

На правах рукописи

Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гhazi

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ТОКСИЧНОСТИ И КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ВЫЗВАННЫХ НОВЫМИ И
КЛАССИЧЕСКИМИ ПРОТИВОГРИБКОВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2024 г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Существует большое количество патогенных грибов, вызывающих болезни растений, животных и человека. Описано более 8000 видов фитопатогенных грибов. (Velasco et al., 2018). Среди возбудителей болезней растений фитопатогенные грибы являются основной причиной чрезвычайно разрушительных эпидемий сельскохозяйственных культур. (El-Baky & Amara, 2021). Известно около 625 различных видов грибов, способных инфицировать позвоночных; около 200 видов грибов представляют опасность для человека. (Fisher et al., 2020). Ежегодно от болезней, вызванных патогенными грибами, умирает более 1,5 млн. человек. (Bongomin et al., 2017; Brown et al., 2012). Растущая заболеваемость микозами во всем мире и одновременная эволюция самих патогенных грибов, устойчивых к некоторым или ко всем современным антифунгальным препаратам, делают эти организмы большой угрозой для здоровья и жизни человека (Fisher et al., 2020). Для борьбы с патогенными грибами требуются эффективные препараты-антимикотики. В настоящее время существует только четыре класса антифунгальных препаратов, одобренных для лечения системных микозов – это азолы, полиены, эхинокандины и флуцитозин, что сильно ограничивает возможности врачей – микологов в лечении (Fisher et al., 2018). Ограниченная эффективность антифунгальных препаратов в результате возникновения устойчивых патогенов приводит к затяжным заболеваниям, неудачам в лечении и более высоким показателям смертности. Все выше сказанное отражает актуальность и важность задачи поиска новых антимикотиков и выяснения механизмов их действия.

В данной работе разработан новый подход к анализу ответа клеток грибов на воздействие веществ с антимикотической активностью. Это облегчает решение практических задач, связанных с созданием новых антимикотиков и с устойчивостью микроорганизмов к антифунгальным препаратам. В частности, это позволяет быстро проводить сравнение основных аспектов механизма действия известных веществ с неизвестными, позволяет сравнивать основные аспекты механизма действия между различными модификациями веществ, отличающихся по клинически-значимым параметрам, а также идентифицировать важные особенности механизма действия, которые могут способствовать более полному изучению этого механизма с помощью других методов.

Степень разработанности темы

Поскольку проблема борьбы с патогенными бактериями, грибами и другими видами для человека, животных и сельскохозяйственных растений и продукции является крайне актуальной, множество научных лабораторий и компаний синтезируют новые химические вещества, воздействующие на различные микроорганизмы. Их эффективное применение и дальнейшая модификация для повышения эффективности, требуют детального понимания механизмов их действия. Обычные подходы включают идентификацию мутантов с устойчивостью или чувствительностью к изучаемому веществу (Lee et al., 2014) или анализ клеточного ответа на химические вещества, с использованием транскриптомных и (или) протеомных данных на основе масс-спектрометрии (МС), что применимо как для токсичных, так и для нетоксичных веществ. В настоящее время для анализа механизмов действия антифунгальных препаратов в основном используют транскриптомные и, основанные на МС, протеомные методы, которые обеспечивают получение большого количества данных о клеточном ответе на химическое или иное воздействие, включая информацию о тысячах транскриптов или белков, а также о сплайсинге и посттрансляционных модификациях. Эти методы не позволяют определять реакцию на изучаемые вещества отдельных клеток и процессов, происходящих в ограниченных подгруппах клеток в популяции, что может привести к потере важной информации, необходимой для понимания механизма действия вещества. Например, небольшая подгруппа клеток может быть представлена персистерами (Yaakov et al., 2017) — клетками с повышенной устойчивостью к препарату, которые могут демонстрировать уникальный ответ. Кроме того, грибы способны образовывать биопленки (Ramage et al., 2023), в которых клетки часто имеют разную морфологию, что также может влиять на устойчивость к антифунгальным препаратам (Harrison et al., 2007). Таким

