



АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на
образователната и научна степен “доктор”
Професионално направление 4.3 Биологични науки
Научна специалност “Микробиология”

Състояние на покой при дрожди *Saccharomyces cerevisiae* – модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор

ПОЛЯ ГАЛИНОВА МАРИНОВСКА

Научен ръководител:

доц. д-р Венцислава Петрова

Ръководител катедра

проф. д-р Петя Христова

София

2023

Дисертационният труд е написан на **229** стандартни машинописни страници и съдържа следните раздели: **Увод** – 1 стр.; **Литературен обзор** – 45 стр.; **Цел и задачи** – 2 стр.; **Материали и методи** – 15 стр.; **Резултати и обсъждане** – 90 стр.; **Изводи** – 2 стр.; **Приноси** – 1 стр. Включени са **61** фигури и **5** таблици. В литературната справка са отразени **575** заглавия. Експерименталната работа е осъществена в лабораторията по „Приложна микробиология“ в Катедра „Обща и промишлена микробиология“.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрата по „Обща и промишлена микробиология“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 03.07.2023г. от 11:00 часа и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“.

Научно жури:

- 1. проф. д-р Петя Койчева Христова**
- 2. доц. д-р Траяна Спасова Недева**
- 3. проф. дн Светла Трифонова Данова**
- 4. проф. дбн Мария Богомилова Ангелова**
- 5. доц. д-р Цветелина Сашкова Паунова-Кръстева**

Защитата на дисертационния труд ще се състои на часа в сградата на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Материалите, свързани със защитата се намират в катедра „Обща и промишлена микробиология“ и на сайта на Биологически факултет.

УВОД

Дрождите *Saccharomyces cerevisiae* са едни от най-използваните моделни организми в молекулярната биология, биотехнологиите и при изследване на редица процеси, свързани с човешкото здраве и заболявания (Petranovic and Nielsen., 2008). С уникалните си генетични характеристики и висока степен на консервативност с висшите еукариотни организми, *S. cerevisiae* представляват подходяща система за изследване на механизмите на химична токсичност. Комбинираното прилагане на класически токсикологични изследвания с генетични и биоинформатични анализи, допълнително предоставя по-задълбочени познания за токсикологичния отговор на молекулно и клетъчно ниво в биологичните системи, вследствие излагането на токсични съединения - информация, която, ако е налична, би улеснила анализите, свързани с оценка на риска. Използването на дрождеви клетки в състояние на активна пролиферация обаче, е затруднено от физиологичната комплексност на процесите. Изследването от друга страна на по-стабилното състояние на покой G₀, където клетките наподобяват тези на бозайници, е предимство. Това позволява да се изучи действието на подобни съединения при други видове, допринася за оценката на риска за околната среда и разработването на стратегии за детоксикация. Изучаването на вариациите в генната експресия или нивото на метаболити, след излагане на токсичен агент, могат да подпомогнат и идентифицирането на клетъчните компоненти и пътища, които участват и играят ключова роля в токсикологичния отговор.

В този контекст дисертационният труд е насочен към разработване на алтернативен модел, базиран на клетки *S. cerevisiae* в покой, който да служи за по-точен и чувствителен токсикологичен анализ при висшите еукариоти.

Това подробно изследване ще разшири познанията за консервативните механизми, лежащи в основата на състоянието на покой при дрожди *S. cerevisiae* и ще оцени възможността да се използват G₀ дрождеви култури като система за скрининг и прогнозиране на токсикологичен отговор при висши еукариоти.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основна цел на настоящия дисертационен труд бе:

Изучаване приложимостта на клетки *Saccharomyces cerevisiae* в различни фази от жизнения цикъл като еукариотен модел на клетъчен отговор към токсични и стресови агенти.

За постигане на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Да се разработи моделна схема за получаване и изолиране на дрождеви клетки от различна фаза на клетъчния цикъл – логаритмични (Log), клетки в покой (Q) и стационарни непрелиферативни клетки (NQ).
2. Да се изследва окислително-редукционния статус на изолираните дрождеви популации.
3. Да се проучи ефекта на различни лекарствени (зеоцин, ибупрофен) и токсични (H_2O_2 , менадион) препарати върху преживяемостта на изследваните дрождеви популации.
4. Да се направи оценка на цитотоксичния ефект на изпитваните химични агенти върху Log, Q и NQ дрождеви клетки.
5. Да се анализира генотоксичния ефект на избраните токсични препарати зеоцин, и менадион върху трите дрождеви клетъчни популации.
6. Да се изучи ролята на различни физични стресови фактори за преживяване на дрождевите клетки, изолирани на различен етап от клетъчния цикъл.
7. Да се приложи *in silico* анализ на еволюционните стратегии за навлизане на дрождевите клетки в покой.
8. Да се създаде моделен „Функционален профил“ за отговор към стрес на клетки *S. cerevisiae*, намиращи се в различни фази на клетъчния цикъл.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В настоящия дисертационен труд, обект на изследване е хаплоиден дрождеви шам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) (Harsch et al., 2010), предоставен от немската колекция EUROSCARF.

За поддържане на щама беше използвана агаризирана среда за дрожди АСД със състав: глюкоза: 2 %, дрождев екстракт: 0.5 %, пептон: 1 %, агар: 2.5 %, pH 6,5. За получаване на биомаса беше използвана течна хранителна среда YPD със състав: глюкоза 2 %, пептон 1 %, дрождев екстракт 1 %; pH 6,5.

Култивирането на шам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 беше осъществено в периодична система, с течна хранителна YPD среда при следните параметри: 205 грм, 30°C, за 14 часа (за изолиране на клетки в логаритмична фаза на растеж) или 7 дни (за получаване на G₀ и NQ дрождеви култури). Събирането на биомасата беше осъществено чрез центрофугиране на културалната течност при 5000 грм за 10 минути.

Дрождеви клетъчни популации в стационарна фаза бяха изолирани по метода на Allen et al., (2006). Безклетъчен екстракт от експерименталните клетки беше получен чрез механично дезинтегриране в апарат Bullet Blender, за 10 min при скорост 8000 грм.

Митохондриална дрождева фракция беше изолирана по метода на Holttä et al., (1977).

За определяне на диапазона от концентрации на изпитваните токсични вещества (H₂O₂, менадион, ибупрофен и зеонин) и избор на LD₅₀ за всяко съединение, като скринингов метод, беше проведен колониен анализ. Въздействието на различните токсични агенти върху жизнеспособността на дрождеви пролифериращи, Q и NQ клетки (OD₅₄₀=1.0) беше оценено спрямо контролни, нетретирани популации, въз основа на формираните единични колонии (CFU/ml).

Ефектът на физичните параметри върху жизнеспособността на клетки в логаритмична, Q и NQ фаза, беше определен след прилагане на различни температура (-5°C, 4°C, 30°C, 50°C и 70°C), pH (2.0 и 10), хипоосмотично (със стерилна вода) и хиперосмотично (0.4 M и 0.7 M NaCl, 30%, 50% и 70% захароза и 40%, 60% и 87%

глицерол) налягане, лъчение (UV₂₅₄), гравитационна сила (3000g, 30000g и 50000g), механична сила и ултразвук (40 kHz), за различни периоди от време, като се отчита процента преживяемост спрямо контролни клетки.

Биохимичните анализи бяха осъществени по следните методи: разтворим белтък (Lowry et al., 1951), карбонилни групи в белтъците (Mesquita et al., 2014), ROS в клетката чрез NBT метод, вътреклетъчен редуциран и окислен глутатион (Tietze., 1969, модифициран от Zhang., 2000), перекисно окисление на липиди (Hodges et al., 1999).

Двойноверижните разриви (DSBs) в ДНК, на трите експериментални клетъчни популации от щам *S. cerevisiae* BY4741, бяха определени чрез електрофореза в постоянно електрическо поле (CFGE) съгласно процедурата на Todorova et al., (2015) и Todorova et al. (2019).

Натрупването на ROS в митохондриите и възникналите ДНК повреди, след третиране със зеоцин, бяха наблюдавани чрез флуоресцентна микроскопия с използване на багрилата Rhodamine 123 и DAPI, съответно.

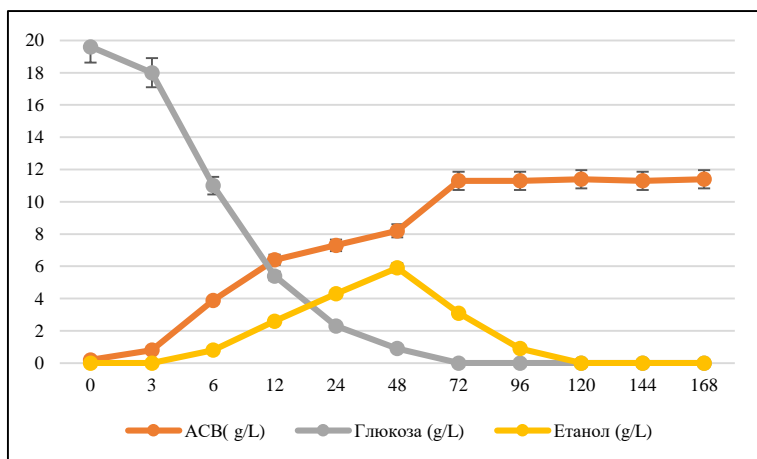
При провеждането на биоинформатичните анализи са използвани секвенции на изследваните дрождеви гени и белтъци, изтеглени от *Saccharomyces* Genome Database (SGD: <http://www.yeastgenome.org>). Сравняването на изследваните секвенции се осъществява посредством програмата за прогресивно сравняване на множество секвенции - ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Вътреклетъчната компарментализация на изучените протеини беше анализирана с PSORT II Prediction software (<https://psort.hgc.jp/form2.html>).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Динамика на растеж и клетъчна диференциация при дрожди *S. cerevisiae*

С цел да бъдат проследени растежа и клетъчната диференциация в стационарна фаза на растеж при хаплоидния щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, бе осъществено

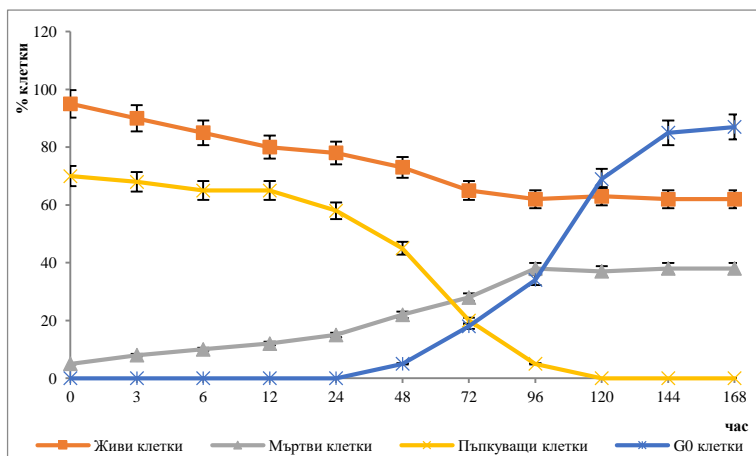
периодично култивиране за 168 h на среда YPD. По този начин клетките бяха подложени на „гладуване“ поради пълното изчерпване на въглеродния източник от средата. Получените резултати показаха усилено метаболизиране на глюкозата в експоненциална фаза на растеж, в периода между 3^{тия} и 24^{тия} час (Фиг. 1). След изчерпване на глюкозата в средата в периода между 24^{тия} и 48^{тия} час културата навлиза в диауксична фаза, при която се наблюдава забавен растеж. Установено бе, че в периода между 96^{тия} и 120^{тия} час етанолът и други неферментативни въглеродни източници са напълно изчерпани, клетките са подложени на „гладуване“, вследствие на което броят на полифериращите клетки силно намалява и част от тях навлизат в т.нар. „състояние на покой“ (Gray et al., 2004).



Фигура 1: Динамика на растеж и усвояване на въглероден източник при периодично култивиране на хаплоиден щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

Следваща стъпка в проведените изследвания бе проследяване на клетъчната диференциация и стареене при изследвания щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 чрез

определяне процента на преживяемост на културата, както и процента преминали клетки в G₀ състояние в условията на проведеното култивиране (Фиг. 2).



