказано наличие на три гена, кодиращи продукти анотирани като глутатион S - трансферази. Глутатион S - трансферазата кодирана от GNAG_01893.2 е ортолог на *GTT3* с идентичност съответно 29 %. Едновременно с това високият процент сходство между аминокиселинните последователности, кодирани от GNAG_01889.2 и GNAG_01893.2 – 69%, позволява двата гена да бъдат приети за паралоли. BLASTp анализът на аминокиселинната последователност на глутатион S трансфераза, кодирана от CNAG_01889.2 при оксидативния щам, не показва съществена хомология с нито един от изследваните при *S. cerevisiae* ензими с глутатион трансферазна активност. При BLASTp анализ на GNAG_04110.2 беше показано наличие на повече от 20 % хомология със *GTT1* и *GTT2* при ферментативния щам (таблица 8).

Установено е, че Gtt1 при оксидативния щам притежава Гавел последователност за срязване на 24-та позиция, която дава вероятност за насочване на белтъка към

митохондриите. Трите протеина са с цитозолна локализация, като в допълнение към цитозолния продукт на CNAГ_03848.2 притежава още два независими сигнала, улесняващи насочването на ензима към ядрото и митохондриите. Трите глутатион S – трансферазни ензима са позиционирани в цитозола и митохондриите.

За разлика от *S. cerevisiae* при останалите моделни щамове не е открит сигнал за локализация на Gtt1 към ендоплазматичния ретикулум. Различията с ферментативния щам се задълбочават и от факта, че при изследване на първичната белтъчна структура на Gtt1 при *K. lactis* не е показано наличие на домен, характерен за глутатион трансфераза. Резултатите от сравнителния анализ на първичната структура на глутатион трансферазите при двата щам респираторни дрожди и при *C. neoformans* показаха, че основните аминокиселинни остатъци, отговорни за активността на ензимите, са силно консервативни.

Друг белтъкът, който участва в регулацията на нивото на глутатион в клетката е Ure2. *In silico* анализът на генома на *S. cerevisiae* установи един Ure2 белтък. Той е локализиран в цитозола и притежава съвкупност от аминокиселинни остатъци с основен характер, даващ вероятност за импорт на белтъка в ядрото с вероятност 43,5 %, и типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване на 34–та позиция, предполагащ локализация с вероятност 26,1 % (**таблица 8**), което съвпада с литературните данни.

Сравнителният анализ на генома на респираторни дрожди с този на *S. cerevisiae*, показва наличие на гени ортолози на *URE2*. При *K. lactis* чрез BLASTp анализ, беше открит един белтък със 70 % хомоложност в аминокиселинната последователност с продукта на *URE2*, който има S-трансферазна активност. Чрез същия подход в генома на *P. pastoris* бяха установени два белтъка, кодирани от chr2-1_0033 и chr2-1_0490, съответно с 68 % и 32 % идентичност в аминокиселинната последователност на Ure2 при *S. cerevisiae*. Високият процент хомоложност в секвенциите на изследваните белтъци позволява да се допусне, че кодиращите ги гени са ортолози, близко родствени в еволюционно отношение.

Анализът на вътреклетъчната компартиментализация на белтъците при *K. lactis* показва с вероятност 43,5 % инкорпориране в ядрото, както и вероятност за локализация на белтъка в цитозола (**таблица 8**). Продуктите на chr2-1_0033 и chr2-1_0490 при *P. pastoris*, също са с цитозолна локализация.

Висока хомоложност (57 %) с Ure2 при *S. cerevisiae* показва и установеният при *C. neoformans* белтък, кодиран от локализирания в трета хромозома ортолог на *URE2* -

CNAG_03848.2. Изследванията на клетъчната локализация на белтъка установиха сигнали за насочване към ядрото, както и такива за локализацията му в цитозола и митохондриите (**таблица 8**).

Резултатите от сравнителния анализ на първичната структура на белтъците показва, че и при двата щама респираторни дрожди основните аминокиселинни остатъци, отговорни за глутатион S-трансферазната активност, са силно консервативни и еволюционно запазени (**фигура 6**).



Фигура 6. Архитектура на домен, причисляващ Ure2 към сигнатурата на тези с глутатион S-трансферазна активност.

Високата степен на сродство в аминокиселинните последователности на Ure2 белтъците в клетките на ферментативни, респираторни и оксидативни дрожди, както и наличието на идентични сигнали за субклетъчна локализация, предполага еволюционно сходство между тези протеини в метаболитно различните дрождеви видове. Това е логично предвид силното му влияние върху метаболизма на глутатиона – основно звено в неензимната защита срещу оксидативен стрес, както и ролята на белтъка като регулатор на азотната катаболитна репресия в клетката.

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html	
<i>S. cerevisiae</i>	3	Глутатион трансфераза <i>GTT1</i>	YIR038C (IX chr)	100 %	Няма сходство между гените		<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (47.8%) Пероксисоми (PTS2) 	
		Глутатион трансфераза <i>GTT2</i>	YLL060C (XII chr)	100 %			<ul style="list-style-type: none"> Митохондрии (39.1%) 	
		Глутатион трансфераза <i>GTT3</i>	YEL017W (V chr)	100 %			<ul style="list-style-type: none"> Ендоплазматичен ретикулум (22%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 19-та позиция 	
		Глутатион трансфераза <i>URE2</i>	YNL229C (XIV chr)	100 %			<ul style="list-style-type: none"> Ядро (43.5%) Цитозол (21.7) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 34-та позиция (26.1%) 	
<i>K. lactis</i>	3	Глутатион трансфераза ортолог на <i>GTT1</i>	KLLA0A0026 4g (I chr)	64 %	Няма сходство между гените	Sc = 302 bits (774), Ex = 3e-87, Id = 151/234 (64%), Pos = 191/234 (81%), G = 0/234 (0%)	<ul style="list-style-type: none"> Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 28-ма позиция FRV LW (52.2%) 	
		Глутатион трансфераза ортолог <i>GTT3</i>	KLLA0A1139 6g (I chr)	27 %			Sc = 99.4 bits (246), Ex = 1e-25, Id = 99/343 (28%), Pos = 158/343 (46%), G = 52/343 (15%)	<ul style="list-style-type: none"> Ендоплазматичен ретикулум (33.3%) Вакуоли (22.2%) Плазмена мембрана (22.2%) Апарт на Голджи (11.1%)
		Глутатион трансфераза ортолог <i>URE2</i>	KLLA0D1962 4g (IV chr)	70%			Sc = 537 bits (1384), Ex = 2e-157 Id = 266/381 (70%), Pos = 299/381 (78%), G = 34/381 (9%)	<ul style="list-style-type: none"> Ядро (43.5%) Цитозол (30.4%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 32-ра позиция LRQ VN (17.4%)
<i>P. pastoris</i>	3	Глутатион трансфераза ортолог на <i>GTT1</i>	chr2-2_0116 (II chr)	39 %	~ 28% идентичност между ортолога на <i>GTT1</i> и двата	Sc = 150 bits (380), Ex = 1e-41, Id = 90/228 (39%), Pos = 135/228 (59%), G = 13/228 (5%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (39.1%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 32-ра позиция (39.1%) 	
		Глутатион трансфераза ортолог <i>URE2</i>	chr2-1_0033 (II chr)	68 %			32 % сходство между двата паралога	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол
		Глутатион трансфераза ортолог <i>URE2</i>	chr2-1_0490 (II chr)	32 %				<ul style="list-style-type: none"> Цитозол

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>C. neoformans</i>	7	Глутатион трансфераза ортолог на <i>GTT1</i>	CNAG_00921.2 (V chr)	38 % сходство с <i>GTT1</i>	27 % сходство между <i>GTT1</i> и CNAG_01005.2	Sc = 40.0 bits (92), Ex = 5e-08 Id=30/78(38%),Pos=45/78(58%),G=6/78(8%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (47.8%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 24-та позиция(21. 7%)
		Глутатион трансфераза ортолог на <i>GTT3</i>	CNAG_01005.2 (V chr)	Няма сходство с <i>GTT1</i> , <i>GTT2</i> и <i>URE2</i> 66 % сходство с <i>GTT3</i>	27 % <i>GTT1</i> и CNAG_01005.2 26 % сходство между CNAG_01005.2 и ортолога на <i>URE2</i>	Sc = 13.5 bits (23), Ex = 2.8 Id = 4/6 (66%), Pos = 6/6 (99%),G = 0/6(0%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол(47.8%) Ядро (30.4%)
		Глутатион трансфераза ортолог на <i>GTT3</i>	CNAG_03848.2 (II chr)	Няма сходство с <i>GTT1</i> и <i>GTT2</i> 63 % сходство с <i>GTT3</i> 21 % сходство с <i>URE2</i>	Няма сходство с ортолозите на <i>GTT1</i> , <i>GTT2</i> и <i>URE2</i>	Sc = 16.2 bits (30), Ex = 1.9, Id=13/61(21%),Pos=26/61(43%),G=15/61(25%) Sc = 14.6 bits (26), Ex = 4.5, Id= 7/11 (63%), Pos= 8/11 (72%), G= 1/11 (9%)	<ul style="list-style-type: none"> Ядро(53.2%) Цитозол(13%) Митохондрии(13%)
		Глутатион S трансфераза	CNAG_04110.2 (IX chr)	24 % сходство с <i>GTT1</i> 23% сходство с <i>GTT2</i>		Sc = 45.8 bits (107), Ex = 9e-10 Id=45/187(24%),Pos=82/187(44%),G=18/187(10%) Sc = 30.0 bits (66), Ex = 5e-05, Id =47/202 (23%),Pos=76/202(38%),G=42/202(21%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (43.5%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 25-та позиция TRL PE (13%)
		Глутатион S трансфераза ортолог на <i>GTT3</i>	CNAG_01889.2 (XI chr)		33% сходство с Глутатион трансфераза ортолог на <i>GTT3</i> , кодирана от CNAG_01005.2		<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (60.9%) Митохондрии Гавел R 2 последователност за срязване в 17-та позиция NRI HN (8.7%)
		Глутатион S трансфераза <i>GST3</i> ортолог на <i>GTT3</i>	CNAG_01893.2 (XI chr)	29% сходство с <i>GTT3</i>	69% сходство с Глутатион S трансфераза ортолог на <i>GTT3</i> , кодирана от CNAG_01889.2	Sc= 15.0 bits (27), Ex = 2.6, Id = 4/14 (29%), Pos= 8/14 (57%), G = 0/14 (0%)	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол(52.2%) Митохондрии(4.3%)
		Глутатион трансфераза ортолог на <i>URE2</i>	CNAG_02849.2 (III chr)	Няма сходство с <i>GTT1</i> , <i>GTT2</i> и <i>GTT3</i> ; 57 % сходство с <i>URE2</i>	26 % сходство между CNAG_01005.2 и ортолога на <i>URE2</i>	Sc = 14.2 bits (25), Ex = 7.8, Id = 4/7 (57%), Pos = 5/7 (71%), G = 0/7 (0%)	<ul style="list-style-type: none"> Ядро (53.2%) Цитозол (13%) Митохондрии(13%)