образом, наблюдение на уровне отдельных клеток важно для изучения резистентности микроорганизмов к исследуемым веществам. *S. cerevisiae* является хорошо охарактеризованным эукариотическим организмом. С помощью инструментов геномной инженерии, дрожжи *S. cerevisiae* можно использовать для изучения механизмов действия антифунгальных соединений методом скрининга мутантов в сочетании с транскриптомным и протеомным анализами, и последующей проверкой гипотез с применением обширных библиотек мутантов (Winzeler et al., 1999). Многочисленные исследователи применяли этот подход для выяснения механизмов действия антифунгальных агентов (Agarwal et al., 2003) (Anderson et al., 2003). Для высокопроизводительных и высокоинформативных исследований различных явлений, таких как шум на уровне белков (Newman et al., 2006); репликативное старение (Yang et al., 2015) а также более узконаправленных исследований, например, эффекта соседнего гена (Egorov et al., 2021) используются систематические коллекции дрожжей, экспрессирующие GFP-меченые белки (Huh et al., 2003) и проточную цитометрию. В частности, сообщалось о полезности использования ограниченного набора белков-репортеров для изучения клеточного ответа на стресс с помощью направленной протеомики на основе масс-спектрометрии (Soste et al., 2014). Такие инструменты идеально подходят для получения протеомных данных на клеточном уровне.

Цель работы

Целью настоящего исследования является разработка высокоэффективного метода получения характеристик ответа клеток грибов на воздействие веществ с антифунгальной активностью и применение этого метода для характеристики и сравнения механизмов действия известных и новых видов антимикотиков на клетки дрожжей. Помимо основной цели, в рамках работы также было запланировано охарактеризовать ряд новых полиеновых антимикотиков с точки зрения их эффективности против дрожжей с нарушениями пути биосинтеза эргостерола и клеточной гибели.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Сформировать панель штаммов *S. cerevisiae*, продуцирующих белки, меченные GFP, которая позволит изучить реакции различных внутриклеточных систем, включая изменения в клеточном цикле на воздействие антимикотиков.
2. Применить с использованием проточной цитометрии созданную панель для анализа и сравнения клеточных ответов на вещества с антимикотической активностью, для которых известен механизм действия, и для которых механизм действия еще не описан. К последним относятся производные тиазолидина, новое гибридное соединение тиазолидина и азола L173 и алкилированные нуклеозиды.
3. Сравнить чувствительность штаммов дрожжей с нелетальными нарушениями биосинтеза эргостерола к модифицированным полиенам с повышенной растворимостью в воде.
4. Исследовать фунгицидное и фунгистатическое действие натамицина и его новых производных на дрожжевые клетки.

Научная новизна

Предложенный и протестированный в данной работе подход основан на использовании метода проточной цитометрии для анализа изменений уровня экспрессии большого набора белков, меченных GFP. При этом один штамм дрожжей используется для анализа изменений уровня экспрессии одного белка. Полученные результаты исследования 12 веществ с антимикотической активностью с известными и неизвестными механизмами действия показывают, что метод, названный SCRAPPY (Single Cell Rapid Assay of Proteome Perturbation in Yeast; одноклеточный экспресс-анализ изменения протеома дрожжей), может быть использован для быстрого и простого получения протеомного профиля клеточного ответа на широкий спектр химических веществ.

Основная новизна выполненной работы заключается в скорости проведения и экономичности разработанного теста: Метод позволяет в течение короткого времени получить протеомный профиль клеточного ответа на широкий спектр химических веществ, что делает его удобным для масштабного тестирования различных условий применения антифунгальных препаратов. Количественные и воспроизводимые результаты для изменения уровня белка в ответ на действие одного вещества (или ряда веществ) могут быть получены за 5-6 часов и требуют работы одного человека.

Метод SCRAPPY даёт возможность проводить анализ на уровне одной клетки, что позволяет получить данные, которые недоступны или сложно выполнимы с помощью других методов, таких как: методы, основанные на анализе роста клеток на твердых питательных средах на чашках Петри и масс-спектрокопии. Уникальная возможность измерять уровни белков на уровне одной клетки способствует выявлению клеточной гетерогенности биологических реакций, которые могут остаться незамеченными при массовом анализе. Это предоставляет важные сведения об адаптации клеток к исследуемым веществам. В частности, в нашей работе была продемонстрирована возможность наблюдения за влиянием различных веществ на прохождение клеточного цикла, а также описано ранее неизвестное явление гетерогенного ответа клеток на воздействие тиазолидиновых антимикотиков, которое заключалось в изменении уровня ряда митохондриальных белков только в части клеточной популяции.