Фигура 2: Клетъчна диференциация и апоптоза при хаплоиден щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

Установено бе, че в периода между 3^{тия} и 24^{тия} час процентът на живи клетки се запазва висок (~ 80 %), но след 24^{тия} час се наблюдава относително понижаване на процента пъпкуващи клетки. В периода между 48^{ия} и 96^{ия} час на култивиране стартира диференцираща програма, която дава популация от клетки в латентно непролиферативно състояние - G₀, както и няколко популации от клетки в нелатентно състояние. Популацията на G₀ клетките са непъпкуващи, метаболитно неактивни и запазващи пролиферативния си капацитет (50 – 90 % от клетките). Популацията на клетките в нелатентно състояние (NQ) е хетерогенна и се състои от "стари" клетки, които могат да бъдат жизнеспособни и репродуктивно компетентни; жизнеспособни, но репродуктивно некомпетентни или клетки, които показват характерни черти на апоптозни и/или некротични състояния (10 – 50 % от клетките) (Arlia-Ciommo et al., 2014).

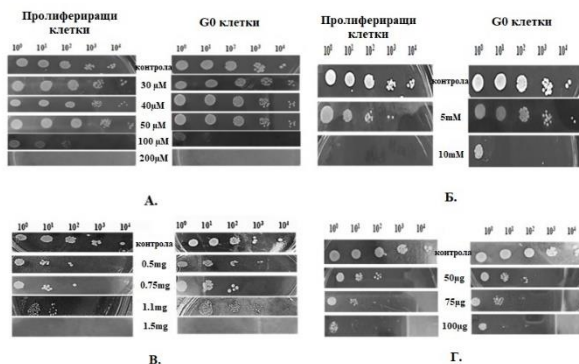
Във връзка с високата идентичност и консервативност на процесите между човека и дрождите, целта на следващите експериментални анализи в настоящия дисертационен

труд беше да се изследват въздействията от околната среда (химични и физични) върху различни клетъчни популации, получени от щам *S. cerevisiae* BY4741.

2. Дрождите като моделна система за оценка на въздействия от околната среда

2.1. Оценка на токсикологичното въздействие на химични агенти

2.1.1. Преживяемост

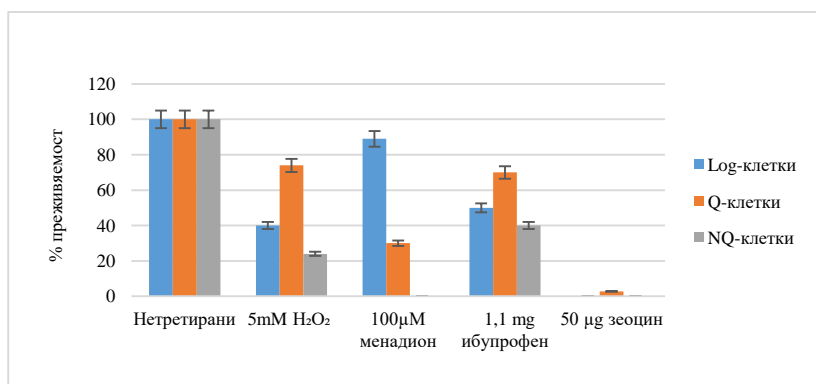


Фигура 4: Колониен анализ за оценка на устойчивост на дрождеви клетки към екзогенни токсични агенти – менадион (А.) H_2O_2 (Б.); ибупрофен (В.) и зеоцин (Г.). Контрола – среда без добавен токсичен агент

Първа стъпка в изучаването на токсичното действие на избраните химични вещества беше проследяване на ефекта на различни концентрации от тях, върху жизнеспособността на логаритмично растящи и G_0 клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741. Целта беше да се подбере такава концентрация, при която се наблюдава 50 % инхибиране на растежа (LD_{50}) (Фиг. 3). За реализиране на тази цел беше проведен колониен анализ на хранителна среда с добавени съответно менадион, водороден

пероксид, ибупрофен и зеоцин в различни концентрации. В резултат на проведеното третиране бяха определени следните LD₅₀ дози за четирите съединения: 5 mM/ml за водороден пероксид, 1.1 mg/ml за ибупрофен, 100 μM/ml за менадион и 50 μg/ml за зеоцин.

Последващите изследвания бяха насочени към определянето на процента на преживели клетки след прилагане на определените LD₅₀ дози от четирите тествани токсични препарата. Той бе определен въз основа на формираните единични колонии (CFU/ml) (Фиг. 4).



Фигура 5: Преживяемост на шам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с химични агенти

Получените резултати след третиране на Log, Q и NQ клетъчни суспензии на *S. cerevisiae* BY4741 за 1 час на стайна температура с описаните лекарствени препарати показаха, че при добавен към средата 100 μM менадионът се наблюдава по-силен токсичен ефект върху клетките в G₀ състояние, като бе отчетено 60 % инхибиране на растежа. Проведеният анализ с екзогенен водороден пероксид показва, че обратно на резултатите, наблюдавани при третиране с менадион, G₀ клетките на шам *S. cerevisiae* BY4741 се характеризират с по-висока устойчивост. Q клетките се характеризират и с много по-висока устойчивост към вредното действие на ибупрофен (70% преживяемост)

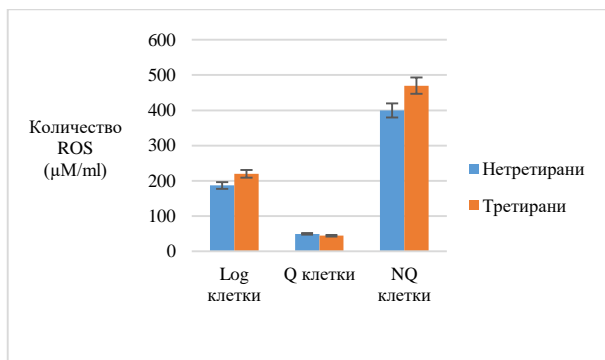
и на зеоцин (2,8% преживяемост). Това най-вероятно се дължи на факта, че клетките в стационарна фаза се характеризират с нарастване на термостабилността, ниска метаболитна активност, намалена скорост на транскрипция и трансляция, резистентни са към приложен стрес от околната среда и имат слаба пропускливост на плазмената мембрана (Srivastava et al., 2016; de Sousa-Lopes et al., 2004).

2.1.2. Цитотоксичност

2.1.2.1. Водороден пероксид (H₂O₂)

Количество ROS

С цел да се проследи ефектът на силен оксидативен стрес върху трите субклетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741, клетъчни суспензии с OD₅₄₀=1.0, бяха третирани с 5mM H₂O₂ за 1 час на стайна температура. След отстраняване на стресовия агент, клетките бяха подложени на механично разрушаване и получените безклетъчни екстракти бяха използвани за установяване на нивата на индуцирани вътреклетъчни повреди вследствие въздействието с този токсичен препарат (Фиг. 5). Получените резултати показаха повече от 2 пъти по-висока концентрация на генерираните ROS в NQ клетките (470 μM/ml), в сравнение с пролифериращите (220 μM/ml). При Q клетките на практика не се наблюдава генериране на допълнителни ROS в сравнение с контролните нетретирани клетки, което кореспондира с литературните данни, в които се докладва, че Q клетките са по-устойчиви на стрес.



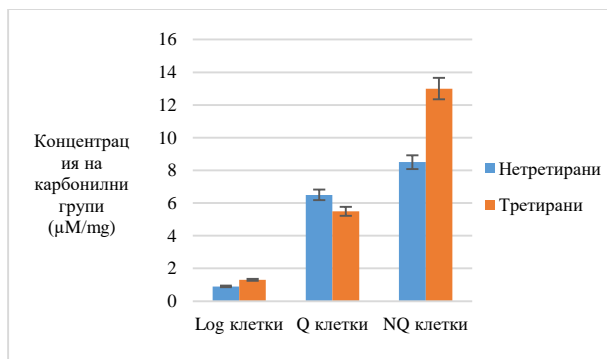
Фигура 6: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H₂O₂

Обратно, NQ клетките са силно чувствителни към топлинен и други видове стрес и бързо губят своята способност за репродукция (Allen et al., 2006; Davidson et al., 2011), който факт рефлектира и върху наблюдаваното 20 % увеличение на генерираните токсични форми на кислород при тази дрожева клетъчна популация.

Нива на окислени белтъци

Този тип протеиново карбонилиране, най-често срещаният тип ROS-индуцирана протеинова модификация, се счита за необратимо и индуцира разграждане на белтъците в клетката. От данните, представени на Фиг. 6 се вижда, че NQ клетките се характеризират с 1,5 пъти по-висока концентрация на окислени белтъци след третиране с водороден пероксид (13 µM/mg), в сравнение с контролните такива (8,5 µM/mg). При Q клетките отново е наблюдавана устойчивост към токсичното действие на водородния пероксид, като това ясно се визуализира на фигурата и е в абсолютно съответствие с получените резултати, касаещи преживяемостта на трите клетъчни популации след третиране с водороден пероксид (Фиг. 4), където именно G₀ клетките показват най-висок процент жизнеспособност – 74%.

При пролифериращите клетки повишаването в концентрацията на окислените белтъци е от порядъка на 1,4 пъти по-висок (1,3 µM/mg), спрямо контролните такива (0,9 µM/mg).

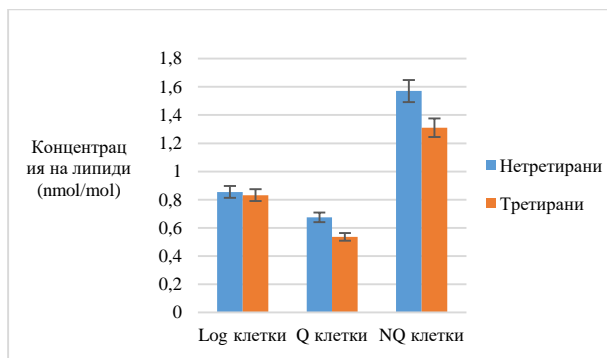


Фигура 7: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H₂O₂

Нива на окислени липиди

Ненаситените мастни ацилни групи в мембраните са основна мишена за хидроксилния радикал и супероксидния анион и тази атака иницира автокаталитична липидна пероксидация, водеща до образуване на реактивни липидни радикали и липидни хидропероксиди (Wiseman et al., 1996; Gunstone., 1996). Разграждането от своя страна на липидните хидропероксиди води до генериране на голямо разнообразие от силно реактивни алдехиди (Levine., 2002).

Във връзка с гореизложеното, бе проследено и токсичното действие на H₂O₂ върху дрождевите липиди, като беше оценена промяната във вътреклетъчните нива на техните окислени форми (Фиг. 7). Установено бе, че не се наблюдава повишаване на техните нива в нито една от трите клетъчни популации спрямо контролните такива.

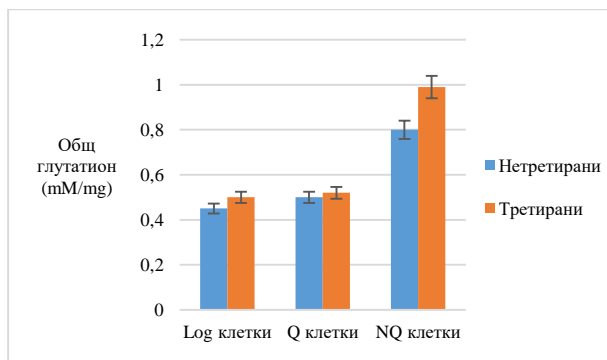


Фигура 8: Нива на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H₂O₂

Тотален глутатион

Една от първите линии на защита в клетката при екзогенно въздействие с токсични агенти е активиране на експресията на трипептида глутатион (Grant et al., 1996; Jamieson., 1998; Dawes., 2004). Ето защо в настоящите изследвания бе обърнато специфично внимание на промяната в нивата на този антиоксидант след въздействието с екзогенно добавен 5mM H₂O₂.

Получените данни показаха, че най-високи нива на този антиоксидант се наблюдават в NQ клетките (0,99 mM/mg), което вероятно представлява компенсаторен механизъм, с цел преодоляване на силно нарушената хомеостаза (Фиг. 8). В останалите две клетъчни популации – Q и Log клетки, отчетени стойности не се различават от тези, измерени при контролните дрождеви култури.