Таблица 8. Изследване на сходството в аминокиселинните последователности (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за глутатион трансферази в моделните дрождеви щамове.

1.6. Глутаредоксини

Анализът на вътреклетъчната локализация на глутаредоксините при *S. cerevisiae* показва наличие на типичен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване в 32–ра, 20–та и 38–ма позиция при Grx3, Grx5 и Grx7 и локализация на Grx4 в цитозола. При анализ на Grx6 са открити сигнали за насочване към ядрото и митохондриите. Изчисленият от PSORT II Prediction Software процент за локализация в цитозола и апарата на Голджи е по - нисък (съответно 13% и 8,7 %). Компартиментализацията на Grx7 според PSORT II Prediction Software е възможна с най - голяма вероятност в клетъчната стена и митохондриите и в допълнение към апарата на Голджи и вакуолите. Хомоложността между аминокиселинните последователности на глутаредоксините е средно около 30 %, като между двойките Grx5 / Grx7 и Grx7 / Grx8 не се открива съществена прилика (**таблица 9**).

Чрез геномен анализ на респираторни дрожди се установи наличие на четири аотирани гена, кодиращи глутаредоксини при *K. lactis* и *P. pastoris*. Ортолозите на гените за глутаредоксини при *K. lactis* са както следва: KLLA0C17842g е ортолог на *GRX3*, KLLA0B09636g е ортолог на *GRX5*, KLLA0E17733g е ортолог на *GRX6* и KLLA0B07975g е ортолог на *GRX8*. Доказано е наличие на пети белтък, кодиран от KLLA0E24069g, за който се предполага, че е ортолог на *GRX1*. В генома на *P. pastoris* са установени ортолози на *GRX2*, *GRX3*, *GRX5* и *GRX6*, кодирани от chr4_0840, chr2-1_0060, chr1-4_0207, chr2-1_0585. BLASTp анализ на хомоложността в аминокиселинните последователности на кодираните продукти при *K. lactis* с протеините при *S. cerevisiae* показва стойност средно 60 %, а тази при *P. pastoris* – 54 %.

Анализът на вътреклетъчната локализация на белтъците установи, че както при ферментативните дрожди, глутаредоксините при респираторните представители следват обща логика. В *K. lactis* Grx3 и Grx8 са локализиращи в цитозола, Grx5 и Grx6 притежават типичен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване в 35–та и 34–та позиция. Тези резултати не са изненадващи, предвид фактът, че глутаредоксините са белтъци, отговорни за детоксикацията на клетката и тяхната висока консервативност е от значение за запазване на редокс баланса в организмите (**таблица 9**).

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите паралози	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>S. cerevisiae</i>	8	Глутаредоксин <i>GRX1</i>	YCL035C (III chr)	100 %	63 % сходство между <i>GRX1</i> и <i>GRX2</i> ~ 30 % сходство между <i>GRX1</i> , <i>GRX3</i> , <i>GRX4</i> , <i>GRX5</i> , <i>GRX6</i> , <i>GRX7</i> и <i>GRX8</i> ~ 30 % сходство между <i>GRX2</i> , <i>GRX3</i> , <i>GRX4</i> , <i>GRX5</i> , <i>GRX6</i> , <i>GRX7</i> и <i>GRX8</i> 66 % сходство между <i>GRX3</i> и <i>GRX4</i> 47 % сходство между <i>GRX3</i> и <i>GRX5</i> ~ 20 % сходство между <i>GRX3</i> , <i>GRX6</i> и <i>GRX7</i> 50 % сходство между <i>GRX3</i> и <i>GRX8</i> 46 % сходство между <i>GRX4</i> и <i>GRX5</i> ~ 20% сходство между <i>GRX4</i> , <i>GRX6</i> , <i>GRX7</i> и <i>GRX8</i> 26 % сходство между <i>GRX5</i> и <i>GRX6</i> Няма сходство между <i>GRX5</i> и <i>GRX7</i> 50 % сходство между <i>GRX5</i> и <i>GRX8</i> 38 % сходство между <i>GRX6</i> и <i>GRX7</i> 41 % сходство между <i>GRX6</i> и <i>GRX8</i> Няма сходство между <i>GRX7</i> и <i>GRX8</i>	-	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (65.2%)
		Глутаредоксин <i>GRX2</i>	YDR513W (IV chr)	100 %		-	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (43.5%)
		Глутаредоксин <i>GRX3</i>	YDR098C (IV chr)	100 %		-	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (39.1%) Митохондрии - Гавел R 2 последователност за срязване в 32-ра позиция(30.4%)
		Глутаредоксин <i>GRX4</i>	YER174C (V chr)	100 %		-	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (56.5%)
		Глутаредоксин <i>GRX5</i>	YPL059W (XVI chr)	100 %		-	<ul style="list-style-type: none"> Митохондрии - Гавел R 10 последователност за срязване в 20-та позиция IRS FS (60.9%)
		Глутаредоксин <i>GRX6</i>	YDL010W (IV chr)	100 %		-	<ul style="list-style-type: none"> Ядро (43.5%) Митохондрии (17.4%) Цитозол (13%) Апарат на Голджи(8.7%)
		Глутаредоксин <i>GRX7</i>	YBR014C (II chr)	100 %		-	<ul style="list-style-type: none"> Клетъчна стена (66.7%) Митохондрии – наличие на Гавел R 2 последователност за срязване в 38-ма позиция LRN SN Апарат на Голджи(11.1%) Вакуоли (11.1%) Ендоплазматичен ретикулум (11.1%)
		Глутаредоксин <i>GRX8</i>	YLR364W (XII chr)	100 %		-	<ul style="list-style-type: none"> Цитозол (60.9%)

Микроорганизъм	Брой гени	Име	Локализация	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Сходство (в %) между аминокиселинните последователности на предполагаемите паралози	BLAST p (Basic Local Alignment Search Tool) между аминокиселинните последователности на продуктите на гените сравнени с <i>S. cerevisiae</i>	Локализация според <i>in silico</i> анализ с PSORT II Prediction Software http://psort.hgc.jp/form2.html
<i>K. lactis</i>	4	Глутаредоксин ортолог на <i>GRX3</i>	KLLA0C17842g (III chr)	63 %	28 % сходство между <i>GRX3</i> и <i>GRX6</i> Няма сходство между <i>GRX3</i> , <i>GRX5</i> и <i>GRX8</i> ~ 20 % сходство между <i>GRX5</i> , <i>GRX6</i> и <i>GRX8</i> Няма сходство между <i>GRX6</i> и <i>GRX8</i>	Sc = 321 bits (822), Ex = 1e-92, Id = 168/264 (63%), Pos = 199/264 (75%), G = 14/264 (5%)	• Цитозол (65.2%)
		Глутаредоксин ортолог на <i>GRX5</i>	KLLA0B09636g (II chr)	74 %		Sc = 210 bits (534), Ex = 8e-60, Id = 99/133 (74%), Pos = 114/133 (85%), G = 0/133 (0%)	• Митохондрии – наличие на Гавел R 2 последователност за срязване в 35 – та позиция (91.3%)
		Глутаредоксин ортолог на <i>GRX6</i>	KLLA0E17733g (V chr)	42 %		Sc = 133 bits (334), Ex = 3e-36, Id = 69/162 (42%), Pos = 102/162 (62%), G = 10/162 (6%)	• Митохондрии – наличие на Гавел R 2 последователност за срязване в 34–та позиция (39.1%) • Ендоплазматичен ретикулум (26.1%)
		Глутаредоксин ортолог на <i>GRX8</i>	KLLA0B07975g (II chr)	58 %		Sc = 137 bits (344), Ex = 5e-38, Id = 64/110 (58%), Pos = 80/110 (72%), G = 2/110 (1%)	• Цитозол (52.2%)
<i>P. pastoris</i>	4	Глутаредоксин ортолог на <i>GRX2</i>	chr4_0840 (IV chr)	46 %	34 % сходство между <i>GRX2</i> и <i>GRX3</i> 22 % сходство между <i>GRX2</i> и <i>GRX5</i> 36 % сходство между <i>GRX2</i> и <i>GRX6</i> 48 % сходство между <i>GRX3</i> и <i>GRX5</i> 22 % сходство между <i>GRX3</i> и <i>GRX6</i> 32 % сходство между <i>GRX5</i> и <i>GRX6</i>	Sc = 123 bits (309), Ex = 8e-34, Id = 60/128 (46%), Pos = 88/128 (68%), G = 4/128 (3%)	• Цитозол (43.5%) • Митохондрии – наличие на Гавел R 10 последователност за срязване в 33–та позиция RRF FS (26.1%)
		Глутаредоксин ортолог на <i>GRX3</i>	chr2-1_0060 (II chr)	57 %		Sc = 281 bits (718), Ex = 1e-80, Id = 143/248 (57%), Pos = 184/248 (74%), G = 16/248 (6%)	• Цитозол (47.8%)
		Глутаредоксин ортолог на <i>GRX5</i>	chr1-4_0207 (I chr)	66 %		Sc = 192 bits (489), Ex = 2e-54, Id = 98/147 (66%), Pos = 117/147 (79%), G = 9/147 (6%)	• Митохондрии – наличие на Гавел R 2 последователност за срязване в 37–ма позиция (78.3%)
		Глутаредоксин ортолог на <i>GRX6</i>	chr2-1_0585 (II chr)	47 %		Sc = 137 bits (344), Ex = 2e-37, Id = 62/130 (47%), Pos = 89/130 (68%), G = 0/130 (0%)	• Ядро (43.5%) • Цитозол (17.4%) • Митохондрии – наличие на Гавел R 2 последователност за срязване в 19–та
<i>C. neoformans</i>	1	Монотиолов глутаредоксин 5	CNAG_03985.2 (II chr)	57 % сходство с <i>GRX5</i>		Sc = 145 bits (367), Ex = 2e-40, Id = 69/121 (57%), Pos = 88/121 (73%), G = 2/121 (2%)	• Митохондрии – наличие на Гавел R 2 последователност за срязване в 40–та позиция RRF LS (87%)