Такой анализ также позволяет оценивать клеточный ответ только в живых клетках, при одновременном применении красителей, которые оценивают проницаемость клеточной мембраны. Соответственно, метод может быть применен при концентрациях препарата, близких к терапевтическому диапазону применения. Поскольку другие методы оценивают популяцию клеток, а не индивидуальные клетки, значительное число мертвых клеток, белки которых могут выходить из цитоплазмы клетки, что может исказить результаты таких исследований.

В результате работы впервые были получены сведения о механизмах действия ряда антимикотиков, в частности, впервые получены данные о реакции клеток грибов на тиазолидиновый антимикотик микозидин, который одобрен Минздравом РФ для наружного применения. Микозидин приводит к индукции переносчика глюкозы Hxt3, и отсутствие этого белка вызывало чувствительность к этому веществу.

Также впервые охарактеризован механизм действия алкилированных аналогов цитидина. Показано, что вещества SOV4 и SOV8 вызывают увеличение количества белков Hom2 и Aro3, участвующих в синтезе ароматических аминокислот, и белка окислительного стресса Trx2.

Наконец, было исследовано новое гибридное соединение L173, состоящее из азольной и тиазолидиновой части. Было продемонстрировано сходство с ответом на азольные, но не тиазолидиновые антимикотики (микозидин), что указывает на то, что активной является только его азольная часть.

Помимо метода SCRAPPY, в работе было впервые показано, что широко используемый в медицине и пищевой промышленности натамицин, обладает необычным фунгицидным действием, так как приводит к наиболее эффективной гибели клеток при концентрации близкой к МИК, но при концентрации выше МИК его фунгицидное действия становится значительно менее эффективным.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные предоставили новую информацию о механизме действия некоторых из проанализированных веществ с неизвестным механизмом и продемонстрировали специфическое увеличение уровня белков, отвечающих за работу тех систем клетки, на которые нацелены вещества с известным механизмом действия. Таким образом созданный метод представляет большой интерес для быстрой характеристики механизма действия различных биологически активных соединений и в особенности антимикотиков.

Включение дрожжевого гистонового белка Htb2-GFP позволило легко отслеживать влияние соединений на клеточный цикл. Был разработан новый практичный метод выявления изменений клеточного цикла. Таким образом подходы, разработанные в ходе данного исследования, могут найти широкое применение в различных областях, таких как микробиология, биотехнология и разработка лекарственных препаратов. Например, разъяснение молекулярного механизма действия антимикотиков позволяет исследователям и врачам более точно настраивать стратегии лечения, предвидеть механизмы резистентности и оптимизировать терапевтические результаты.

Методология и методы исследований

В работе использовали современные микробиологические, молекулярно-генетические методы, а также методы биоинформатического анализа. Применялись следующие методы исследования: фенотипические методы определения устойчивости к антифунгальным препаратам согласно M27M44S, Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антифунгальным препаратам» (2022). Проточно-цитометрический анализ изменений уровня GFP-меченых белков и эксперименты на основе флуоресцентной микроскопии. Кроме того, были применены различные статистические методы анализа, что позволило эффективно интерпретировать данные и сделать обоснованные выводы на основе экспериментальных результатов. Подробное описание методов представлено в главе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту

С использованием систематической коллекции GFP-меченых штаммов *S. cerevisiae* был создан эффективный метод (получивший название SCRAPPY - **S**ingle **C**ell **R**apid **A**ssay of **P**roteome **P**erturbation in **Y**east) для изучения реакции отдельных дрожжевых клеток на действие различных биологически активных веществ, в том числе антимикотиков. Например, микозидин и его производное (3В-Мус) показали индукцию транспортера глюкозы Hxt3. Алкилированные нуклеозиды SOV4 и SOV8 повышают уровень белков, участвующих в биосинтезе ароматических аминокислот, а также в окислительном стрессе. 2-Мэркаптопиридин-N-оксид (MP) и новое соединение 11326083 вызывали индукцию Cup1-1-GFP и Cup1-2-GFP, которые являются металлотионеинами, участвующими в детоксикации меди. Более того, SCRAPPY метод позволяет легко определить роль каждой части гибридной молекулы L-173, состоящей из азольной и тиазольной частей.