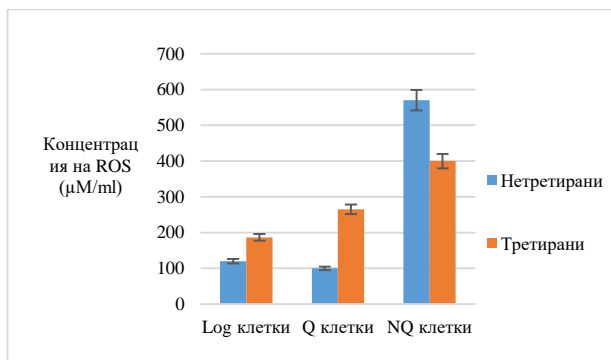
Фигура 9: Количество общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H₂O₂

2.1.2.2. Менадион

Количество ROS

Менадионът индуцира клетъчна смърт чрез апоптоза и инхибира растежа на различни видове ракови клетки (Lee et al., 2016), което е и основна причина в проведените експерименти - един от използваните химични агенти да е именно това хиноново производно, широко застъпено в медицинската практика. С цел проследяване ефектът на менадиона върху различните клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741, те бяха третирани с установената в предходните експерименти LD₅₀ = 100μM менадион.

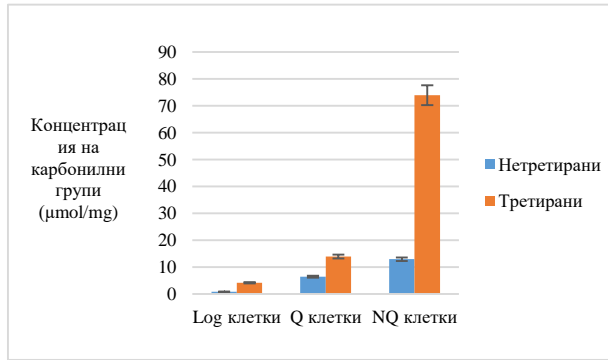
След инкубация за 1 час на 25°C бяха измерени нивата на генерирани ROS в изследваните клетки. Получените резултати са в съответствие с данните, отчетени за преживяемост на трите клетъчни популации след третиране с този препарат. Бе установено, че цитотоксичния ефект на менадиона в G₀ клетките е по-силен (265 μM/ml), в сравнение с този, наблюдаван при логаритмичните клетки (186,6 μM/ml), който факт вероятно е свързан с процеса на генериране на енергия в Q клетките посредством митохондриално дишане и произтичащото от това натрупване на по-високи нива на кислородни токсични форми (Фиг. 9) (Bonawitz et al., 2007).



Фигура 10 Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на шам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100µM менадион

Нива на окислени белтъци

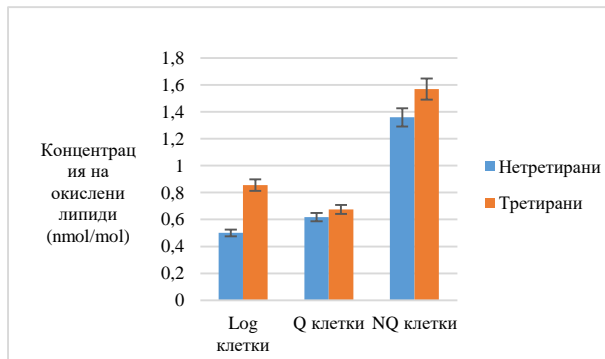
Във връзка с окислителните промени в белтъците, сравнителният анализ на нивата на формирани карбонилни групи на контролните дрождеви култури показва около 7 пъти по-високи стойности в Q клетки, в сравнение с логаритмичните такива (Фиг. 10). Този феномен вероятно е свързан с натрупването на ROS и свързаното с това формиране на карбонилирани протеини (Coliva et al., 2019). Най-високото количество окислени белтъци – 74 µM/mg, бе измерено в NQ клетките, вероятната причина за което е тяхната апоптозна природа. След третиране на моделните култури с LD₅₀ доза на менадион - 100µM, при Q клетките стойността на карбонилираните белтъци се увеличава двукратно и достига до е 14 µM/mg, чиято стойност е 3 пъти по-висока от тази, измерена в пролифериращите клетки (4,2 µM/mg) (Фиг.10).



Фигура 11: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100µM менадион

Нива на окислени липиди

Противоположно на резултатите от предходните експерименти, където клетките в експоненциална фаза показваха по-висока устойчивост към действието на менадион, тук се наблюдават по-ниски нива на окислени липиди, именно при Q клетките (Фиг.11).

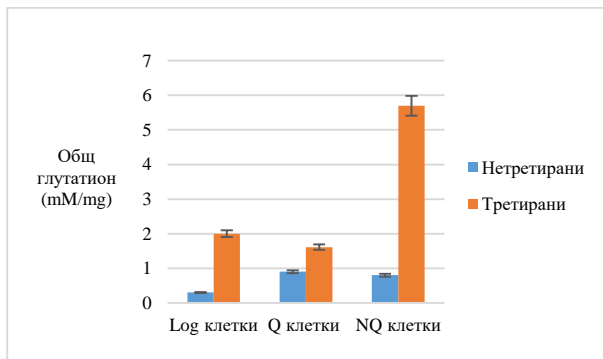


Фигура 12: Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100µM менадион

Резултатите са съпоставими с данните от литературата, според които по време на стационарна фаза, в клетките на *S. cerevisiae* се натрупва голямо количество трехалоза, която в условия на оксидативен стрес предпазва липидите от окисление (Herdeiro et al., 2005).

Тотален глутатион

Получените резултати показаха, че концентрацията на GSH в нетретираните Q клетки е 3 пъти по-висока от тази в Log клетките. Интересно е, че третирането с менадион на дрождите в G_0 състояние не води до значително повишаване в базовите нива на GSH в клетките. Концентрацията му се увеличава не повече от двукратно в резултат на излагането на този токсичен агент. В същото време при Log клетките, третирани със $100 \mu\text{M}$ менадион се наблюдават близо 7 пъти по-високи нива на GSH (2mM/mg), в сравнение с контролните такива (0.3 mM/mg). Драстичен ръст в нивата на тоталния глутатион е отчетен и в NQ клетките ($5,7 \text{ mM/mg}$) (Фиг. 12).

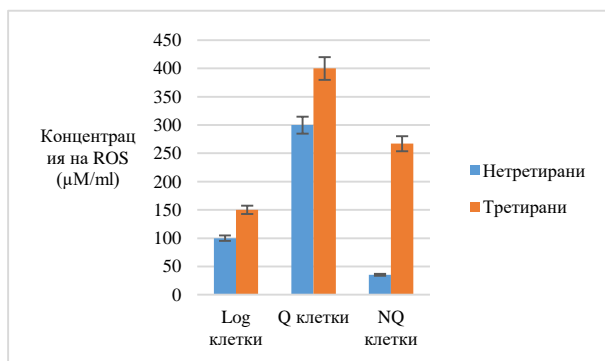


Фигура 13: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със $100 \mu\text{M}$ менадион

2.1.2.3. Ибупрофен

Количество ROS

Във връзка с малкото експериментални данни, касаещи влиянието на ибупрофена върху клетките на *S. cerevisiae*, в настоящия дисертационен труд бе направена оценка на нивото на вътреклетъчни повреди на трите дрождеви клетъчни популации – Q, NQ и пролифериращи клетки след третирането им с $LD_{50} = 1,1\text{mg/ml}$ концентрация на ибупрофен.

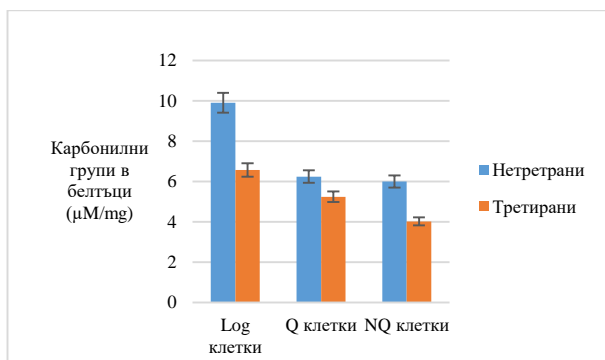


Фигура 14: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен

Получените експериментални резултати показаха повишаване в нивата на ROS и при трите типа изследвани дрождеви култури, като най-високи стойности бяха отчетени в Q клетките (400µM/ml), както в сравнение с контролата (300µM/ml), така и с останалите две клетъчни популации (Фиг.13). Причината за натрупване на реактивни кислородни видове най-вероятно се дължи на факта, че третирането с ибупрофен е комплексен процес, водещ до деградация на Tat2 и свързаните с това процеси на гладуване в клетката (He et al., 2014).

Окислени белтъци

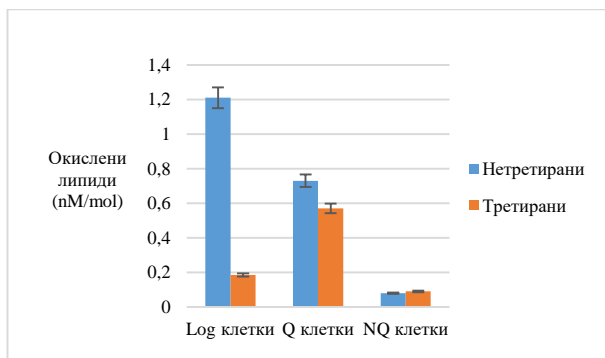
Получените резултати показаха, че въпреки наблюдаваното повишаване в нивото на реактивни кислородни видове в третираните пролифериращи, G_0 и NQ клетки, не бяха установени промени в съдържанието на карбонилни групи в белтъците, което подчертава липсата на значителен токсичен ефект на ибупрофена след прилагането му върху клетката (Фиг. 14).



Фигура 15: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на шам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен

Окислени липиди

Излагането на трите клетъчни типа на LD_{50} концентрация на ибупрофен отново показва липса на увреждащ ефект върху клетъчните мембрани. При клетките в експоненциална фаза на растеж се наблюдава близо 7 пъти по-ниска концентрация на окислени липиди спрямо контролните клетки. От друга страна при клетките G_0 състояние се наблюдава 1,3 по-ниска стойност на третираните клетки спрямо контролните (Фиг. 15).

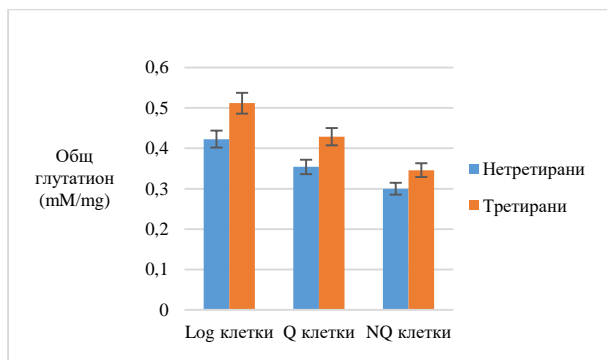


Фигура 16: Количество окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1.1 mg/ml ибупрофен

По литературни данни е установено, че добавянето на 0,2 mM ибупрофен води до значително удължаване на репликативната продължителност на живота при *S. cerevisiae*, което още веднъж потвърждава наблюдавания ефект на това нестероидно противовъзпалително средство върху дрождевите клетки (Chong et al., 2014).

Тотален глутатион

От представените експериментални резултати се вижда (Фиг. 16), че след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен нивата на общия глутатион и при трите клетъчни популации се повишава със средно около 20 % - 30 %, което е в абсолютно съответствие и с получените данни за увеличаване на концентрацията на ROS в клетките (Фиг. 13). Напълно очаквано, повишените нива на GSH са признак за наличие на окислителни процеси в клетката, но в сравнение с останалите токсични агенти, използвани за третиране на щам *S. cerevisiae* BY4741, ибупрофенът, макар и слабо проучен като механизъм на действие, има най-слаб, пренебрежим токсичен ефект, което е в съответствие и с по-слабото увеличение в нивата на глутатион.



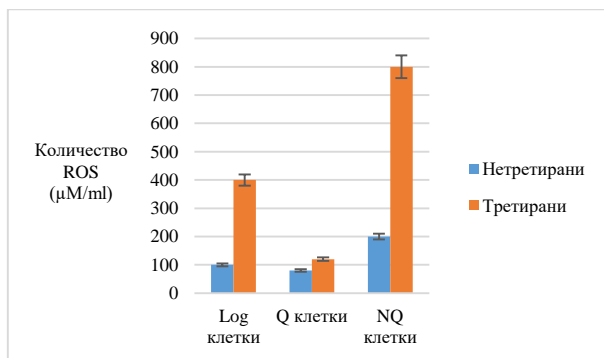
Фигура 17: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен

2.1.2.4. Зеоцин

Двойноверижните разриви в молекулата на ДНК са най-критичните повреди, причинени от йонизираща радиация или радиомиметици. Един от генотоксичните агенти, основен източник на двойноверижни разриви е зеоцинът, антибиотик от семейството на блеомицините (Todorova et al., 2019).