Таблица 9. Изследване на сходството в аминокиселинните последователности (транслираните кодиращи ДНК последователности - CDS-translated) и вътреклетъчната локализация за глутаредоксини в моделните дрождеви щамове.

Бяха наблюдавани и някои различия както в локализацията на белтъците при ферментативни и респираторни дрожди, така и между самите представители на респираторните микроорганизми. При *P. pastoris* Grx2 и Grx3 са локализирани в цитозола; Grx6 – в цитозола и ядрото и Grx5 – в митохондриите. Освен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване в 37–ма позиция при Grx5, такъв сигнал е открит и при Grx2 и Grx6, съответно на 33–та и 19–та позиция. Независимо от това, високият процент на сходство в секвенциите на Grx при *S. cerevisiae* и респираторни дрожди, позволява да се предположи, че кодиращите ги ортолози не са претърпели значителна еволюционна дивергенция.

В публикуваните от Институт Брод бази данни за генома на *C. neoformans* е анотиран само един монотиолов глутаредоксин 5, с 57 % хомоложност с Grx5 (**таблица 9**), с предполагаема вътреклетъчна локализация в митохондриите (Гавел последователност за срязване в 40 – та позиция).

2. Продукти на супероксид дисмутази и каталазни гени при дрожди с индустриално значение; експресия и биохимични характеристики

Въз основа на проведените биоинформатични изследвания беше установено, че гени, кодиращи ключови белтъци от ензимната и не-ензимната антиоксидантна защитна система, присъстват при всички изследвани щамове дрожди, като показват висок процент на хомоложност. Освен това, при дрожди с респираторен и оксидативен тип на метаболизъм, беше показано, че изучаваните белтъци, притежават сигнали, даващи им възможност за насочване към допълнителни субклетъчни структури. Този факт обуславя и вероятната им по-висока клетъчна пластичност и устойчивост към различни стресови въздействия. С цел потвърждаване на фенотипната изява на тези генетично детерминирани характеристики беше изследвана експресията и регулацията на някои ключовите антиоксидантни ензими –СОД и каталаза при 5 щамове дрожди, отнасящи се към видове, намиращи широко приложение в биотехнологията, генетиката и медицината.

2.1. Активност и изоензимен профил на СОД белтъци

С цел изясняване на промяната в активността на супероксид дисмутазата при метаболитно различни дрождеви видове е проведено култивиране на *Saccharomyces cerevisiae* - представител на дрожди с ферментативен тип метаболизъм, *Kluyveromyces marxianus*, *Hansenula polymorpha* и *Pichia pini* – респираторни щамове и оксидативни

щамове *Cryptococcus neoformans* и *Rhodotorula glutinis*, на стандартна хранителна среда (YEPD) и условия (pH = 6,5, T = 30°C, разбъркване 204 об/мин, аерация). В експоненциална фаза на растеж е отделена биомаса, която е подложена на механично разрушаване за получаване на безклетъчни екстракти. Така получените проби са анализирани спектрофотометрично за определяне на общата СОД активност. Получените данни са представени на **таблица 10**.

При щамове *S. cerevisiae*, *H. polymorpha*, *P. pini* и *C. neoformans* е измерена сравнително ниска специфична обща СОД ензимна активност. Анализът на тоталната СОД активност при дрожди от щама *Cryptococcus neoformans* показва повишена ензимна активност в сравнение с представителите с ферментативен метаболизъм (*Saccharomyces cerevisiae*).

Измерената активност на обща СОД при шам *R. glutinis*, надвишава с около 60 % отчетената при ферментативния представител. Независимо от еднотипния метаболизъм, общата активност на СОД при *R. glutinis* е около 50% по – висока в сравнение с тази при *C. neoformans*.

Най-висока обща СОД активност е установена в безклетъчни екстракти на представителите на *K. marxianus*, която е два пъти по-висока от тази, измерена при ферментативните *S. cerevisiae*.

Проведения електрофоретичен анализ на щамове *S. cerevisiae* и *K. marxianus* доказва наличие на една цианид-чувствителна Cu/Zn СОД и две манган съдържащи изоензимни форми с различна електрофоретична подвижност.

Микроорганизъм	Cu/Zn СОД	Mn СОД	СОД [U/mg белтък]
	Rm		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.46	0.37	16,5
		0.40	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.11	0.31	35,5
		0.41	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.10	0.40	24,3
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.50	0.62	16,79
<i>Hansenula polymorpha</i>	0.29	0.34	17,1
		0.54	
<i>Pichia pini</i>	0.27	0.34	8,8
		0.47	

Таблица 10. Електрофоретична подвижност (Rm) и специфична активност на СОД в безклетъчен екстракт от щамове *S. cerevisiae*, *Kl. marxianus*, *H. polymorpha*, *P. pini*, *R. glutinis* и *C. neoformans*.

Електрофоретичният профил на нативна СОД при двата метилотрофни микроорганизма показва сходство: наблюдават се една Cu/Zn СОД и две форми на Mn СОД с различна електрофоретична подвижност.

Електрофоретичният анализ на супероксид дисмутазите при всички изследвани респираторни щамове показва наличие на различен ензимен профил. След специфично оцветяване и инхибиране на Cu/Zn СОД се установи, че независимо от по-високата молекулна маса на манган съдържащия ензим, при *K. marxianus* той показва по-висока електрофоретична подвижност в сравнение с Cu/Zn СОД.

При *H. polymorpha* и *P. pini* наблюдаваният подобен на *K. marxianus* профил по всяка вероятност също се дължи както на гликозилиране на ензима (Holdom *et al.*, 1996, Nedeva *et al.*, 2009).

При щам *R. glutinis* се наблюдава една Cu/Zn СОД с относителна подвижност много близка до тази при *K. marxianus* (0.10 и 0.11) и само една ивица, специфично оцветена за Mn СОД. Не е доказано наличие на C-терминален въглехидратен мотив при анализи на щам *R. glutinis*.

В клетките на *R. glutinis* кооперативно с Cu/Zn СОД в антиоксидантната ензимна защита участва и Mn СОД. Съвместното действие на двата СОД ензима, валидно за всички еукариоти, е характерно и за *R. glutinis*.

Идентичен с този при *R. glutinis* е и ензимният профил на другия представител на дрожди с оксидативен тип метаболизъм *C. neoformans*. Една специфично оцветена ивица за Cu/Zn СОД с относителна подвижност 0.50 и останала след въздействие с 2 mM KCN една ивица, отговаряща на Mn СОД с относителна подвижност 0.62. Стойностите, изчислени за относителната подвижност (Rm) на двата СОД ензима са представени на **таблица 10**.

Наличието на две специфично оцветени след инхибиране с калиев цианид ивици за Mn СОД е интересен факт, който се наблюдава и при изследване на електрофоретичния ензимен профил на представителите на родове *Kluyveromyces*, *Pichia* и *Hansenula*.

2.2. Активност и изоензимен профил на каталазни белтъци

Проведените анализи на ензимната активност в безклетъчни екстракти от изследваните дрождеви щамове показват сравнително ниска ензимна активност, измерена при щам *S. cerevisiae* и повече от 5 пъти по-висока специфична ензимна активност, измерена при *K. marxianus*, *R. glutinis*, *H. polymorpha* и *P. pini*.

Каталазната ензимна активност при щам *R. glutinis*, *H. polymorpha* и *P. pini* е с около 15 - 20 % по ниска от тази при *K. marxianus*.