Изучено влияние ряда антимикотиков на клеточный цикл дрожжей с использованием количественного определения белка количества гистона Htb2-GFP в отдельных клетках дрожжей.

Показано, что микозидин - производное тиазолидина, обладающее фунгицидным действием на клетки *S. cerevisiae*, повышает уровень белка-переносчика глюкозы Hxt3. Кроме того, воздействие на клетки микозидином приводит к повышению уровней митохондриальных белков (Ald4 и Idp1) в части популяции клеток, и вызывает изменения в морфологии митохондрий.

Показано, что различные модификации полиенов в разной степени изменяют свою минимальную ингибирующую концентрации (МИК) в зависимости от наличия мутаций в пути биосинтеза эргостерола.

Впервые показано, что натамицин обладает необычным фунгицидным действием, так как приводит к наиболее эффективной гибели клеток при концентрации близкой к МИК, но при концентрации выше МИК его фунгицидное действия становится значительно менее эффективным.

Апробация результатов

Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: на Юбилейной V научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (18 декабря 2020, РУДН, Москва, Россия), 3-м Российском Микробиологическом Конгрессе (26 сентября – 1 октября 2021, Псков, Россия), симпозиуме

института Вестердайка по грибковой эволюция в Академии искусств и наук Королевства Нидерланды (17-18 апреля 2023, Амстердам, Нидерланды), Международном форуме природоподобных технологий (КурчатовГенТех-2023) (17–20 октября 2023, Москва, Россия), XI Международной научно-практической конференции молодых ученых современных тенденции развития технологий здоровьесбережения (30 ноября - 1 декабря 2023, Москва) и Всероссийской VIII научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» на базе Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН (13 — 14 декабря 2023, Москва, Россия).

Внедрение результатов исследования в практику

Работа предоставляет быстрый и экономически эффективный инструмент для хемо-протеомного профилирования на уровне отдельных клеток и имеет потенциал для понимания клеточных ответов на биологически активные вещества, включая антифунгальные препараты. Это облегчает исследование механизмов действия новых антимикотиков. В свою очередь, это может помочь бороться с проблемой микозов и антифунгальной резистентностью. Данные, полученные методом SCRAPPY, были использованы командой в Институте ФИЦ биотехнологии РАН для исследования нового профиля соединения с неизвестным механизмом действия алкилированных цитидинов и продемонстрировали участие биосинтеза ароматических аминокислот и окислительного стресса.

Степень достоверности полученных результатов

Результаты, полученные в ходе данной работы, являются статистически достоверными и были получены в необходимом количестве повторов. Использованные методы, включают проточную цитометрию, флуоресцентную микроскопию, тестирование чувствительности к биологически-активным веществам, спектрофотометрию и анализ гибели клеток. Первичный анализ исходных данных проводился с помощью программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter). Впоследствии для дальнейшего анализа были использованы пользовательские скрипты Python. Сравнение белка между обработанными и контрольными клетками проводили с использованием двух метрик: кратного изменения флуоресценции и вычисления z-критерия. Статистический анализ был проведён с использованием различных методов для оценки влияния обработок на измеряемые переменные и проверки надежности полученных результатов. В частности, для сравнения значений внутри зависимых выборок применялся парный t-тест, а для анализа данных, не соответствующих требованиям нормальности, использовался тест Фридмана, дополненный пост-хок тестом Данна-Бонферрони. Для изучения взаимосвязей между переменными и оценки силы этих связей были использованы коэффициенты корреляции Спирмена и Пирсона. Применение таких разнообразных методов обеспечило высокую степень надёжности и достоверности полученных данных.