Количество ROS

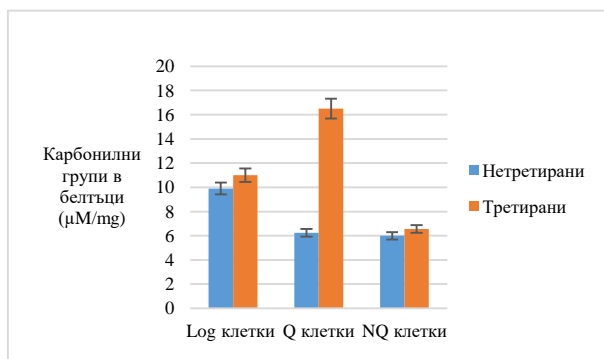
Проследяването нивата на натрупани ROS в клетките след въздействието с 50 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин в Log, Q и NQ клетъчните дрождеви популации, показва пълно съответствие с данните получени за преживяемостта на дрождевите микроорганизми (Фиг. 4). При клетките, намиращи се в експоненциална фаза на растеж бе наблюдавано 4кратно повишени концентрации на ROS (400 $\mu\text{M/ml}$) в сравнение с контролните култури (100 $\mu\text{M/ml}$) (Фиг. 17). Причината за този скок в нивата на окисление най-вероятно е вследствие от високата скорост на транскрипция и транслация при активно делящите се клетки, което води до невъзможност на антиоксидантните системи да се справят с генерираните токсични форми на кислород.



Фигура 18: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50µg/ml зеоцин

Оксислени белтъци

Наблюдаваните повишени окислителни модификации в белтъците на Q клетките при третиране със зеоцин не са изненадващи, тъй като те се характеризират с много ниски метаболитни нива и по-ниска способност да поправят увредени молекули.

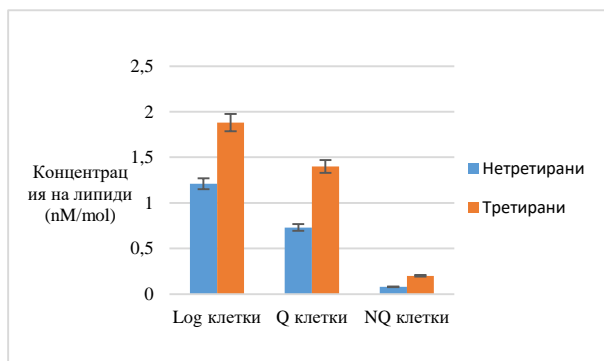


Фигура 19: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50µg/ml зеоцин

Това може да се дължи и на координираните токсични ефекти на зеоцина и стреса, причинен от липсата на хранителни вещества в околната среда. В NQ клетки количеството на карбонилирани протеини след третиране със зеоцин е сравнимо с това в контролните клетки - съответно 6.56 и 6.06 $\mu\text{M}/\text{mg}$ (Фиг. 18). Това показва, че тук появата на окислени протеини е по-скоро следствие от физиологичното състояние на клетъчната популация и не е пряк резултат от индуцирания от зеоцин оксидативен стрес (Marinovska et al., 2022).

Окислени липиди

Друг важен показател, сигнализиращ за нарушаване на клетъчната хомеостаза в резултат от увреждащото действие на зеоцин е повишаване нивата на перекисно окислени липиди. Във връзка с това измерената по-висока вътреклетъчна концентрация на малоналдеhid в третираните със зеоцин клетъчни популации допълнително



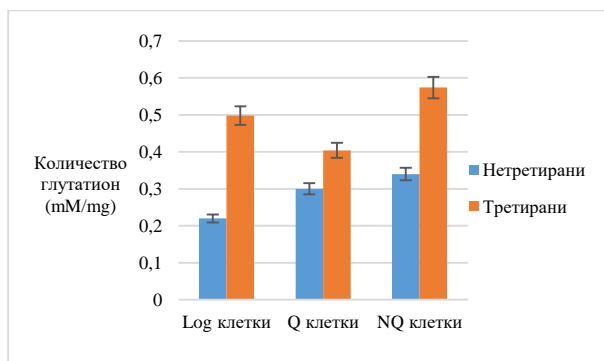
Фигура 20: Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ зеоцин

потвърждава, че един от цитотоксичните ефекти на този антибиотик е свързан с индуцирането на оксидативен стрес в клетката.

Това води до увреждане на мембранната функционалност и пропускливост, вероятно причинявайки освобождаване на вътреклетъчното съдържание (Hodges et al., 1999). Очевидно, когато метаболитната активност на клетката е по-висока и транспортът през мембраната – динамичен, клетките на дрождите са по-уязвими към действието на ксенобиотиците, включително и на зеоцина. Това в крайна сметка обяснява измерените увеличени нива на окислени липиди в логаритмичните клетки в сравнение с тези на Q и NQ (Фиг. 19).

Тотален глутатион

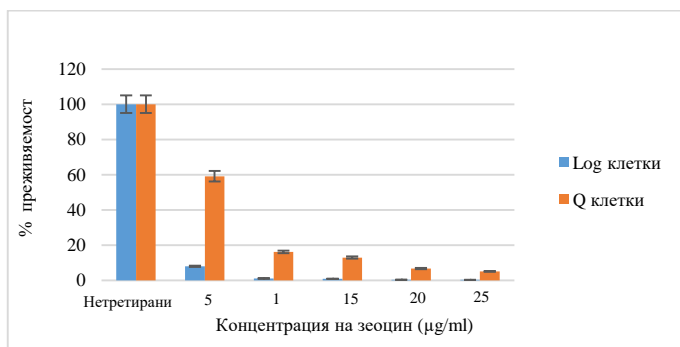
Основната молекула, действаща срещу окислителни повреди, е глутатионът. Ето защо общото вътреклетъчно количество на този трипептид е важен параметър за измерване на нивата на оксидативно увреждане. Не е изненадващо, че след излагането на LD₅₀ доза на зеоцин и при трите вида дрождеви популации се наблюдават повишени вътреклетъчни нива на този антиоксидант, като най-високи стойности бяха установени логаритмично растящи клетки (2,5кратно увеличение), където и нивото на нарушени липиди е най-високо (Фиг. 20).



Фигура 21: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на шам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50µg/ml зеоцин

При клетките в G₀ състояние също се отчита индукция на биосинтезата на глутатион, но тя е само с около 30 %, което вероятно се дължи на по-слабия токсичен ефект на този агент върху клетъчните мембрани на дрождевите популации. Тези открития корелират и с наблюдаваната тенденция за вътреклетъчните ROS нива на изследваните дрожди. При NQ клетките след третиране със зеоцин също се наблюдават високи концентрации на глутатион, вероятно свързани с излишните нива на вътреклетъчни ROS като цяло (Aragon et al., 2008).

Във връзка с токсичния ефект на зеоцина, наблюдаван в предходните експерименти и при трите дрождеви субпопулации, както и широката употреба на антибиотици от семейството на блеомицините през последното десетилетие, бяха проведени и някои допълнителни изследвания върху токсичността на този ксенобиотик. Беше проследена преживяемостта на две от дрождевите клетъчни популации – активно деляща се и тази в състояние на покой – след третиране с различни, по-ниски от установената LD₅₀ доза на зеоцин (5, 10, 15, 20, 25 µg/ml за 1 час) (Фиг. 21).

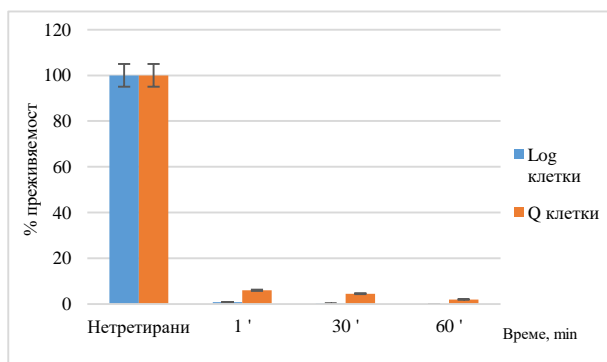


Фигура 22: Преживяемост при Log и Q клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с различни концентрации зеоцин

Логично, бе наблюдавано намаляване на преживяемостта на дрождевите микроорганизми след увеличаване концентрацията на този токсичен агент, като при Q

клетките се запазва сравнително по-висока устойчивост в сравнение с тези, намиращи се в експоненциална фаза на растеж.

Устойчивостта на двете дрождеви клетъчни популации към зеоцин бе проследена и след прилагане на $LD_{50} = 50\mu\text{g/ml}$ зеоцин за различни периоди от време (1, 30 и 60 min). Получените данни показаха, че се установява рязък спад на преживяемостта след третиране дори и за 1 минута, което още веднъж подчертава изключително силния токсичен ефект на използвания от нас радиомиметик (Фиг. 22). Независимо обаче от този наблюдаван ефект, отново Q клетките показват значително по-висока устойчивост към действието на този ксенобиотик, което представлява важна информация от медико-биологична гледна точка – метаболитно неактивните еукариотни клетки, намиращи се в G_0 клетъчен цикъл са много по-слабо податливи на действието на гликопептидните антибиотици, които имат способността да причинява едно или двойноверижни разриви в молекулата на ДНК, а в клиничната практика се използват като антитуморни агенти.

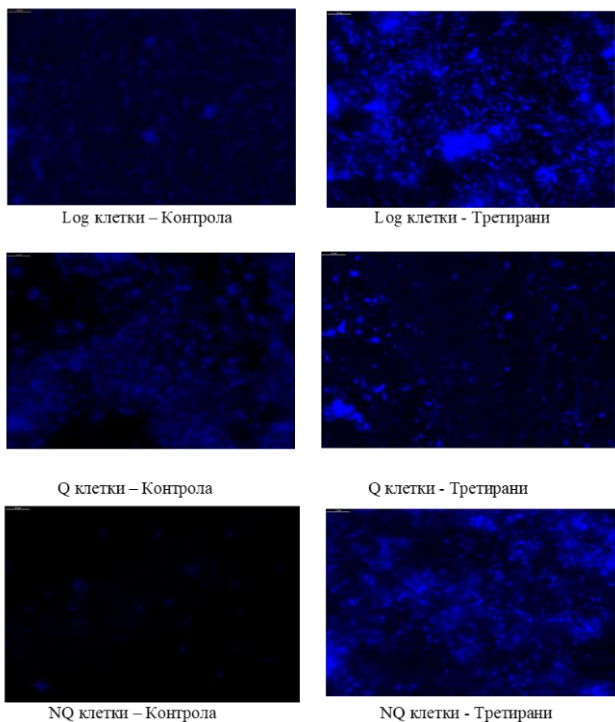


Фигура 23: Преживяемост при Log и Q клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с $50\mu\text{g/ml}$ зеоцин за различно време

Митохондриалният дихателен капацитет и потенциалът на вътрешната митохондриална мембрана са ключови фактори, влияещи върху формирането на ROS,

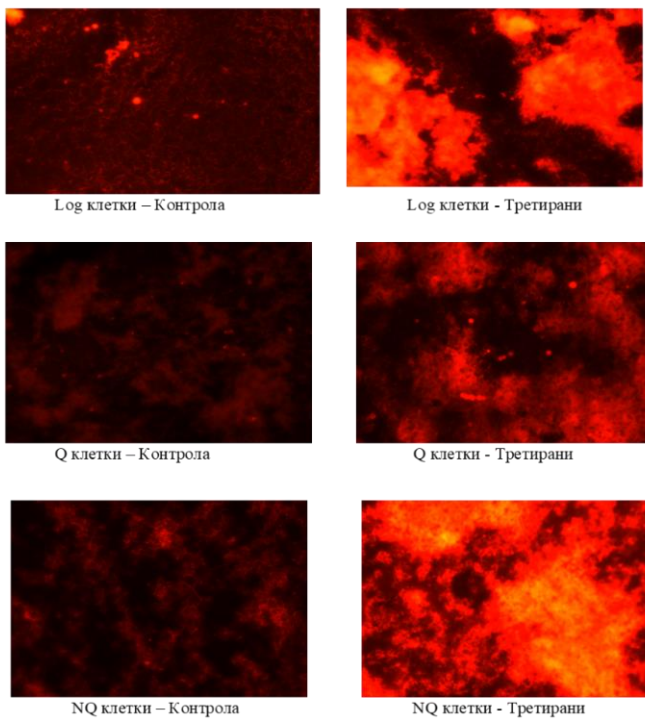
натрупването на увреждане в клетките и продължителността на живота. Ето защо, следваща стъпка в изучаването на токсичния ефект на зеоцина бе отчитането на индуцираните повреди от LD₅₀ доза върху дрождевите митохондрии, изолирани от експоненциална и стационарна фаза на растеж. За целта беше проведено специфичното оцветяване с флуоресцентните багрила DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол) и Rhodamine 123.