Специфичната ензимна активност на каталазата при *C. neoformans* е два пъти по-висока от отчетената при ферментативния щам, а тази при *R. glutinis* – 4 пъти по-висока, което е пряко свързано с особеностите на оксидативния метаболизъм при тези дрождеви микроорганизми.

За определяне на електрофоретичния ензимен профил на каталаза при изследваните щамове е осъществена 10 % нативна полиакриламидна гел електрофореза. Електрофоретично разделените безклетъчни екстракти са визуализирани по метода, описан от Petrova *et al.* (2002).

Проведеният електрофоретичен анализ на безклетъчен екстракт от щамове *S. cerevisiae*, *K. marxianus* и *R. glutinis* доказва наличие на две каталазни изоензимни форми.. Стойностите, изчислени за относителна подвижност (R_m) на каталазите, са представени на **таблица 11**.

Микроорганизъм	Каталаза	Каталаза [U/mg белтък]
	R_m	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.046	3,5
	0.092	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.053	23,47
	0.158	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.197	17,2
	0.250	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.230	5,73
	0.350	
	0.460	
<i>Hansenula polymorpha</i>	0.225	20,87
<i>Pichia pini</i>	0.233	22,97

Таблица 11. Електрофоретична подвижност (R_m) и специфична активност на каталаза в безклетъчен екстракт от щамове *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *R. glutinis*, *C. neoformans*, *H. polymorpha* и *P. pini*.

В три от анализиранияте щамове: *S. cerevisiae*, *K. marxianus* и *R. glutinis*, независимо от разликите в техния таксономичен статус и ферментационен капацитет, се установява наличието на две каталази. Електрофоретичният ензимен профил на

двата метилотрофни щама демонстрира наличие на един каталазен ензим с електрофоретична подвижност 0.225 при *H. polymorpha* и 0.233 при щам *P. pini*. Визуализираната ензимна форма по всяка вероятност е пероксизомална каталаза А, която е представена при всички представители на метилотрофните дрождеви щамове и е с жизненоважно значение в процеса на детоксикация на водороден пероксид, генериран по време на метаболизма на метанола.

При род *Cryptococcus* са представени четири каталазни изоензима, които са локализирани в пероксизомите, цитоплазмата, спорите и извън клетката, кодирани от силно консервативни гени локализирани в хромозома 1 и хромозома 4. Наличието само на 3, а не на 4 ивици, вероятно се дължи на факта, че *Cta3* е свързан с процеса на спорулация и при тези условия на култивиране ензимът не се експресира.

3. Влияние на въглеродния метаболизъм върху експресията на генните за каталаза и СОД

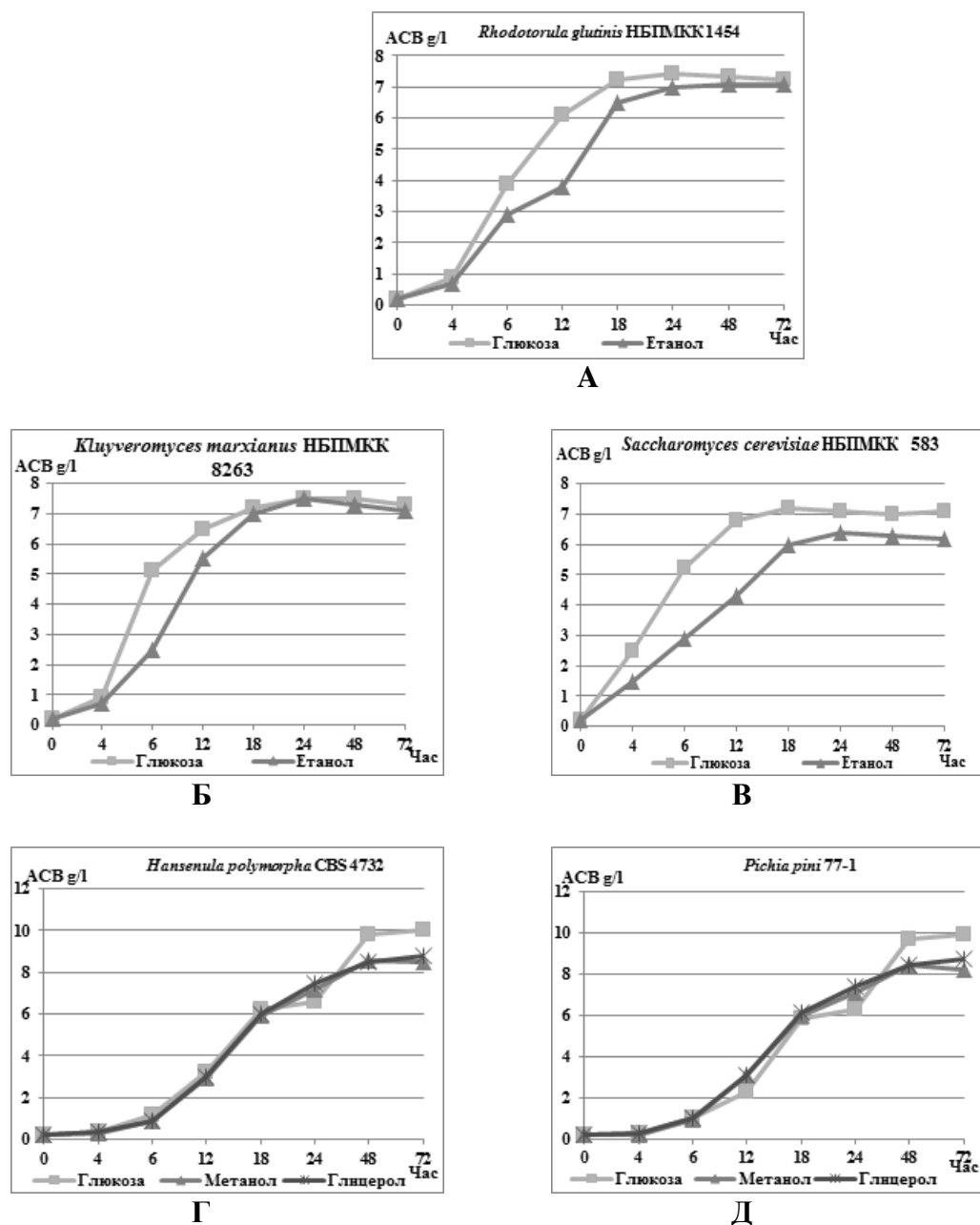
3.1. Растеж на микроорганизмите и клетъчен добив

Влиянието на различни въглерод-съдържащи субстрати върху активността на ензимите СОД и каталаза при ферментативни дрожди *Saccharomyces cerevisiae* (Крабтри положителен), респираторни *Kluveromyces marxianus* (Крабтри отрицателен), *Hansenula polymorpha* и *Pichia pini* и облигатно оксидативен щам *Rhodotorula glutinis*, бяха изучени след култивиране за 72 часа на четири различни среди – YEPD, YEPЕ, YЕРМ, YЕРG, съдържащи съответно 2 % глюкоза, 1 % етанол, 1 % метанол и 1 % глицерол като източници на въглерод и енергия. Целта бе да се установи до колко ефективно е усвояването на избраните субстрати и какво е тяхното влияние върху активността на антиоксидантните ензими при метаболитно различните дрождеви видове. Културите са анализирани по време на експоненциална и стационарна фаза на растеж и е определена съответно консумацията на глюкоза, метанол и глицерол, както и синтезата на биомаса (**фигура 7**).

Всички изследвани дрождеви щамове, усвояват активно глюкозата, като експоненциалната фаза на растеж е достигната между 12 и 18 час от началото на култивирането. Данните, получени след изчисляване на добивния коефициент, показват най-високи стойности при *K. marxianus* (0.42 ± 0.02) и *R. glutinis* (0.38 ± 0.08). Резултатите показват, че усвояването на субстрата е ефективно и вероятно е свързано с респираторния тип метаболизъм. Изчисленият добивен коефициент за *S. cerevisiae* е по-нисък (0.35 ± 0.05). Построените растежни криви показват диауксичен растеж на *H.*

polymorpha и *P. pini* на среда с въглероден източник глюкоза. Изчислени са добивните коефициенти $Y_{x/s}$ за *H. polymorpha* (0.27 ± 0.02) и *P. pini* (0.28 ± 0.01).

С цел индукция на оксидативен метаболизъм при *S. cerevisiae* и последващото му сравнение с останалите метаболитно отличаващи се щамове дрожди, въглеродният източник в средата е заменен с етанол, съответно за щамове *S. cerevisiae*, *K. marxianus* и *R. glutinis* и с метанол или глицерол за метилотрофните представители.



Фигура 7 Растежни криви на щамове *Saccharomyces cerevisiae* НБПМКК 583 (А), *Kluyveromyces marxianus* НБПМКК 8263 (Б), *Rhodotorula glutinis* НБПМКК 1454 (В), *Hansenula polymorpha* CBS 4732 (Г) и *Pichia pini* 77-1 (Д), култивирани на среди с различни въглеродни източници.

Етанолът се усвоява ефективно и от трите изследвани щама, като изчислените добивни коефициенти са в диапазон от 0.52 ± 0.06 и 0.56 ± 0.03 . Експоненциална фаза на растеж се наблюдава между 16 – 18 час от началото на култивирането. Изчислените добивни коефициенти за двата метилотрофни щама, култивирани на среди, съдържащи метанол и глицерол, са съответно: $Y_{Gly} = 0.30 \pm 0.05$, $Y_{Met} = 0.47 \pm 0.01$ за *H. polymorpha* и $Y_{Gly} = 0.30 \pm 0.03$ и $Y_{Met} = 0.48 \pm 0.09$ за *P. pini*.