Личный вклад автора

Диссертационная работа представляет собой законченный, самостоятельно выполненный труд автора. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в проведении всех экспериментальных работ, включая проверку противогрибковой активности новых препаратов, отбор и выделение штаммов *S. cerevisiae*, проведение фенотипических и протеомных тестов, анализ результатов и их подготовка для публикации статей, проведение анализа отечественных и зарубежных источников литературы, подготовку докладов, оформление диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование, включающее вопросы изучения механизмов токсичности и клеточной гибели пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, вызванных новыми и классическими антифунгальными препаратами, соответствует паспорту специальности 1.5.11 микробиология (биологические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 5 и 12 паспорта специальности.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 12 научных работ, из них 6 в журналах, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и WOS, 6 – в иных изданиях, в сборниках научно-практических конференций и материалах форума.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «материалы и методы», главы «результаты и их обсуждение», заключения, выводов, списка литературы и приложений. материалы диссертации изложены на 178 страницах машинописного текста, включая 17 таблиц и 31 рисунок. Список литературы содержит 212 работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материал для исследования Для изучения клеточной реакции на стресс, вызванный различными противогрибковыми соединениями, использовали штамм *S. cerevisiae* BY4741 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) и его производные из ранее созданной коллекции штаммов, содержащих С-концевые GFP-метки на интересующих нас белках (Huh et al., 2003), Гены, кодирующие эти белки, модифицировались в геноме на их 3'-конце, что соответствует С-концу белка, т. е. регуляторные участки генов были идентичны таковым у белков дикого типа. Изначально выбрали 150 белков, помеченных GFP, из библиотеки дрожжей с GFP. Исключили белки, которые было сложно наблюдать на фоне из-за низкого уровня флуоресценции. Выбранные белки играют роль в различных клеточных процессах, включая биосинтез и катаболизм аминокислот, репарацию ДНК, углеводный обмен, биосинтез липидов, реакцию на окислительный стресс и активацию путей, связанных с термотолерантностью и покоем. Были использованы десять штаммов *S. cerevisiae*, BY4741 продуцирующих различные меченые гистоны. Эти штаммы анализировали методами проточной цитометрии, для проверки возможности GFP-меченых гистонов отражать изменения содержания ДНК. Это белки Hhf1, Hhf2, Hho1, Hht1, Hht2, Hta1, Hta2, Htb1, Htb2 и Htz1. Штаммы *S. cerevisiae* BY4742 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*) и его мутанты, содержащие делеции генов (*ERG6*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG5* и *ERG4*) взяли из библиотеки EUROSCARF (<http://www.euroscarf.de/>) и использовали для определения чувствительности мутантов эргостеролового пути к полиенам и их производным. Мутантные штаммы, содержащие делеции в генах (*PDR5* и *HXT3*), были использованы для изучения возможной роли этих генов в чувствительности клеток к микозидину. Препараты, выбранные для тестирования, включали соединения с известными механизмами действия: флуконазол и вориконазол, которые относятся к классу азольных антимикотиков, а также флуцитозин и ионофор меди, родственный пиритиону цинка (2-меркаптопиридин-N-оксид (MP)). В работу был включен туникамицин, известный индукторнарушенного фолдинга белков эндоплазматического ретикулума. Были протестированы вещества с неизвестными механизмами действия, включая N4-алкиловые цитидины (Ala-54, SOV4 и SOV8), топический антимикотик Микозидин и его бензоильные производные (3-Мус). SDS был использован в качестве стрессора мембраны/клеточной стенки, а также потому, что он влияет на прохождение клеточного цикла, как было показано в нашей лаборатории. Проверили влияние модификаций химической структуры на активность полиеновых противогрибковых препаратов и их производных с использованием мутантных штаммов *S. cerevisiae* BY4742. К таким полиеновым противогрибковым препаратам относятся натамицин и его производные (LCTA3282 и LCTA3115), нистатин и его производные (LCTA3285, LCTA3255 и LCTA3317) и амфотерицин и его производные (LCTA3114, LCTA3283 и LCTA3315). Эти вещества были приобретены у фармацевтических компаний или синтезированы в лаборатории биомедицинской химии Федерального исследовательского центра биотехнологии и Института новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе.

Методы исследования. В ходе выполнения работы использованы различные методы исследования. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) испытуемых соединений определяли методом микроразведений согласно M27M44S, Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антигрибковым препаратам» (2022).