DAPI е ДНК-чувствителен флуорохром и отчитането на промяната в интензитета на флуоресценция може успешно да бъде използвана за характеризиране степента на ДНК повреди (Saadat et al., 2015) (Фиг. 23). От представените резултати се вижда, че зеоцинът упражнява силен токсичен ефект и в трите клетъчни популации на *S. cerevisiae*. Най-високият отчетен интензитет на флуоресценция на DAPI се наблюдава при NQ клетките. Получените от проведената флуоресцентна микроскопия данни потвърждават резултатите от предходните експерименти. Най-устойчиви на вредното действие на блеомицините, и в частност на зеоцина, са Q клетките, при които интензитетът на светене е най-нисък. При експоненциално растящите клетки тенденцията се запазва – генерират се ДНК нарушения след въздействие с този токсичен агент, като резултатите са сравнени с тези, наблюдавани при контролните клетки.



Фигура 24: DAPI флуоресцентен анализ на митохондриална ДНК при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741, третиранн с 50 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин

Третирането на митохондрии от трите дрождеви популации със зеоцин и последващото им оцветяване с Rhodamine 123 показва отново, че най-ниска концентрация на генерирани ROS се наблюдава при Q клетките (Фиг. 24), който факт вероятно е свързан с по-високата устойчивост на тези клетъчни популации към различни видове стрес. Получените данни са в тясна корелация с литературните такива, според които G_0 клетките са устойчиви на редица вредни въздействия (Gray et al., 2004).



Фигура 25: Определяне нивата на генерирани ROS след третиране на митохондриални фракции на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 с 50µg/ml зеоцин спрямо интензитета на флуоресценция след оцветяване с Rhodamine 123

При митохондриите на NQ клетките картината е съвсем различна, като при тях интензитетът на флуоресценция е в пъти по-силен от този, наблюдаван при контролните, нетретиращи клетки, което още веднъж потвърждава тяхната слаба устойчивост и бърза загуба на преживяемост. В митохондриите на активно делящите се логаритмични клетки също се наблюдава значително покачване в интензитета на флуоресценция, което допълнително доказва ролята на зеоцина не само в нарушаването структурата на

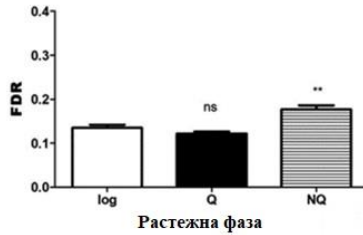
митохондриалната ДНК, но и в индуцирането на оксидативен стрес в клетката и нарушаването на редокс хомеостазата.

2.1.3. Генотоксичност

Във връзка с получените резултати, в които се наблюдава най-засилен токсичен ефект след прилагане на антибиотика зеоцин и хиноновото производно – менадион, както и като се има предвид механизма им на действие, следващият аспект в настоящия дисертационен труд беше да се проследят нивата на индуцираните ДНК повреди в трите дрождеви клетъчни популации (Log, Q и NQ на щам *S. cerevisiae* BY4741). Това бе постигнато чрез детекция на възникналите двойноверижни разриви в молекулата на ДНК, след прилагането на тези два токсични агента. За провеждането на този анализ беше използвана електрофореза в постоянно електрическо поле CFGE (Constant Field Gel Electrophoresis).

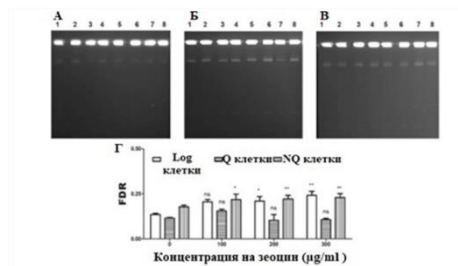
2.1.3.1. Двойноверижни разриви в ДНК след третиране със зеоцин:

Изследвани бяха нивата на спонтанни двойноверижни разриви при трите дрождеви популации на щам *S. cerevisiae* BY4741. Около 1,5 пъти по-високи нива на DSBs бяха измерени в NQ клетките в сравнение с тези, установени при експоненциално растящи дрожди или намиращи се в G₀ състояние. Не беше установена значителна разлика между нивата на DSBs в контролни логаритмични и Q клетки (Фиг. 25).



Фигура 26: Спонтанни нива на DSBs в зависимост от растежната фаза при щам *S. cerevisiae* BY4741

Беше установено, че фазата на растеж е и много важен фактор за чувствителността на ДНК на *S. cerevisiae* и към зеоцин. Приблизително сходни нива на индуцирани DSBs бяха измерени както в логаритмични (Фиг. 26 А, Г), така и в NQ клетки (Фиг. 26 В, Г) след излагането им на действието на три различни концентрации на зеоцин (100, 200 и 300 $\mu\text{g/ml}$). Не беше наблюдаван значителен ефект на този радиомиметик при клетки в покой (Фиг. 26 Б, Г), при които нивата на DSB бяха сравними с тези в нетретираните клетки.



Фигура 27: Индуциране на DSBs в *S. cerevisiae* BY4741, в зависимост от растежната фаза след третиране със зеоцин в концентрации 100-300 $\mu\text{g/ml}$. А - клетки в логаритмична фаза, Б - Q клетки, В - NQ клетки. 1, 2 – контроли; 3, 4 - третиран с 100 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин; 5, 6 - третиран с 200 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин; 7, 8 - третиран с 300 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин. Г - индукция на DSB след третиране с различни концентрации зеоцин, изчислено като FDR.

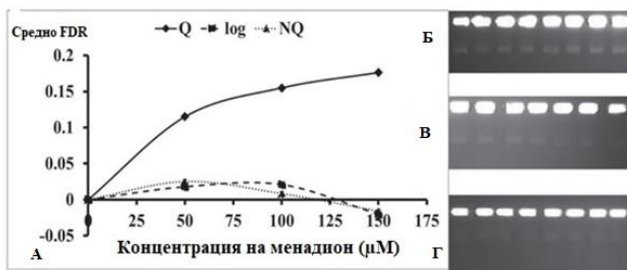
Беше изчислен и капацитетът на репарация за изследваните дрождеви популации (Таблица 1). Установено бе, че при логаритмично растящите клетки той е най-висок, тъй като са необходими само 60 минути време за възстановяване. Логичната причина за това най-вероятно се крие във факта, че при тази клетъчна популация репарационните механизми лесно се активират и имат силна изява. От друга страна, при NQ клетките се отчита загуба на способност за поправяне на индуцираните от зеоцин DSB въпреки периода от време (1 час). Като се има предвид тяхната природа (метаболично неактивни), при Q клетките се наблюдава сравнително слабо повишаване в нивата на DSBs след третиране с различни концентрации на зеоцин и поради тази причина не беше възможно да се изчисли капацитетът за репарация.

Таблица 1: Капацитет за репарация на Log и NQ клетки, изчислен след третиране със зеоцин, в концентрации 100, 200 и 300 µg/ml с 30 и 60 min време за възстановяване

Концентрация на зеоцин (µg/ml)	Log клетки		NQ клетки	
	Време за репарация (min)		Време за репарация (min)	
	30	60	30	60
100	1.25	1.41	0.84	0.87
200	2.41	1.86	1.20	1.02
300	2.29	3.21	0.99	0.88

2.1.3.2. Двойноверижни разриви в ДНК след третиране с менадион:

Тъй като менадионът действа като редокс медиатор и води до генериране на реактивни кислородни видове, които увреждат клетката, следващите анализи бяха насочени към установяване нивата на индуцираните DSBs в ДНК при трите дрождеви клетъчни популации след третиране с различни концентрации на този токсичен агент (Yamashoji et al., 2020).



Фигура 28: Индуциране на DSBs чрез различни концентрации на менадион (50-150µM).

А – индукция на DSB, представена като FDR; Б – Q клетки; В – Log клетки; Г – NQ клетки

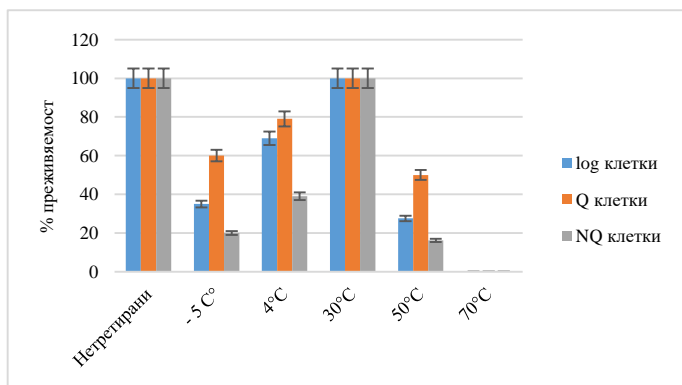
Получените данни показаха, че повишаването на нивата на ROS в Q клетките, в резултат от действието на менадиона (Фиг. 9), съответства с понижаването на клетъчната преживяемост (Фиг. 4) и води до добре изявената индукция на DSB в ДНК. Противоположно на зеоцина, генотоксичният ефект на менадиона в Q клетките е най-силен, най-вероятно поради факта, че те принципно се характеризират с високи нива на кислород и ROS, и съответно нивото на допълнително генериране на токсични радикални форми е значително завишено, а това допринася за по-ефективното нарушаване на ДНК (Фиг. 27) (Allen et al., 2008).

2.2. Оценка на токсикологичното въздействие на различни физични фактори върху растежа на Log, Q и NQ дрождеви популации

Следваща стъпка в изследванията беше да се проучи ефекта на екстремални стойности на няколко физични фактора върху жизнеспособността на различните клетъчни популации на щам *S. cerevisiae* BY4741.

2.2.1. Ефект на температурата върху преживяемостта на дрождевите клетки *S. cerevisiae* BY4741

Преживяемостта на NQ клетките при третиране с ниски или високи температури, за разлика от тази при останалите две клетъчни популации (Q и Log клетки), е най-ниска (Фиг. 28). Този ефект най-вероятно се дължи на факта, че те притежават геномна нестабилност и лесно лизират (Aragon et al., 2008). От друга страна G₀ клетките са най-устойчиви при всички изследвани температури. Тези данни съвпадат и с изследванията на Lu et al., (2009), които съобщават, че чувствителността към топлинен шок е свързана със скоростта на растеж: клетките в стационарна фаза показват по-висока устойчивост към температурен дисбаланс в сравнение с тези, които са в експоненциална фаза на растеж.

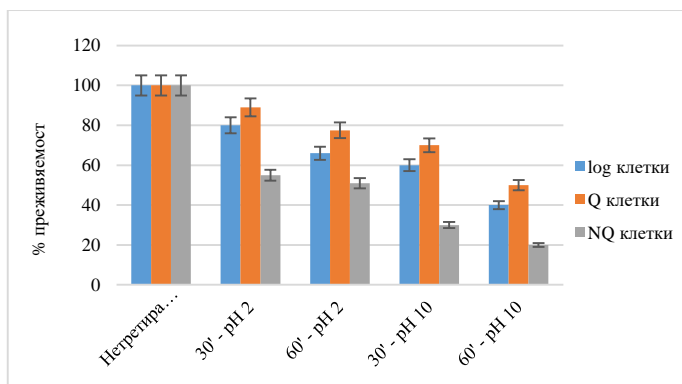


Фигура 29: Влияние на температурата върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

2.2.2. Влияние на рН върху преживяемостта на дрождевите клетки *S. cerevisiae* BY4741

След инкубиране в кисела среда (рН 2.0) за 30 минути, беше отчетена над 90 % преживяемост за G₀ дрождевите микроорганизми, за разлика от пролифериращите

клетки, при които преживяемостта беше под 80 %. Увеличаването на времето за третиране беше свързано със спад в преживяемостта на пролифериращите клетки, като при 60 min инкубация, само 60 % от клетките остават жизнеспособни. При същите условия G₀ клетките показват близо 80 % преживяемост. При NQ клетките се наблюдава най-слаба устойчивост, най-вероятно вследствие на тяхната по-ниска жизнеспособност и способността им бързо да губят възможност да се възпроизведат, тъй като ~50% от тези клетки не могат да формират дъщерно потомство (Фиг. 29) (Aragon et al., 2008).