хр. среда/ Параметри Микроорганизъм	Глюкоза	Глюкоза	Етанол	Етанол	Метанол	Метанол	Глицерол	Глицерол
	μ^{max}	$Y_{x/s}$	μ^{max}	$Y_{x/s}$	μ^{max}	$Y_{x/s}$	μ^{max}	$Y_{x/s}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.32±0.03	0.35±0.05	0.22±0.01	0.52±0.06	–	–	–	–
<i>Kluveromyces marxianus</i>	0.31±0.02	0.42±0.02	0.25±0.02	0.55±0.05	–	–	–	–
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.30±0.02	0.38±0.08	0.24±0.01	0.56±0.03	–	–	–	–
<i>Hansenula polymorpha</i>	0.30±0.02	0.27± 0.02	–	–	0.10± 0.09	0.47± 0.01	0.15± 0.02	0.30± 0.05
<i>Pichia pini</i>	0.31±0.01	0.28± 0.01	–	–	0.1± 0.06	0.48± 0.09	0.15± 0.02	0.30± 0.03

Таблица 12. Кинетични параметри определени при растеж на щамове *Saccharomyces cerevisiae* НБПМКК 583, *Kluveromyces marxianus* НБПМКК 8263, *Rhodotorula glutinis* НБПМКК 1454, *Hansenula polymorpha* CBS 4732 и *Pichia pini* 77-1, култивирани на среди с различни въглеродни източници.

3.2. Особености на СОД ензими

3.2.1. Специфична ензимната активност на СОД при култивиране на среди, съдържащи етанол, метанол и глицерол

С цел изучаване на влиянието на въглеродния източник върху антиоксидантната ензимна защита на клетките щамове *S. cerevisiae*, *K. marxianus* и *R. glutinis* бяха култивирани на среда, съдържаща етанол като единствен въглероден източник. Щамове *H. polymorpha* и *P. pini* бяха култивирани на среда съдържаща глицерол, който преминава чрез пасивна дифузия през мембраната, фосфорилира се от глицерол киназа в цитозола и се окислява от митохондриалната глицерол фосфат оксидоредукатаза, в резултат на което се повишава количеството на митохондрии в клетката, респективно техния дихателен капацитет. Също така метилотрофните представители бяха култивирани на среда, съдържаща ROS-генериращ метанол, усвояващ се в пероксизомите и повишаващ пероксизомалната пролиферация.

Влиянието на въглеродния източник върху активността на СОД при изследваните дрождеви щамове е изучено след провеждане на спектрофотометричен анализ на безклетъчен екстракт, получен след механично разрушаване на биомаса отделена в експоненциалната фаза на растеж. Получените данни са представени на **таблица 13**.

Общата активност на СОД, измерена в безклетъчен екстракт от *S. cerevisiae*, култивиран на среда с въглероден източник етанол, нараства с приблизително 40 % в сравнение с ензимната активност, измерена в среда с въглероден източник глюкоза.

Повишаването на специфичната ензимна активност при щамове *K. marxianus* и *R. glutinis* при култивиране на етанол съдържаща среда е с около 10 % - 15 % спрямо активностите, измерени при култивиране на глюкозна среда. Промяната в измерените активности се дължи на типа метаболизъм на двата изучавани щамове и начина на усвояване на респираторните субстрати от тях.

При проведените спектрофотометрични анализи максимална тоталната СОД активност беше установена в безклетъчен екстракт от изследваните метилотрофни дрождеви щамове, култивирани на среда съдържаща метанол. Отчетената в безклетъчен екстракт на *H. polymorpha* специфична ензимна активност достига стойност 43.56 U/mg белтък, което показва повече от два пъти повишаване на активността в резултат от култивиране на токсичен, ROS-генериращ субстрат, в сравнение с активността, отчетена при култивиране на глюкоза. При *P. pini* наблюдаваното повишаване на ензимната активност е приблизително два пъти.

При растеж на глицерол като въглероден субстрат двата щамове показват междинни стойности по отношение на СОД активността в сравнение с резултатите, получени при култивиране на глюкоза и метанол.

Измерените стойности за специфичната ензимна активност при всички изследвани щамове са представени на **таблица 13**.

3.2.2. Влияние на въглеродния субстрат върху електрофоретичния профил на СОД ензими

Изучаването на влиянието на въглеродния източник върху експресията на супероксид дисмутазиите ензими при дрожди с различен тип метаболизъм продължи с анализ на електрофоретичния профил на ензимите след култивиране на *S. cerevisiae*, *K. marxianus* и *R. glutinis* на среда, съдържаща 1 % етанол и *H. polymorpha* и *P. pini* на среди, съдържащи 1 % метанол и 1 % глицерол.

Микроорганизъм	Въглероден източник	Rm		Ензимна активност на СОД U/mg белтък
		Cu/Zn СОД	Mn СОД	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Етанол	0.46	0.37	26.5
			0.40	
	Глюкоза	0.46	0.37	16.5
			0.40	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Етанол	0.11	0.31	39
			0.41	
	Глюкоза	0.11	0.31	35.5
			0.41	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Етанол	0.10	0.40	26.1
	Глюкоза	0.10	0.40	24.3
<i>Hansenula polymorpha</i>	Метанол	0.29	0.1	43.56
			0.34	
			0.54	
	Глюкоза	0.29	0.34	17.1
			0.54	
	Глицерол	0.29	0.34	23.01
0.54				
<i>Pichia pinii</i>	Метанол	0.27	0.12	19.39
			0.34	
			0.47	
	Глюкоза	0.27	0.34	8.8
			0.47	
	Глицерол	0.27	0.34	12.89
0.47				

Таблица 13. Електрофоретична подвижност (Rm) на СОД и специфична активност на СОД (U/mg белтък) в безклетъчен екстракт от шамове *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula glutinis*, *Hansenula polymorpha* и *Pichia pinii*, култивирани на различни въглеродни източници.

За определяне на електрофоретичния ензимен профил на СОД изследваните два щамове дрожди, асимилиращи метанол, беше проведена 8 % нативна полиакриламидна гел електрофореза. Електрофоретично разделените безклетъчни екстракти бяха визуализирани без и с предварително третиране с 6 mM KCN (таблица 13). Използването на KCN е с цел инхибиране на Cu/Zn СОД.

Проведения електрофоретичен анализ на безклетъчен екстракт от шамове *H. polymorpha* и *P. pini* доказва наличие на цианид-чувствителна Cu/Zn СОД с Rm 0.29, представена и при двата щама независимо от въглеродния източник в средата. След провеждане на инхибиторен анализ е установено наличие на три Mn СОД ензимни форми с електрофоретична подвижност съответно 0.1, 0.34 и 0.54 при *H. polymorpha* и 0.12, 0.34 и 0.47 при шам *P. pini*. Две от ензимните форми се запазват при култивиране на среди с въглероден източник глюкоза и глицерол. Това са съответно Mn СОД с електрофоретична подвижност 0.34 и 0.54 при *H. polymorpha* и 0.34 и 0.47 при шам *P. pini*. Получените резултати от изследването на електрофоретичния ензимен профил на СОД при двата щама метанол-асимилиращи дрожди предполагат наличие на няколко ензимни форми на СОД, индуцирани от ROS-генериращия субстрат – метанол.

3.3. Особености на каталазните ензими

3.3.1. Специфична ензимната активност на каталаза при култивиране на среди, съдържащи етанол, метанол и глицерол

Влиянието на въглеродния източник върху активността на каталаза при изследваните дрождеви шамове е изучено след провеждане на спектрофотометричен анализ на безклетъчен екстракт, получен след механично разрушаване на биомаса отделена в експоненциалната фаза на растеж. Получените данни са представени на **таблица 14**.

При шамове *S. cerevisiae*, *K. marxianus* и *R. glutinis*, култивирани на среда съдържаща етанол като единствен въглероден източник, се наблюдава увеличаване на каталазната ензимна активност под влияние на хранителния субстрат. Нарастването на ензимната активност при *S. cerevisiae* е повече от два пъти. При шамове *K. marxianus* и *R. glutinis* измереното увеличение на специфичната ензимна активност е съответно с 30 % и 50 %. При *H. polymorpha* увеличаването на ензимната активност е със 75 %. При *P. pini* увеличаването на ензимната активност е два пъти (**таблица 14**). Освен глицерол като единствен въглероден източник в средата беше използван и метанол. Измерената ензимна активност при *H. polymorpha* е 62.43 U/mg белтък, а при *P. pini* - 58.81 което представлява три пъти по-висока стойност от тази, отчетена на среда глюкоза (съответно 22.87 U/mg белтък и 22.97 U/mg белтък).

3.3.2. Влияние на въглеродния източник върху електрофоретичния профил на каталазни ензими

Анализът на електрофоретичния профил на каталазните ензими след култивиране на *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* и *Rhodotorula*

glutinis на среда съдържаща 1 % етанол и 2 % глюкоза показва, че култивирането на микроорганизмите на тези среди не дава отражение върху електрофоретичния профил на изучаваните ензими (таблица 14).

Визуализацията на каталазните ензими при *Hansenula polymorpha* и *Pichia pini* показва, че в резултат от усвояването на метанол и глицерол се експресира допълнителна ивица с електрофоретична подвижност съответно 0.132 и 0.15.