Для проточной цитометрии был использован проточный цитометр Cytotflex S (Beckman Coulter) с 96-луночным пробоотборником для оценки изменения уровня 64 GFP-меченых белков дрожжевых штаммов *S. cerevisiae* BY4741 при воздействии тестируемых противогрибковых препаратов в концентрациях 0,5x и 1x МИК. Флуоресценцию GFP детектировали с помощью лазера 488 нм и фильтра эмиссии 525/40 FITC. Первичный анализ данных проводили с помощью программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter), а дальнейший анализ осуществляли с использованием пользовательских скриптов Python, разработанных Федором Рябовым (<https://github.com/fedorrik/scraper>). Статистический анализ проводился с использованием различных методов для оценки влияния обработок на измеряемые переменные и проверки надежности результатов, включая парный t-тест, тест Фридмана с коррекцией Данна-Бонферрони и коэффициенты корреляции Спирмена и Пирсона для изучения взаимосвязей между переменными. Методом флуоресцентной микроскопии исследовали внутриклеточную локализацию митохондриальных белков Ald4-GFP и Idp1-GFP после воздействия микоцидина. Изображения дрожжевых клеток были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscop 40 (Zeiss, Оберкохен, Германия). Влияние различных препаратов на клеточный цикл изучали, контролируя уровни меченого гистонового белка Htb2-GFP в дрожжевых клетках *S. cerevisiae* BY4741 с помощью проточной цитометрии. Эксперименты по определению роста и гибели клеток проводили с использованием штамма *S. cerevisiae* BY4742, а также его мутантных делеционных штаммов. Их либо высевали на твердую среду YPD, содержащую различные концентрации препаратов (микоцидин, натамицин и его производные) при начальной OD600 1 с 5-кратным серийным разведением (для анализа роста), либо суспендировали в дистиллированной воде, дополненной различными концентрациями исследуемых препаратов при OD600 = 0,05, с последующим высевом на твердую среду YPD. Новые синтезированные амидные производные полиенов были протестированы на улучшенную растворимость в воде по сравнению с исходными соединениями с помощью УФ-спектрофотометрии на спектрофотометре NanoDrop (Implen-NP80, GmbH, Germany).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка метода SCRAPPY (одноклеточный экспресс-анализ изменения протеома у дрожжей) для характеристики реакции отдельных грибковых клеток на воздействие веществ с противогрибковой активностью

Для исследуемых соединений определены минимальные значения ингибирующей концентрации по отношению к дикому штамму *S. cerevisiae* BY4741. Значения МИК представляют собой самую низкую концентрацию каждого противогрибкового средства, которая полностью ингибирует видимый рост грибка через 24–48 ч. Полученные результаты сведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1 - Результаты значений МИК (мкг/мл) исследуемых соединений.

Наименование препарата	МИК (мкг/мл)
5-фторцитозин (5-FC)	50
Флуконазол (Flu)	15.6
Вориконазол (Vor)	0.04
2 меркаптопиридин-N-оксид (MP)	4.3
11326083	15.4
Микоцидин	15.6
3-бензоильное производное микоцидина (ЗВ-Мус)	15.6
L-173	31
Туникамицин	2
Додецилсульфат натрия (SDS)	0.1
3'-амино-N4-додецил-5-метил-2',3'-дидезоксицитидин (SOV4)	20
3'-диметиламино-N4-децил-5метил 2',3'дидезоксицитидин (SOV8)	28
N4-додецил-2'-дезоксицитидин (Ala-54)	>300

После определения МИК каждого препарата относительно штамма ВУ4741, который является родителем GFP-меченой коллекции штаммов, использованной в этом исследовании, предположили, что МИК или половины МИК (МИК/2), при которой клетки все еще могут пролиферировать, будет достаточно для индуцирования клеточного ответа. Таким образом, каждый препарат был протестирован в двух концентрациях (МИК и МИК /2) в течение шести часов, и каждый тест повторялся не менее трех раз. Представленные данные были рассчитаны только для живых клеток, так как в мертвых клетках наблюдается утечка многочисленных внутриклеточных белков. Для оценки воспроизводимости эксперимента был рассчитан коэффициент корреляции Спирмена для сравнения серий изменений уровней белков под действием препаратов в разных повторностях эксперимента. Почти все исследуемые вещества продемонстрировали высокую воспроизводимость эксперимента, так как средние значения коэффициента корреляции превышали 0,7.

1.1. Общие реакции на изучаемые соединения

Обзор полученных данных показал, что значительное число отобранных белков повышается в ответ на большинство различных изучаемых соединений (рисунок 1). Например, многочисленные белки, участвующие в реакции теплового шока (Hsp104, Hsp12 и Hsp78) и протеостазе (Ssa1 и Ssa4), а также белки, участвующие в углеводном обмене (Tsl1, Pgm2, Ald4, Hxk1, Pda1 и Idp1), индуцировались рядом различных веществ.