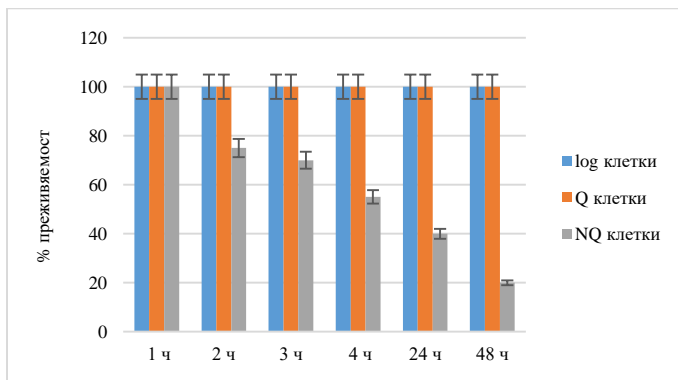
Фигура 30: Влияние на рН върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

2.2.3. Влияние на осмотичен стрес върху преживяемостта дрождевите клетки от щам *S. cerevisiae* BY4741

2.2.3.1. Влияние на хипоосмотичен стрес

Ефектът на хипоосмотичен стрес върху преживяемостта на трите дрождеви клетъчни популации беше изследван, след суспендиране на клетките в стерилна дестилирана вода (Фиг. 30). Установено бе, че както активно растящите клетки, така и тези в състояние на покой дори след 48 часова третиране запазват 100 % жизнеспособност.

За разлика от тях NQ клетките бързо губят своята жизнеспособност и след 48 часа, само 20 % от тях запазват способността си да се репродуцират.



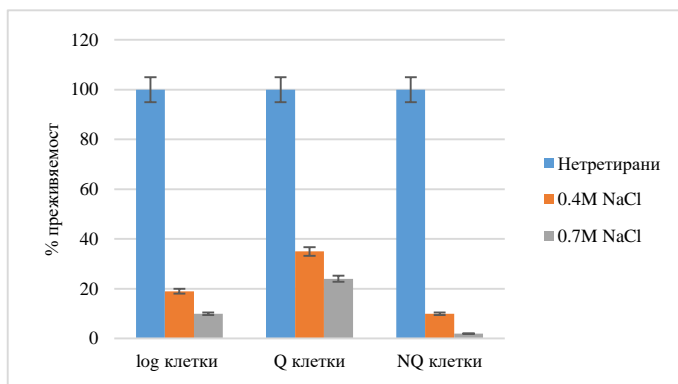
Фигура 31: Влияние на хипоосмотичните условия на средата върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

2.2.3.2. Влияние на хиперосмотичен стрес

Натриев хлорид

Излагането на дрождевите клетки в хиперосмотична среда води до бързо освобождаване на вода в средата, с което клетката се дехидратира. Именно във връзка с това беше изследвана преживяемостта на популации от NQ, Q и логаритмично растящи клетки, след прилагане на хиперосмотичен стрес. За целта трите типа клетки бяха третирани за 20 минути при две концентрации на натриев хлорид в средата – 0.4 и 0.7 M. (Фиг. 31). Получените данни показаха, че NQ клетките бързо губят своята жизнеспособност, което напълно отговаря на схващането, че те са най-неустойчиви към действие с токсични агенти. Q клетките се характеризират с по-голяма устойчивост към високи концентрации на NaCl в средата, тъй като те натрупват трехалоза в процеса на гладуване и преминаването в G₀ клетъчен цикъл (Lilie and Pringle., 1980). За разлика от тях, активно делящите се клетки нямат натрупани запаси от този метаболит и

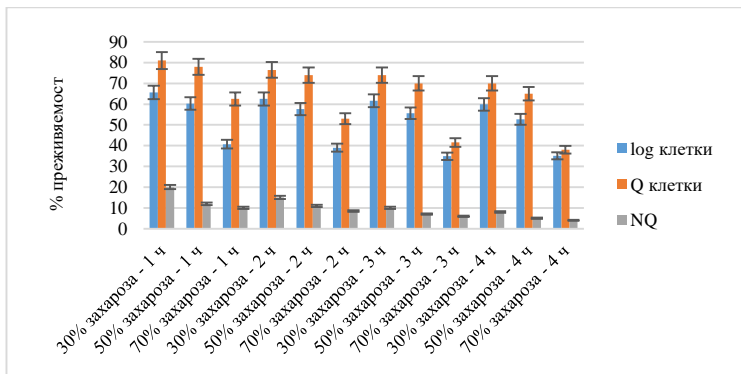
следователно по-малка част от тях успяват успешно да отговорят ефективно на упражненията от високите концентрации на NaCl стрес.



Фигура 32: Влияние на 0.4 и 0.7M NaCl върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Захароза

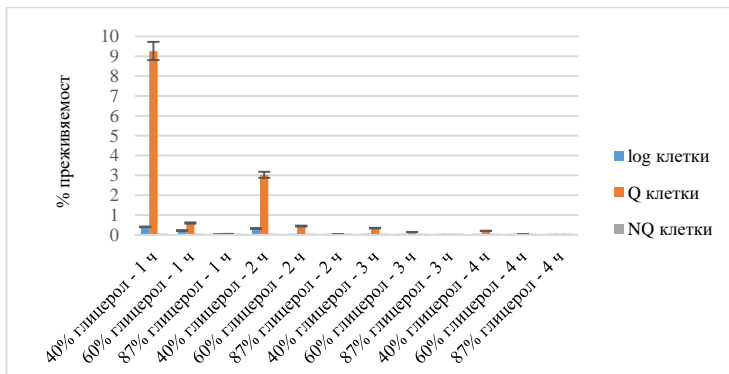
Пролифериращи, G₀ и NQ клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 бяха третираны и със различни концентрации на захароза за 4 часа на стайна температура. Най-рязък спад в преживяемостта на клетките бе отчетен на 1 час от началото на експеримента, като в 30% разтвор на захароза загиват около 35% от логаритмичните клетки, а в 70% разтвор на захароза загиват около 60%. G₀ клетките запазват своята жизненост в рамките на 81% и 62,5% в разтвор на 30% и 70% разтвор на захароза, съответно. На 4 час са отчетени 59,9%, 8% и 70% преживяемост при 30% захароза, и 35%, 4% и 38% преживяемост при 70% захароза, съответно за пролифериращи, NQ и Q клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 (Фиг. 32).



Фигура 33: Влияние на различни концентрации на захароза върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Глицерол

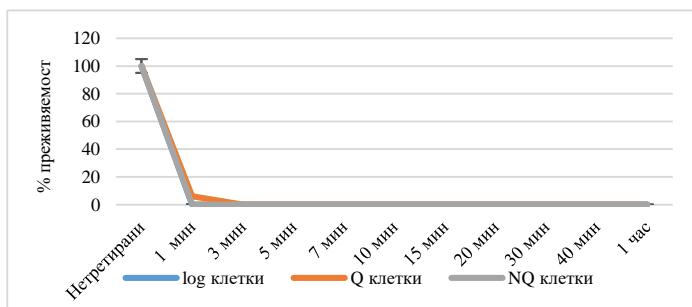
В проведените експерименти бяха използвани три различни концентрации на глицерол (40%, 60%, 87%) с цел да се оцени процентът преживяемост при пролифериращи, Q и NQ клетки. Резултатите са представени на Фиг. 33 и отново показват по-висока устойчивост към хиперосмотичен стрес при клетките, намиращи се в състояние на покой (Q), в сравнение с NQ и експоненциалните. Още на първия час след третиране на клетките с 40% глицерол жизнеспособността рязко спада, като се наблюдава едва 9,3% преживяемост дори и при G_0 клетки. При логаритмично растящите клетки се установява близо 23 пъти по-ниска преживяемост, а от своя страна, NQ клетките са напълно инхибирани от трите приложени концентрации на глицерол.



Фигура 34: Влияние на различни концентрации глицерол върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

2.2.4. Влияние на UV лъчи върху преживяемостта на дрождеви клетки на шам *S. cerevisiae* BY4741

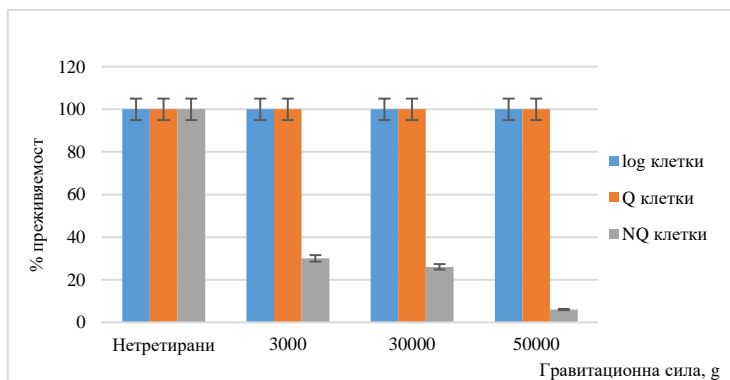
Директното излагане на дрождевите клетки под действието на UV-C₂₅₄ лъчи оказва мощен фунгициден ефект върху тях. Дори след първата минута на въздействие върху трите клетъчни популации, се наблюдава почти 100% инхибиране на растежа, с изключение на клетките, намиращи се в G₀ състояние (6% преживяемост) (Фиг. 34)



Фигура 35: Ефект на UV - лъчи върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

2.2.5. Ефект на гравитационната сила върху преживяемостта дрождеви клетки *S. cerevisiae* BY4741

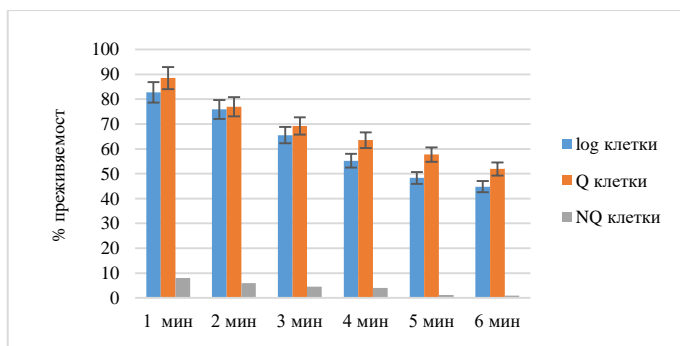
Влиянието на хипергравитацията върху преживяемостта на пролифериращи, Q и NQ клетки беше изследвано чрез центрофугиране на трите клетъчни популации ($OD_{600} = 1.0$) при приложена различна гравитационна сила g ($g = 3000$; $g = 30000$ и $g = 50000$) за различен период от време (от 1 до 4 часа). След приложено $3000g$, при двете клетъчни популации (Q и Log) не беше установено потискане на растежа, дори и след 4-часово центрофугиране. При NQ клетките жизнеността е над 3 пъти по-ниска спрямо останалите два вида клетки на *S. cerevisiae*, както и спрямо контролите. Увеличаването на гравитационната сила с прилагане на $30000g$ и $50000g$ води до почти пълна загуба на жизнеспособност при NQ клетките, съответно 26% и 6%. Останалите две клетъчни популации отново запазват своята преживяемост (100%) при приложена висока гравитация (Фиг. 35).