Микроорганизъм	Въглероден източник	Rm	Ензимна активност на каталаза U/mg белтък
		Каталаза	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Глюкоза	0.046	3.5
		0.092	
	Етанол	0.046	7.63
		0.092	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Глюкоза	0.053	23.47
		0.158	
	Етанол	0.053	29.8
		0.158	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Глюкоза	0.197	17.2
		0.250	
	Етанол	0.197	23.4
		0.250	
<i>Hansenula polymorpha</i>	Метанол	0.225	62.43
		0.132	
	Глюкоза	0.225	20.87
		0.132	
<i>Pichia pini</i>	Метанол	0.233	58.81
		0.154	
	Глюкоза	0.233	22.97
		0.154	
<i>Pichia pini</i>	Глицерол	0.233	47.75
		0.154	

Таблица 14. Електрофоретична подвижност (Rm) на каталаза специфична активност на каталаза U/mg белтък в безклетъчен екстракт от щамове *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula glutinis*, *Hansenula polymorpha* и *Pichia pini*, култивирани на различни въглеродни източници.

За определяне на електрофоретичния ензимен профил на каталаза при изследваните два щамове метилотрофни дрожди бе проведена 8 % нативна полиакриламидна гел електрофореза. Получените резултати са представени на **таблица 14**.

Проведеният електрофоретичен анализ установи наличие на една каталаза с електрофоретична подвижност 0.225 при *H. polymorpha* и 0.233 при *P. pini* в безклетъчен екстракт от метанол–усвояващите щамове, култивирани на среда съдържаща глюкоза. При растеж на изследваните два щамове на метанол и глицерол като единствен въглероден източник се наблюдават две ензимни форми с електрофоретична подвижност 0.225 и 0.132 при *H. polymorpha* и 0.233 и 0.154 при *P. pini* (**таблица 14**).

4. Влияние на високи температури и редуциращи агенти върху стабилността на СОД и каталаза при метилотрофни дрожди от р. *Hansenula* и р. *Pichia*

Използването на *in silico* подход за прогнозиране и профилиране на гените, отговорни за експресията на антиоксидантните ензими и тиоловите белтъци при дрожди с различен тип на метаболизъм показва, че тези микроорганизми използват сходни механизми за осигуряване на функционалната стабилност на тяхната антиоксидантна защитна система. От друга страна при проследяване влиянието на въглеродния субстрат върху електрофоретичния профил на СОД и каталазните ензими при изследваните дрождеви микроорганизми беше установено, че при представителите на р. *Hansenula* и р. *Pichia* в условия на стрес (усвояване на токсичния субстрат метанол), клетката може да се адаптират към променящите се физиологични условия посредством синтезата на допълнителни мултимерни форми на ключовите си антиоксидантни ензими. Във връзка с това беше установено, че при оценка на клетъчната пластичност трябва да се отчитат както генетичните детерминанти на вида, така и възможността клетката да притежава механизми за отговор към стресови въздействия и на метаболитно ниво.

4.1.Особености на СОД ензимите

За първи път при метилотрофните щамове дрожди от родовете *Hansenula* и *Pichia* беше установено, че при усвояване на метанол се наблюдават различни електрофоретични варианти на Mn СОД ензим, които имат по-висока молекулна маса. Тъй като тези мултимерни форми се появяват само при усвояването на този токсичен

субстрат, когато вътреклетъчната концентрация на ROS е най-висока, те може би играят важна роля за съхраняване на редокс баланса на клетката. Във връзка с това беше проведено по-задълбочено изследване на характеристиките на СОД ензимите при тези представители на дрождевите микроорганизми.

4.1.1. Изследване влиянието на високи температури върху активността и електрофоретичния ензимен профил на СОД

Отделената в експоненциална фаза на растеж биомаса от щамове *H. polymorpha* и *P. pinii* бе подложена на механично разрушаване за получаване на безклетъчни екстракти. Така получените проби бяха третираны при температури 50°C и 75°C, съответно за 1, 5 и 10 минути. След проведен спектрофотометричен анализ е определена СОД активност на третираните проби. Специфичната ензимна активност, измерена в третираните безклетъчни екстракти, е сравнена с отчетената в безклетъчен екстракт, получен след култивиране на микроорганизмите на среди с въглероден източник глюкоза, метанол и глицерол при 30°C, без последващо третиране с високи температури. Ензимната стабилност е изразена в проценти като за 100 % е приета активността на нетретираните контролни проби. Получените данни са представени на **таблица 15**.

Микроорганизъм /хр. среда t°C/ време	<i>H. polymorpha</i>			<i>P. pinii</i>		
	Глюкоза	Метанол	Глицерол	Глюкоза	Метанол	Глицерол
30°C	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
50°C/1'	98.71 %	99.52 %	90 %	75.22 %	71.01 %	99.84 %
50°C/5'	91.64 %	64.65 %	83.44 %	73.97 %	43.57 %	92.31 %
50°C/10'	30.35 %	41.92 %	50.37 %	71.70 %	31.12 %	90.06 %
75°C/1'	89.36 %	89.39 %	89.66 %	67.04 %	40.74 %	62.83 %
75°C/5'	77.19 %	40.13 %	58.84 %	61.93 %	31.82 %	25.60 %
75°C/10'	25.32 %	25.01 %	17.32 %	41.25 %	23.92 %	16.98 %

Таблица 15. Устойчивост на активността на СОД (%) в безклетъчен екстракт от щамове *H. polymorpha* и *P. pinii*, култивирани на среда с различен въглероден източник и третираны с нарастващи температури.

Общата ензимна активност на СОД при *H. polymorpha* и *P. pinii* е определена спектрофотометрично. Най-висока специфична ензимна активност, както бе описано

в точка 3.2.1 от глава „Резултати и обсъждане” (Специфична ензимна активност на СОД при култивиране на среди съдържащи етанол, метанол и глицерол) беше измерена в безклетъчен екстракт на шамовете, култивирани на среда съдържаща метанол като единствен въглероден източник (43.56 U/mg белтък при *H. polymorpha* и 19.39 U/mg белтък при *P. pini*). Най-ниска е ензимната активност отчетена при култивиране на среда, съдържаща глюкоза (17.10 U/mg белтък при *H. polymorpha* и 8.8 U/mg белтък при *P. pini*). След третиране на пробите с нарастваща температура и времетраене на загряването, се наблюдава тенденция към намаляване на специфичната активност на супероксид дисмутазата, като при 75°C/10 мин. тя е най-ниска и при за двата анализирани шам, като представлява средно около 30 % от тоталната активност на СОД в сравнение с тази, измерена при контролните проби. Забелязва се значителна термоустойчивост на СОД ензима при температура 75°C/1 мин, при която той запазва около 89 % от активността си при шам *H. polymorpha* и средно около 55 % при шам *P. pini*. При *H. polymorpha* ензимът показва приблизително 2 пъти по-висока активност и на трите въглеродни източника при третиране с 50°C и 75°C, сравнена с тази на шам *P. pini*, което по всяка вероятност се дължи на по-високата термотолерантност на първия шам. Получените резултати дават основание да се твърди, че природата на въглеродния източник не оказва влияние върху термостабилността на СОД. Ензимната активност се запазва до 75°C/10 мин. при трите използвани въглеродни източника. Измерената активност на СОД показва същата закономерност, наблюдавана при контролни проби, култивирани на среди с различен въглероден източник без последващо третиране с нарастващи температури. Максимална специфична ензимна активност се наблюдава след култивиране на среда, съдържаща метанол, по-ниска - на глицерол и най-ниска на глюкоза.

Електрофоретичният анализ на изследваните метилотрофни дрождеви шамове, култивирани на среди с три различни въглеродни източника и инкубирани с нарастващи температури, доказва наличие на четири ензимни форми на СОД. Проведените нативни ПАГЕ ясно доказват наличие на няколко термостабилни ензимни форми, които не изчезват след инкубиране на безклетъчните екстракти на 75°C за 1 мин. Една линия с електрофоретична подвижност 0.34 и при двата анализирани шам се запазва след третиране със 75°C за 10 мин. Специфично оцветените за СОД ивици с електрофоретична подвижност съответно 0.54 при шам *H. polymorpha* и 0.47 при шам *P. pini* са активни при третиране със 75°C за 1 мин., след което изчезват. Третата, характерна за ензимния профил на изследваните шамове култивирани на среда с

въглероден източник метанол Mn СОД, с относителна подвижност 0.105 при щам *H. polymorpha* и 0.12 при щам *P.pini* не се визуализира след третиране на безклетъчните екстракти с 50°С за 1 минута.

За определяне на влиянието на високи температури върху ензимния профил на СОД при метилотрофни дрожди, безклетъчен екстракт от щамове *H. polymorpha* и *P. pini* третиран с нарастващи температури бе подложен на 8 % нативна ПАГЕ. Електрофоретично разделените безклетъчни екстракти бяха визуализирани без и с предварително третиране с 6 mM KCN с цел инхибиране на Cu/Zn СОД.

Електрофоретичният анализ на изследваните метилотрофни дрождеви щамове, култивирани на среди с три различни въглеродни източника и инкубирани с нарастващи температури, доказва наличие на четири ензимни форми на СОД. Три от визуализираните ензима са Mn СОД с Rm при *H. polymorpha*: 0.1, 0.34 и 0.54 и 0.12, 0.34 и 0.47 при щам *P. pini*. Експресират се три СОД ензима, два от които Mn СОД с Rm при *H. polymorpha*: 0.34 и 0.54 и при щам *P. pini*: 0.34 и 0.47. След инхибиране с KCN се установи, че и при двата метилотрофни щамове се експресира един мед/цинк съдържащ супероксид дисмутазен ензим с Rm съответно 0.29 и 0.27 при *H. polymorpha* и *P. pini*.