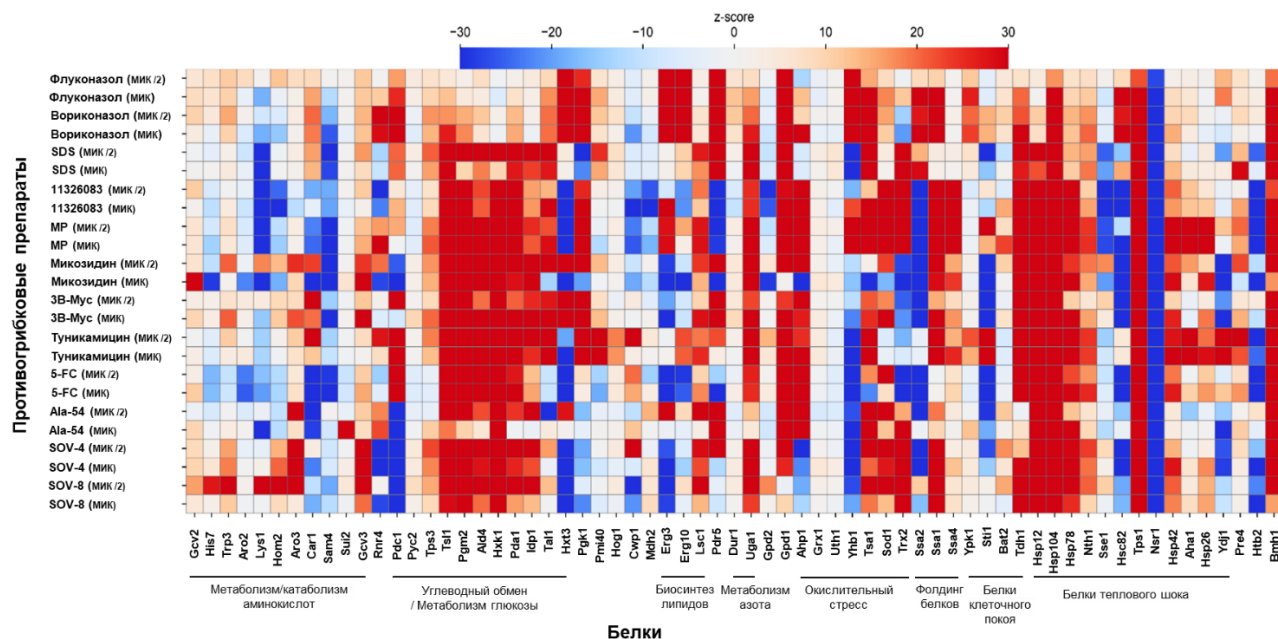


Рисунок 1 - Результаты измерения изменений уровня белков под действием исследованных веществ. Тепловая карта количества белков в клетке, созданная по результатам анализа флуоресценции GFP-меченных белков методом проточной цитометрии. Изменения в количестве белка, меченного GFP, выраженное в Z-score по шкале -30/30. Красный – увеличенные количества, синий – сниженные

1.2. Специфический протеомный ответ на действие исследуемых препаратов

1.2.1. Химические вещества с известным механизмом действия

1.2.1.1 Азолы

Флуконазол и вориконазол, два соединения из класса азолов, были выбраны, поскольку они являются противогрибковыми препаратами, используемыми в клинике. Целью было сравнить действие двух соединений, нацеленных на одну и ту же мишень. В отличие от других изучаемых соединений, флуконазол и вориконазол значительно ($p < 0,05$) вызывали устойчивое повышение количество белков Erg3 и Erg10. Более того, Индукция белка Pdr5, который облегчает отток

лекарств из клетки, также усиливалась азолами. Эта реакция не является азол-специфичной и наблюдается и для некоторых других соединений в панели штаммов. Кроме того, белки окислительного стресса показали четкую реакцию при воздействии на дрожжи азолом. Например, Yhb1 и (в меньшей степени) Tsa1 (рисунок 1 и рисунок 2).