Фигура 36: Влияние на гравитационната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

2.2.6. Влияние на механична сила върху преживяемостта на дрождеви клетки *S. cerevisiae* BY4741

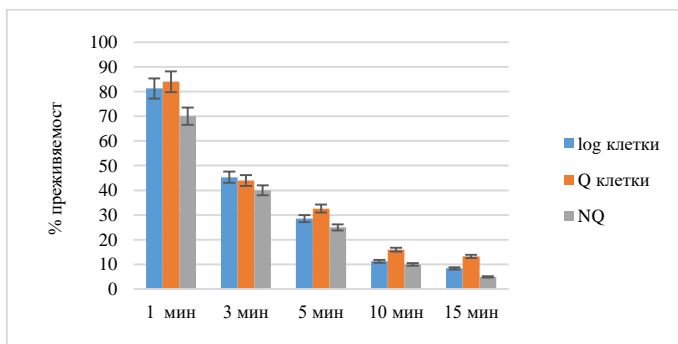
Един от икономически най-ефективните методи за получаване на безклетъчен екстракт от дрождеви клетки е чрез механично дезинтегриране. Ето защо, в хода на проведените експерименти бяха изследвани различни режими и условия на дезинтегриране за дрождеви микроорганизми. Анализирайки получените резултати е видно, че клетките на щам *S. cerevisiae* BY4741 в покой (Q) притежават по-висока устойчивост към въздействие с механична сила, в сравнение с останалите две клетъчни популации, при които се наблюдава плавна редукция на жизнеспособността. Много малък процент разрушени клетки от Log и Q клетъчните популации са установени след 1-минутно дезинтегриране – 17,3 % и 11,5 %, за разлика от NQ клетките, при които се наблюдава 92 % клетъчна дезинтеграция. На всяка следваща минута, до 6 минута, процентът на дезинтегрираните клетки се увеличава с около 7-10% за логаритмичните, 5-7% за G₀ клетките и 2-4 % за NQ клетките. В края на експеримента (6 минута) процентът преживели клетки е 44,8%, 51,9 и 1% съответно за логаритмични, Q и NQ клетки (Фиг. 36).



Фигура 37: Влияние на механичната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

2.2.7. Ефект на ултразвука върху пролифериращи, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741

Установено е, че ултразвуковата кавитация и високите температури действат синергично и водят до потискане на растежа на *S. cerevisiae* (Wordon et al., 2012). Ето защо последващите изследвания бяха насочени към изучаване ефекта на ултразвуковите вълни върху преживяемостта на трите вида клетъчни популации на щам *S. cerevisiae* BY4741. Получените експериментални данни са представени на Фиг. 37. Log, Q и NQ дрождевите клетки бяха третирани с ултразвук в продължение на 15 минути с последващо отчитане на резултатите като процент преживяемост, спрямо контролни, нетретирани с ултразвук клетки. През първата минута от прилагането на ултразвук се потвърждава тенденцията за най-висока преживяемост при Q клетките, последвани от Log и NQ, съответно (84 %, 82,5 % и 70 %).



Фигура 38: Влияние на ултразвука върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

3. *In silico* анализ на гени от сигнални пътища, регулиращи навлизането в състояние на покой и отговора при стрес

Като се има предвид съществуващата зависимост между метаболитните пътища и навлизането в състояние на покой, е удачно създаването на *in silico* модел за изучаване

на регулаторните механизми, важни за навлизането и поддържането на клетъчната хомеостаза в G₀ състояние при дрожди. Ето защо, следваща стъпка в настоящия дисертационен труд беше да се извърши биоинформатичен анализ с цел характеризиране на ключови гени, отговорни за навлизане в G₀ състояние при *S. cerevisiae*. Проведеното изследване беше насочено към сравнително проучване функцията и вътреклетъчната локализация на четири кинази - TOR, Протеин киназа А, Протеин киназа С и Snf1 протеин киназа, както при дрожди, така и при човек.

3.1. TOR протеин киназа

Анализът на *Saccharomyces* геномната база данни (SGD) потвърди, че дрождите *Saccharomyces cerevisiae* притежават два гена *TOR1* и *TOR2*, които кодират съответни протеин кинази:

- *TOR1* (YJR066W) – ген, кодиращ синтезата на Tor1p, PIK-свързана протеин киназа, мишена за рапамицин.
- *TOR2* (YKL203C) – ген, кодиращ синтезата на Tor2p, PIK-свързана протеин киназа, мишена за рапамицин.

TOR1 и *TOR2* кодират два тясно свързани фактора, които регулират растежа на клетките в отговор на наличието на хранителни вещества и стрес (Cardenas et al., 1999; Loewith et al., 2002).

Процентът идентичност, генериран от ClustalW, между аминокиселинните им последователности е значимо, но с идентичност 67.74 %, което показва дивергенция в процеса на еволюция (Фиг. 38 и 39). Те кодират синтеза на периферни мембранни протеини Tor1p и Tor2p – членове на семейството на фосфоинозитид (PI) 3-киназа свързани кинази (PIKK), които действат като серин / треонин кинази, в отговор на наличието на хранителни вещества или растежни фактори.

(van Aelst et al., 1991; Gray et al., 2004; Virgilio., 2011). *In silico* анализът на човешкия геном показва наличието на три гена *PRKACA*, *PRKACB* и *PRKACG*, които кодират каталитичните субединици на PKA. Генът *PRKAR1B* кодира протейн (381 а.а.), който е регулаторна субединица на PKA.



Фигура 42: Сравняване на протеинови секвенциите протеин киназа А при *S. cerevisiae* и човек

При човека са идентифицирани четири различни регулаторни и три каталитични субединици. Процентът идентичност между гените, кодиращи регулаторните субединици на PKA при дрожди и човек е сравнително нисък (33.52 %), но сравняването е значимо и съответните гени могат да се приемат за ортолози (Фиг. 41 и Фиг. 42).

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

```

1: NP_001158230.1 100.00 33.52
2: BCY1           33.52 100.00
    
```

Фигура 43: Матрица за процент идентичност, генерирана от ClustalW

При анализа на вътреклетъчната локализация на протеин киназа А при човека, бе установено наличие на сигнални последователности от типа pat4 и pat 7 за насочване към ядрото. Подобно на дрождевия белтък (Bcy1p) и в този протеин се откриват региони, богати на основни аминокиселинни остатъци, което предполага локализацията на РКА в ядрото (Таблица 3).

Таблица 3: Изследване на вътреклетъчната локализация на протеините, участващи в протеин киназа А (РКА) метаболитния път

Протеин	Ген	Насочваща последователност	% идентичност
Циклична АМФ (сАМР) - зависима протеин киназа (РКА) Трк1р, Трк2р, Трк3р Регулаторна субединица	<i>TPK1, TPK2 и TPK3</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>BCY1</i>	Ядро	33.52%
Циклична АМФ (сАМР) - зависима протеин киназа (РКА) 4 регулаторни субединици	<i>PRKACA, PRKACB, PRKACG</i> <i>Homo sapiens</i> <i>PRKAR1B</i>	Ядро	

1: PKC1	100.00	32.65	33.93	33.43	36.52	36.20
2: XP_016857279.1	32.65	100.00	36.30	43.33	44.19	44.33
3: NP_001341605.1	33.93	36.30	100.00	43.66	49.36	48.99
4: NP_005391.1	33.43	43.33	43.66	100.00	52.73	53.23
5: NP_002728.2	36.52	44.19	49.36	52.73	100.00	80.15
6: NP_002729.2	36.20	44.33	48.99	53.23	80.15	100.00

Фигура 44: Матрица за процент идентичност между човешките и дрождевата протеин киназа С, генерирана от ClustalW

В генома на *S. cerevisiae* посредством приложено биоинформатично изследване беше доказано наличие на един ген *PKC1*, кодиращ синтезата на серин/треонин протеин киназа С (1151 aa) (Таблица 4). Анализът на аминокиселинната секвенция на Pkc1p при *S. cerevisiae* показва ясни сигнали за локализация на белтъка в ядрото (вероятност от 73,9 %). Беше установен и пероксисомален сигнален мотив в N-края – RIQYMLQQL, в позиция 115, определящ вероятност за локализация на белтъка в пероксисомите.

Таблица 4: Изследване на втретрелъчната локализация на протеините, участващи в протеин киназа С (PKC) метаболитния път

Протеин	Ген	Насочваща последователност	% идентичност
Протеин киназа С	<i>PKC1</i> <i>S. cerevisiae</i>	Ядро Пероксисоми	34.5 %
Протеин киназа С – α	<i>PRKCA</i> <i>Homo sapiens</i>	Ядро	
Протеин киназа С – β	<i>PRKCB</i> <i>Homo sapiens</i>	Ядро ЕПР	
Протеин киназа С – δ	<i>PRKCD</i> <i>Homo sapiens</i>	ЕПР	
Протеин киназа С – ε	<i>PRKCE</i> <i>Homo sapiens</i>	Митохондрии Ядро Пероксисоми	
Протеин киназа С – ζ	<i>PRK CZ</i> <i>Homo sapiens</i>	Митохондрии ЕПР	

3.4. Snf1p протеин киназа

Генът *SNF1* кодира дрождевия хомолог на човешката АМФ-активирана протеин киназа (АМРК). АМРК при висши еукариоти се активира чрез преки алостерични промени от различни стресови въздействия, които променят съотношението на АТФ / АМФ в средата (Hardie et al., 1998). *In silico* анализът на генома на *S. cerevisiae* показва наличие на един ген, кодиращ Snf1p протеин киназа, който показва 46.93 % хомоложност в аминокиселинната последователност с 5' АМФ – активирана протеин киназа (АМРК) (NP_006243.2) при човек (Фиг. 45 и 46). Сравнително високия процент на сходство показва, че генът, кодиращ Snf1p протеин киназа е ортолог на АМРК при човека. АМРК съществува като хетеротримерен протеинов комплекс, който е изграден от α , β , и γ субединици. Каталитичните α -субединици се кодират от гените *PRKAA1*, *PRKAA2*. β и γ субединиците се кодират съответно от гените *PRKAB1*, *PRKAB2* и *PRKAG1*, *PRKAG2*, *PRKAG3* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=human>).

NP_006243.2	-----MAELQKDGRRVKTGHVYLDGT	21
SNF1	MSSNNMNTITAPANANSSHHHHHHHHHHGHGGSNSTLIRNPSSSLADGASHIGYQIVKT	60
NP_006243.2	LVGVTFGVVKIGEHQLTGHKVAVKILNRQVIRSLDVGKIKREIQNLKFRPHPIKLVQ	81
SNF1	LEGGSGFVKVLAHYHTTGGKVALKIINNKVLAKSDMQGRIEREISYLRLLRPHIKLVQ	120
NP_006243.2	VISTPTDFPFWMEVYSGGELFDYICKHGRVVEEARLQQQLLSAVDYCHRIMVHRDLK	141
SNF1	VIKSKDEIIMVEIYA-GNELFDYVQRQMSSEQEARRFFQQTISAVEYCHRHKIVHRDLK	179
NP_006243.2	PENVLLDAHNNAKIADFGLSMWISDGEFLRTSCGSPHYAAPEVTSGRLYAGPEVDIWSG	201
SNF1	PENLLDDEHLNKKIADFGLSNIMTDGNFLKTS CGSPHYAAPEVTSGRLYAGPEVDIWSG	239
NP_006243.2	VILYALLCGTLPFDDHVPFLFKLIRGGVFYIPEYLRISVATLQPHLQVDPKKAATIKD	261
SNF1	VILYMLCRLLPFDDESIPLVFKNTSHGVTYLPKFLSPGAAGLIKRMILVIMPLNRTSIE	299
NP_006243.2	IREHEWFKQDLPSYLPPEQPSYDAN-----VIDDEAVKVECEKFECT	303
SNF1	IHQDQWFKVDLPYLLPPLKPHPEEENENWDSKDGSSPNDIIDNLLNILLSITMGE	359
NP_006243.2	ESEVWNSLYSGD---PQDQLAVAYHLIDNRRIMNQ-----ASEFYLASSPPSGSF	351
SNF1	KDEIYESLESSEDTAPNEIRDAYMLIKENKSLIKDQKANKSVSDELOTFLSQSPPTFQQ	419
NP_006243.2	-----ND-----DSANHPPGLKPHPER	369
SNF1	QSKSHQSQVDHETAKQARRMASAITQQRTYHQSPPHDQYEEEDTSVNLPTSLPQIHR	479
NP_006243.2	HPPLTADSPFARCPDLNITTKPLSLAVKCAQMLGEGSSQSPYDIMEVYRMMQLDFE	429
SNF1	AWLADGSP-----AAKTSPLVTKSLTSHFGTRSSSYPLQVMEVYALNQLGAE	532

Фигура 45: Сравняване на секвенциите на Snf1p протеин киназа при *S. cerevisiae* с АМРК при човек.