Проведените нативни ПАГЕ ясно доказват наличие на няколко термостабилни ензимни форми, които не изчезват след третиране на безклетъчните екстракти със 75°С за 1 мин. Една линия с електрофоретична подвижност 0.34, отговаряща на Mn СОД и при двата анализирани щамове се запазва след третиране със 75°С за 10 мин. и може да бъде отличена с висока термостабилност. Специфично оцветените за СОД линии с електрофоретична подвижност съответно 0.54 при щам *H. polymorpha* и 0.47 при щам *P.pini* са активни при третиране със 75°С за 1 мин. след което изчезват. Третата, характерна за ензимния профил на изследваните щамове култивирани на среда с въглероден източник метанол Mn СОД с относителна подвижност 0.105 при щам *H. polymorpha* и 0.12 при щам *P.pini*, не се визуализира след третиране на безклетъчните екстракти с 50°С за 1 минута.

Получените резултати показват, че Cu/Zn СОД с електрофоретична подвижност 0.29 за *H. polymorpha* и 0.27 за *P. pini* демонстрира значителна термостабилност при култивиране на щамовете и на трите използвани въглеродни източника.

4.1.2. Влияние на β – меркаптоетанол върху активността и устойчивостта на мултимерните форми на СОД от метилотрофни дрожди

Влиянието на редуциращи агенти върху ензимната активност и електрофоретичния профил на СОД при метилотрофни дрожди беше изследвано след инкубиране на безклетъчен екстракт, получен при механично разрушаване на отделена в експоненциална фаза биомаса с 30, 50 и 100 mM β меркаптоетанол. *H. polymorpha* и *P. pinii* бяха култивирани на хранителна среда с три различни въглеродни източника: метанол, глюкоза и глицерол.

Ензимната стабилност е изразена в проценти като за 100 % е приета активността на нетретираните контролни проби. Получените данни са представени на **таблица 16**.

Микроорганизъм /хр. среда конц. β ME	<i>H. polymorpha</i>			<i>P. pinii</i>		
	Глюкоза	Метанол	Глицерол	Глюкоза	Метанол	Глицерол
нетретиран	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
30 mM β ME	35.09 %	30.35 %	33.50 %	18.28 %	10.88 %	34.6 %
50 mM β ME	15.93 %	9.50 %	6.65 %	15.11 %	7.94 %	15.28 %
100 mM β ME	12.22 %	3.90 %	4.65 %	13.63 %	6.75 %	13.26 %

Таблица 16. Устойчивост на активността на СОД (%) в безклетъчен екстракт от шамове *H. polymorpha* и *P. pinii*, култивирани на среда с различен въглероден източник и третиран с β меркаптоетанол.

Установи се, че след третиране с 30 mM β -меркаптоетанол тоталната активност на СОД, отчетена при щам *H. polymorpha*, намалява с около 70 % и с 80 – 90% при щам *P. pinii* при култивиране и на трите въглеродни източника. След инкубиране на пробите с 50 mM β -меркаптоетанол се запазва средно около 10 – 15 % от тоталната активност на СОД и при двата щама. Инкубирането с 100 mM β -меркаптоетанол води до почти пълна загуба на супероксид дисмутазната активност и при двата щама, като измерените активности са между 2.09 и 1.07 U/mg белтък. За определяне на електрофоретичния ензимен профил на СОД при култивиране на изследваните два щама метилотрофни дрожди на различни въглеродни източници и след третиране с нарастващи концентрации на β -меркаптоетанол е проведена 8 % нативна полиакриламидна гел електрофореза. При визуализиране на електрофоретично разделените проби е проведен и инхибиторен анализ с 6 mM KCN инхибитор на Cu/Zn СОД...

Получените електрофоретични профили показват, че след инкубиране с 30, 50 и 100 mM β -меркаптоетанол и при двата изследвани щама се запазва активността само на една ензимна форми на СОД, независимо от въглеродния източник в средата. След инхибиране с 6 mM KCN се установи, че устойчивият на редуциращото съединение изоензим е Cu/Zn СОД с електрофоретична подвижност 0.29 при щам *H. polymorpha* и 0.27 при *P. pini*.

4.2. Особености на каталазните ензими

Появата на две ензимни форми на каталаза при култивиране на щамовете *H. polymorpha* и *P. pini* на среда, съдържаща метанол и глицерол, постави въпроса за тяхното значение в детоксикацията на голямото количество водороден пероксид, образуван при разграждането на тези субстрати. От друга страна интерес представлява и изучаването на връзката между тяхната стабилност и ролята им в поддържането на редокс хомеостазата в клетката. Именно затова последващите изследвания бяха свързани с характеризиране на термичната стабилност и устойчивостта спрямо химични агенти на каталазните ензими при респираторните метилотрофни дрожди от родовете *Pichia* и *Hansenula*.

4.2.1. Изследване влиянието на високи температури върху активността и електрофоретичния ензимен профил на каталаза

Отделената в експоненциална фаза на растеж биомаса от щамовете *H. polymorpha* и *P. pini* бе подложена на механично разрушаване за получаване на безклетъчни екстракти. Така получените проби бяха инкубирани при температури 50°C и 75°C, съответно за 1, 5 и 10 минути. След проведен спектрофотометричен анализ бе определена тоталната каталазна активност на третираните проби.. Специфичната ензимна активност, измерена в третираните безклетъчни екстракти, е сравнена с отчетената в безклетъчен екстракт, получен след култивиране на микроорганизмите на среди с въглероден източник глюкоза, метанол и глицерол на 30°C, без последващо третиране с високи температури. Ензимната стабилност е изразена в проценти като за 100 % е приета активността на нетретираните контролни проби. Получените данни са представени на **таблица 17**.

Микроорганизъм /хр. среда t°C/ време	<i>H. polymorpha</i>			<i>P. pini</i>		
	Глюкоза	Метанол	Глицерол	Глюкоза	Метанол	Глицерол
30°C	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
50°C/1'	100 %	80.17 %	87.69 %	36.91 %	60.59 %	30.42 %
50°C/5'	65.64 %	45.11 %	64.05 %	31.34 %	35.31 %	30.38 %
50°C/10'	61.43 %	39.72 %	53.19 %	30.69 %	33.51 %	22.11 %
75°C/1'	50.60 %	43.84 %	44.03 %	11.66 %	18.42 %	21.73 %
75°C/5'	43.55 %	22.09 %	28.97 %	1 %	2.55 %	2.97 %
75°C/10'	19.17 %	13.69 %	10.31 %	0.3 %	1 %	1 %

Таблица 17. Устойчивост на активността на каталаза (%) в безклетъчен екстракт от шамове *H. polymorpha* и *P. pini*, култивирани на среда с различен въглероден източник и третиран с нарастващи температури.

Резултатите от проведения анализ показват, че с увеличаване на температурата и продължителността на третиране, специфичната каталазна активност намалява и при двата щама. След инкубиране при 75°C за 10 мин. остатъчната активност в безклетъчен екстракт от *H. polymorpha* е средно 14 % и в *Pichia pini* - средно 0.8 % в сравнение с тази при нетретиран проби. Специфичната ензимната активност при *H. polymorpha* се запазва относително висока при 75°C/1мин. – 40 % от първоначалната. При щам *Pichia pini* още при 50°C/1 мин. се отчита рязък спад в активността – с около 60-70 %.

За определяне на влиянието на високи температури върху ензимния профил на каталаза при метилотрофни дрожди, безклетъчен екстракт от шамове *H. polymorpha* и *P. pini*, третиран с нарастващи температури бе подложен на 8 % нативна ПАГЕ.

Получените резултати показват, че в безклетъчен екстракт от двата метилотрофни щама, култивирани на среда съдържаща глюкоза, се установи наличие само на една ензимна каталазна форма, която е устойчива и се визуализира при инкубиране на 75°C за 1 мин.

4.2.2. Изследване на влиянието на β меркаптоетанол върху активността и електрофоретичния ензимен профил на каталаза при метилотрофни дрожди от р. *Hansenula* и р. *Pichia*.

Влиянието на редуциращи агенти върху ензимната активност и електрофоретичния профил на каталаза при метилотрофни дрожди беше изследвано след инкубиране на безклетъчен екстракт, получен след механично разрушаване на

отделянена в експоненциална фаза биомаса с 30, 50 и 100 mM β меркаптоетанол. *H. polymorpha* и *P. pini* бяха култивирани на хранителна среда с три различни въглеродни източника: метанол, глюкоза и глицерол.

Ензимната стабилност е изразена в проценти като за 100 % е приета активността на нетретираните контролни проби. Получените данни са представени на **таблица 18**.

Микроорганизъм /хр. среда конц. β ME	<i>H. polymorpha</i>			<i>P. pini</i>		
	Глюкоза	Метанол	Глицерол	Глюкоза	Метанол	Глицерол
нетретиран	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
30 mM β ME	12.27 %	9.93 %	1.49 %	4.04 %	4.61 %	4.4 %
50 mM β ME	4.55 %	1.59 %	0.76 %	0.91 %	0.85 %	0.75 %
100 mM β ME	0.63 %	0.17 %	0.13 %	0.17 %	0.086 %	0.087 %

Таблица 18. Устойчивост на активността на каталаза (%) в безклетъчен екстракт от щамове *H. polymorpha* и *P. pini*, култивирани на среда с различен въглероден източник и третиран с β -меркаптоетанол.

След проведения анализ се установи, че при инкубиране на изходните проби с 30 mM β -меркаптоетанол и при двата щама се наблюдава рязък спад в активността на каталазата. При щам *H. polymorpha* остатъчната ензимна активност е около 10 %, при щам *Pichia pini* - около 4 % и при трите изследвани въглеродни източника. Резултатите, демонстрирани на графиката показват, че третиране с 50 mM и 100 mM β -меркаптоетанол и при двата щама води до почти пълна загуба на каталазна активност, независимо от вида на растежния субстрат. В този случай ензимната активност намалява с до 99 % и отчетените активности са в интервала 0.05 - 0.9 U/mg белтък. За установяване на електрофоретичния ензимен профил на каталаза при култивиране на изследваните два щама метилотрофни дрожди на различен въглероден източник и след третиране с β -меркаптоетанол бе проведена 8 % нативна полиакриламидна гел електрофореза.

Получените електрофоретични ензимни профили показват, че на среда с въглероден източник глюкоза единствената наблюдавана форма на каталаза при нетретираните проби запазва активността си и след третиране с 30, 50 и 100 mM β -меркаптоетанол и при двата щама. На среди с метанол или глицерол като въглероден източник се установява, че каталазната ензимна форма с електрофоретична подвижност 0.132 и 0.154 съответно при *H. polymorpha* и *Pichia pini* губи активност още при

третиране с 30 mM β -меркаптоетанол. Електрофоретичният профил на каталаза при изследваните метилотрофни щамове, третирани с β -меркаптоетанол, показва запазване на една активна каталаза, устойчива на третиране със 100 mM β -меркаптоетанол, която въпреки спектрофотометрично определената ниска ензимна активност може да бъде приета за устойчива на редуциращи агенти. При *H. polymorpha* устойчивата каталаза е с електрофоретична подвижност 0.225, при *Pichia pini* - 0.233.

Чрез комбинираното прилагане на *in silico* и биохимични методи бе създаден модел за оценка и интерпретация на различни оксидативни събития, протичащи при стресови условия в еукариотната дрождева клетка. Чрез прилагането на този модел беше установено, че респираторните дрожди от родовете *Pichia* и *Hansenula* показват генетично детерминирани преимущества, включващи дубликации на ключови антиоксидантни ензими (тиоредоксин и глутатион пероксидази, глутатион S-трансферази и глутаредоксини) и локализация на тези белтъци в различни субклетъчни структури. При тях беше установено и функционирането на допълнителни адаптивни стратегии на ниво реализация на генетичната информация: експресия на термостабилни мултимерни форми на Mn СОД и каталаза в условия на повишена вътреклетъчна концентрация на ROS.

Изводи

В резултат на проведените експерименти, бяха формулирани следните изводи:

1. Гените, кодиращи някои ключови белтъци от ензимната и не-ензимната антиоксидантна защитна система при изследваните щамове дрожди, имат висок процент на хомоложност и се приемат за ортолози. Значителна еволюционна дивергенция е установена само за глутамат цистеин лигазата при *C. neoformans*.
2. При дрожди с респираторен и оксидативен тип на метаболизъм, изучаваните белтъци, притежават сигнали (PTS1 и PTS2; клъстер от позитивно заредени а.к. и Гавел последователност за срязване; NLS; С-крайна HDEL последователност), даващи им възможност за насочване на към допълнителни субклетъчни структури (пероксизоми, митохондрии, ядро и ЕПР) в сравнение с ферментативния щам.
3. Изследваните ключови антиоксидантни ензими и белтъците, участващи в глутатионовия метаболизъм, при респираторни и оксидативни дрожди притежават типичните силно консервативни домени, причисляващи ги към семействата на съответните ензими при *S. cerevisiae*. Изключение прави Gtt1 при *K. lactis*, за който не е показано наличие на домен, доказващ категорично глутатион- трансферазна активност.
4. Изследваните щамове дрожди притежават по един *SOD1* и *SOD2* ген. При ферментативните и респираторни представители те се експресират в един Cu/Zn и два Mn СОД изоензима, а при облигатно оксидативни дрожди от родовете *Rhodotorula* и *Cryptococcus* - в един Cu/Zn и един Mn СОД ензим.
5. При всички изследвани щамове дрожди съществува съответствие между броя на каталазните гени и броя на установените изоензими (1 ген / 1 ензим – при р. *Pichia* и р. *Hansenula*; 2 гена / 2 ензима – при р. *Saccharomyces*, р. *Kluveromyces* и р. *Rhodotorula*; 4 гена / 4 ензима – при р. *Cryptococcus*).

6. В условия на повишена концентрация на ROS, при респираторни дрожди от р. *Hansenula* и р. *Pichia*, се наблюдава клетъчен адаптивен отговор: биосинтеза на мултимерни форми на Mn СОД и каталаза.
7. Мултимерните ензимни форми на Mn СОД и каталаза при респираторни дрожди от р. *Hansenula* и р. *Pichia* притежават висока термостабилност и слаба устойчивост на редуциращи агенти.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

В представения за защита дисертационен труд могат да бъдат посочени следните приноси:

1. Проведен е цялостен, сравнителен *in silico* анализ на гените, кодиращи ключови антиоксидантни ензими и белтъци, отговорни за синтеза на глутатион, при дрожди с различен тип на метаболизъм: ферментативен, респираторен и облигатно оксидативен.
2. При изследваните дрожди с окислителен метаболизъм, ключовите белтъци от антиоксидантната защита, могат да се локализируют в допълнителни субклетъчни структури, в сравнение с ферментативния тип.
3. Чрез комбинирано прилагане на *in silico* и биохимични методи при изследваните щамове дрожди е установено, че стойността на специфичната тотална ензимна активност не зависи от общия брой гени – паралози.
4. За първи път е установено, че в условия на повишена концентрация на ROS в клетките на респираторните (метилотрофни) дрожди от родовете *Pichia* и *Hansenula* се експресират допълнителни мултимерни форми на Mn СОД и каталаза.
5. Получени са оригинални доказателства за високата термостабилност и слабата устойчивост на редуциращи агенти на СОД и каталазните ензими при метилотрофни дрожди от родовете *Pichia* и *Hansenula*.
6. Създаден е *in silico* модел за изследване и оценка на генетично детерминираните предимства (адаптивни стратегии) на еукариотната клетка, даващи възможност за бърз и координиран отговор на различни въздействия, свързани с оксидативния стрес.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **D. Koleva**, V.Petrova and A. Kujumdzieva (2008) **Comparison of enzymatic antioxidant enzyme antioxidant defence system in different metabolic type of yeast** Can. J. Microbiol. 54: 957 – 963 (IF 1.102)
2. **D.Koleva**, V.Petrova, Tz.Hristozova and A.Kujumdzieva (2008) **Study of catalase enzyme in methilotrophic yeast** Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 22 (2): 762-768
3. **D.Koleva**, G.Docheva, V.Petrova and A.Kujumdzieva (2010) **Superoxide dismutase enzymes in oxidative type yeast *H. polymorpha*** Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 24 (2) / SE: 488-493 (IF 0.291)
4. **D.Koleva**, V.Petrova, T. Nedeva and A.Kujumdzieva (2011) **Sugar utilization influences yeast glutathione synthetases and transferases: *In silico* analysis** Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 25 (4) / Supplement: 125-132 (IF 0.291)

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. V.Petrova, **D. Koleva**, Tz. Hristozova, A. Kujumdzieva **Antioxidant defence system in obligat oxidative yeast from Genus *Cryptococcus* and *Rhodotorula***. Poster session, Sofia school of proteins, 3 – 5 October, 2007, Sofia, Bulgaria
2. V.Petrova, **D. Koleva**, H. Yanev, Tz. Hristozova, A. Kujumdzieva **Carbon source influence on catalyse enzyme in methilotrophic yeasts**. Poster session, Seminar „Ecology and Evolution – 3”, 19 – 20 April, 2008, Sofia, Bulgaria
3. **D.Koleva**, V.Petrova, Tz.Hristozova and A.Kujumdzieva **Role of antioxidant defence enzyme system in pathogenicity of oxidative *Cryptococcus* yeast**. Poster session, Sofia school of proteins, 17 – 19 September, 2008, Sofia, Bulgaria
4. **D.Koleva**, G.Docheva, V.Petrova and A.Kujumdzieva **Superoxide dismutase enzymes in oxidative type yeast *H. Polymorpha***. Poster session, Second Balkan Scientific Conference in Biology, 21 – 23 May, 2010 Plovdiv, Bulgaria
5. **D.Koleva**, V.Petrova Z. Uzunov and A.Kujumdzieva **Stability of SOD enzymes in *Pichia pini* yeasts**. Poster session, Twelfth Congress of the Bulgarian Microbiologists with international participation, October 11-15, 2010 Yundola, Bulgaria
6. **D.Koleva**, V.Petrova. and A.Kujumdzieva ***In silico* analysis of superoxide dismutase enzyme robustness in yeast with different type of carbon metabolism**. Poster session - thematic topic Mechanisms of adaptation of living systems, Seminar of Ecology, 28-29 April, Sofia, Bulgaria

Изказвам най-искрена благодарност към научния си ръководител доц. д-р Анна Куюмджиева за предоставените възможности и подкрепа, за ценните професионални насоки, внимание и всеотдайност при изработването на настоящата дисертация.

Благодаря на д-р Венцислава Петрова за незаменната помощ, разбиране и професионални съвети, които допринесоха за успешното изготвяне и завършване на настоящата дисертация.

Специално благодаря на гл. ас. д-р Траяна Недева, Емилия Писарева и, Величка Бачорова за неоценимата всеотдайност, подкрепа и търпение.

Изказвам признателност към целия екип на катедра „Обща и промишлена Микробиология“ за придобитите през годините научни знания и опит.