1: SNF1 100.00 46.93
 2: AAB32732.1 46.93 100.00

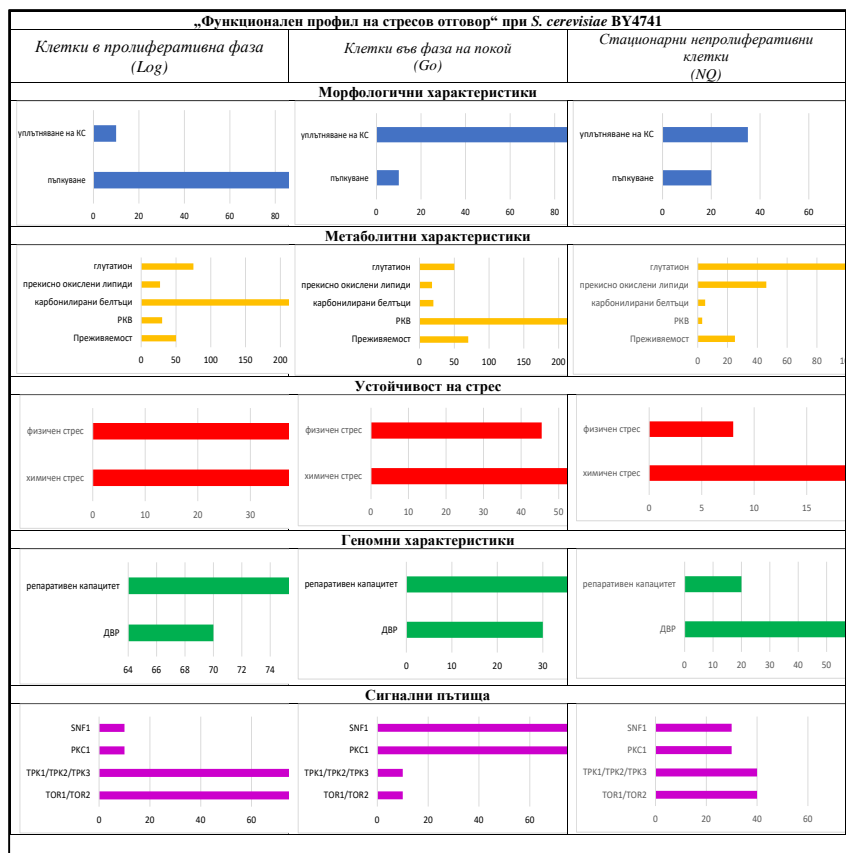
Фигура 46: Матрица за идентичност между изследваните Snf1p и AMPK

Изследването с PSORT II показва, че в транслираната ДНК последователност на човешкия ген AMPK, не присъстват характерни сигнали за локализация в определена клетъчна структура (Таблица 5). С най-голяма вероятност този ензим се локализира в цитоплазмата на клетката (65.2 %).

Таблица 5: Изследване на втреклетъчната локализация на протеините, участващи в Snf1p протеин киназния път

Протеин	Ген	Насочваща последователност	% идентичност
Snf1p – протеин киназа	<i>SNF1</i> <i>S. cerevisiae</i>	Ядро Вакуола Цитоплазма ЕПР	46.93%
АМФ-активирана протеин киназа – каталитична субединица 2(AMPK)	<i>PRKAA2</i> <i>Homo sapiens</i>	Цитоплазма Ядро	

Въз основа на всички проведени изследвания и анализирането на получените научни данни бе съставен „Функционален профил“ за отговор към стрес на клетки *S. cerevisiae*, намиращи се в различна фаза на клетъчния цикъл – пролиферативни, G₀ и стационарни непролиферативни фаза (Фиг. 47).



Фигура 47: Функционални профили на стресов отговор при Log, Q и NQ клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741. Представените данни изобразяват в % изменението на изследваните показатели спрямо нетретираните контролни култури.

ИЗВОДИ

1. Установено е, че навлизането на клетката в G_0 клетъчен цикъл се провокира в условия на лимитация по един или няколко от основните биогенни елементи в средата и се достига висок процент на клетки в покой при култивиране за 168 часа на среда YPD.
2. Експериментално определените LD_{50} токсичните дози за използваните химични агенти са както следва: 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ за менадион, 5 mM/ml за водороден пероксид, 1,1 mg/ml за ибупрофен и 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ за зеоцин.
3. Показано е, че всички изследвани токсични препарати най-силно потискат растежа на NQ дрождевата клетъчна популация.
4. Установено е, че от изследваните четири химични агента, зеоцинът оказва най-силен токсичен ефект върху изследваните дрождеви популации, като инхибира 100 % растежа на NQ и Log клетките и 95 % - на дрождите в G_0 състояние.
5. Ибупрофенът слабо повлиява клетъчната жизнеспособност на изследваните дрождеви популации на *S. cerevisiae* BY4741.
6. Наблюдавано е, че ефектът на някои от приложените токсични агенти зависи от специфичната фаза от жизнения цикъл – H_2O_2 по-силно повлиява клетки в логаритмична фаза, а менадионът клетки в покой (G_0).
7. Стресовият отговор при G_0 клетките на *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 към различни токсични агенти значително се различава от този на активно пролифериращите и нелатентните стационарни клетки. Той зависи не само от фазата на клетъчния цикъл (логаритмична, G_0 и/или стационарна), а също така и от специфичния механизъм на цитотоксично действие на съединението.
8. Най-висок процент вътреклетъчни повреди при въздействие с различни лекарствени (зеоцин, ибупрофен) и токсични (H_2O_2 , менадион) препарати се

наблюдава при активно делящи се клетки – до 50 % увеличаване на нивото на окислени липиди и над 200 % - на карбонилирани протеини.

9. G₀ клетки в покой на *S. cerevisiae* BY4741 са най-устойчиви на химични въздействия и показват най-ниски нива на вътреклетъчни повреди (< 25 %).

10. Установена е по-ниска ДНК чувствителност на G₀ клетките в сравнение с тази на клетки в логаритмична фаза на растеж.

11. Получените експериментални данни не показват дозово-зависимо увеличаване на количеството индуцирани ДВР в зависимост от използваната концентрация на зеоцин.

12. Най-висок капацитетът на репарация е установен при логаритмично растящите клетки (60 минути време за възстановяване).

13. Клетките, намиращи се във фаза на покой са значително по-устойчиви на физични въздействия и показват многократно по-висока преживяемост в условия на ниски и високи температури, UV облъчване и хиперосмотичен стрес.

14. Гените и протеините, които играят ключова роля за навлизането и излизането от G₀ клетъчния цикъл при дрожди, имат съответни хомолози при човека.

15. Дрождевите регулаторни протеини TORp, PKAp, PKCp и Snf1p могат да бъдат насочени към различни вътреклетъчни компартменти, което осигурява по-голяма метаболитна пластичност на дрождевите клетки.

ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С НАУЧЕН ХАРАКТЕР:

1. Изучен е адаптивния отговор на моделните култури *S. cerevisiae*, в различна фаза на клетъчния цикъл, към въздействието с различни физични фактори и токсични химични съединения и са доказани ключови различия между тях.
2. Определен е генотоксичния и ДНК увреждащ потенциал на широко употребяваните токсични лекарствени препарати менадион и зеоцин в зависимост от приложената концентрация и физиологичното състояние на клетъчната популация.
3. Получена е ценна информация, че G_0 клетките на *S. cerevisiae* подобно на раковите клетки се характеризират със силно повишени вътреклетъчни нива на ROS.
4. Чрез прилагането на съвременни биоинформатични подходи е показано, че гените и протеините, които играят ключова роля за навлизането и излизането от G_0 клетъчен цикъл при дрожди, имат съответни хомолози при човека, които в процеса на еволюция са претърпели различна степен на дивергенция (хомоложност между 32.65% - 46.93%).
5. За първи път са разработени моделни сравнителни „Функционални профили на стресов отговор“ при клетки *S. cerevisiae* BY4741, намиращи се в различна фаза на клетъчния цикъл – пролиферативна, G_0 и нелатентна стационарна.

ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР:

1. Разработен е успешен методологичен подход за получаване и изолиране на моделни клетки в състояние на покой (G_0) от щам *S. cerevisiae* BY4741 – тест система за изследване на клетъчните молекулни механизми на токсично действие и функционално профилиране на генетичните изисквания за химическа толерантност.

2. За първи път е показано, че G₀ дрождевите клетки имат значително по-висока устойчивост на действието на зеоцин, което представлява важна информация от медико-биологична гледна точка – метаболитно неактивните еукариотни клетки са много по-слабо податливи на действието на противотуморни антибиотици.
3. Намалената метаболитна активност на дрождите в G₀ състояние обуславя по-голямата им стабилност и устойчивост на въздействието на различни токсични агенти. Това ги прави подходяща моделна система за изследване на основните токсикологични механизми на вредни вещества при животни и човек.
4. G₀ клетките са по-устойчиви на химичен и физичен стрес от пролифериращите и стационарните нелатентни клетки, което ги прави подходящи и за потенциални индустриални приложения.

ПУБЛИКАЦИИ

1. **Marinovska P.**, Todorova T., Tomova A., Pisareva E., Boyadzhiev K., Dimitrov M., Parvanova P., Dimitrova M., Chankova S., Petrova V., (2022). *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells as a test system for assessing Zeocin toxicity. In: Chankova S., Peneva V., Metcheva R., Beltcheva M., Vassilev K., Radeva G., Danova K., (Eds) Current trends of ecology. BioRisk 17: 105–116. **Q2**, SJR 0.3, IF 0.167.
2. **Marinovska PG.**, Todorova TI., Boyadzhiev KP., Pisareva EI., Tomova AA., Parvanova PN., Dimitrova M., Chankova SG., Petrova VY., (2022). Cellular susceptibility and oxidative stress response to menadione of logarithmic, quiescent, and nonquiescent *Saccharomyces cerevisiae* cell populations. In: Chankova S., Peneva V., Metcheva R., Beltcheva M., Vassilev K., Radeva G., Danova K., (Eds) Current trends of ecology. BioRisk 17: 127–138. <https://doi.org/10.3897/biorisk.17.77320>. **Q2**, SJR 0.3, IF 0.167.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Постери:

- **Polya Marinovska**, Ventsislava Petrova. Zeocin induces mitochondrial DNA breaks and ROS accumulation in *S. cerevisiae* Log, Q and NQ cell populations. SCIENTIFIC CONFERENCE „KLIMENT'S DAYS” (04/11 2022).
- **Polya Marinovska**, Emilia Pisareva, Anna Tomova, Ventsislava Petrova. Influence of physical factors on logarithmic, quiescent and non-quiescent *S. cerevisiae* cells. „INTERNATIONAL SEMINAR OF ECOLOGY” (29/09-30/09 2022).
- **Polya Marinovska**, Emiliya Pisareva, Anna Tomova, Ventsislava Petrova. *IN SILICO* analysis of genes from signalling pathways regulating quiescence in yeasts. „SCIENTIFIC CONFERENCE „KLIMENT'S DAYS” (05/11 2021).
- **Polya Marinovska**, Teodora Todorova, Anna Tomova, Emiliya Pisareva, Krassimir Boyadzhiev, Martin Dimitrov, Petya Parvanova, Maria Dimitrova, Stephka Chankova, Ventsislava Petrova. Quiescent yeast cells for assessing Zeocin toxicity. „13th INTERNATIONAL SEMINAR OF ECOLOGY” (29/09-30/09 2021).
- Anna Tomova, **Polya Marinovska**, Ventsislava Petrova. Response of proliferating and quiescent *Saccharomyces cerevisiae* cells to menadion and H₂O₂ toxicity. „14 конгрес на микробиолозите в България с международно участие” (10/10-13/10 2018).

2. Секционен доклад

- **Polya Marinovska**, Teodora Todorova, Krassimir Boyadzhiev, Emiliya Pisareva, Anna Tomova, Petya Parvanova, Maria Dimitrova, Ventsislava Petrova and Stephka Chankova. Cellular susceptibility and oxidative stress response to Menadione of logarithmic, quiescent and nonquiescent *Saccharomyces cerevisiae* cell populations. „13th INTERNATIONAL SEMINAR OF ECOLOGY” (29/09-30/09 2021).

УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ

Национални проекти:

1. „Състояние на покой при *Saccharomyces cerevisiae* - модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор”, номер: ДН11/10/15.12.2017, МОМН;
2. „Разработване на нови биологични наночастици от слюзта на градински охлюв *Cornu aspersum* като антимикробни агенти“, номер: КП-06 ПН-61/8 от 2022г. BG-175467353-2022-04-0065, МОМН.

Международни проекти:

1. „Green Technology Foresight about challenges from biotechnology and ICT - Digit-BioTech” номер: 2019-1-BG01-КА203-062371, програма ЕРА3ЪМ +;
2. „Smart Decision Tools for Reducing Hazards to Our Environment and Water Resources by Rehabilitating Open Dump” номер:2020-1-TR01-КА226-VET-098150.