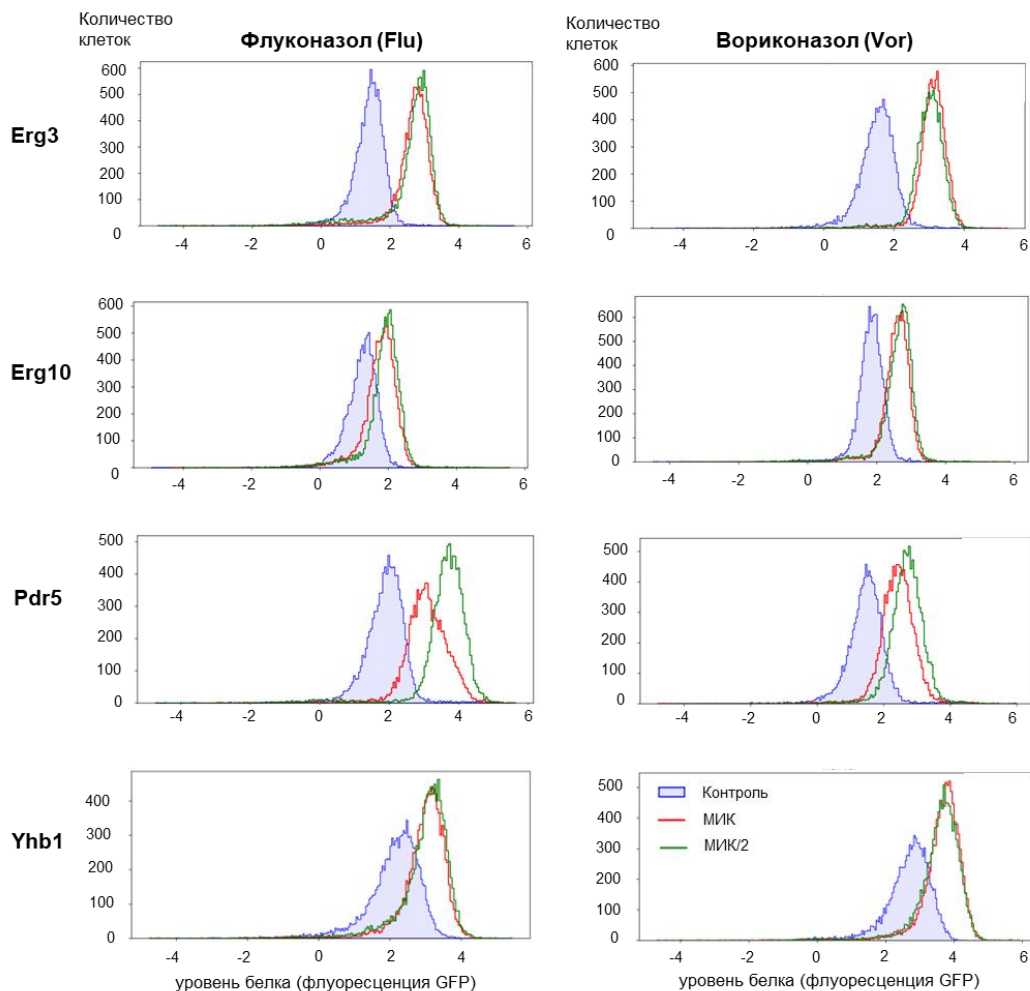


Рисунок 2 – Азолы вызывают увеличение уровня белков, задействованных в биосинтезе липидов, а также транспортера ксенобиотиков.

1.2.1.2 Транспортеры молекул двухвалентных металлов

Исследовали 2-меркаптопиридин-N-оксид (MP), входящий в состав известного препарата против перхоти пиритиона цинка. Известно, что пиритион цинка индуцирует приток меди и цинка в клетки грибов. Кроме того, протестировали недавно синтезированное химическое соединение, называемое 11326083, которое похоже по структуре с недавно изученным соединением, направленном против микобактерий, которое вызывает приток меди в бактерии. При воздействии на дрожжи этих веществ, значительно ($p < 0,05$) наблюдали повышение уровней белков Ahr1, Sod1, Trx2 и Ssa4 (рисунок 1 и рисунок 3), повышение уровня которых ассоциировано с окислительным стрессом, а также самую сильную, из полученных при воздействии этих веществ, индукцию шаперона Ssa4, что указывает на протеотоксический стресс, вероятно, из-за окисления белка. Примечательно, что оба соединения значительно ($p < 0,05$) снизили уровень Lys1 (рисунок 1), что является уникальным среди представленных наборов данных.

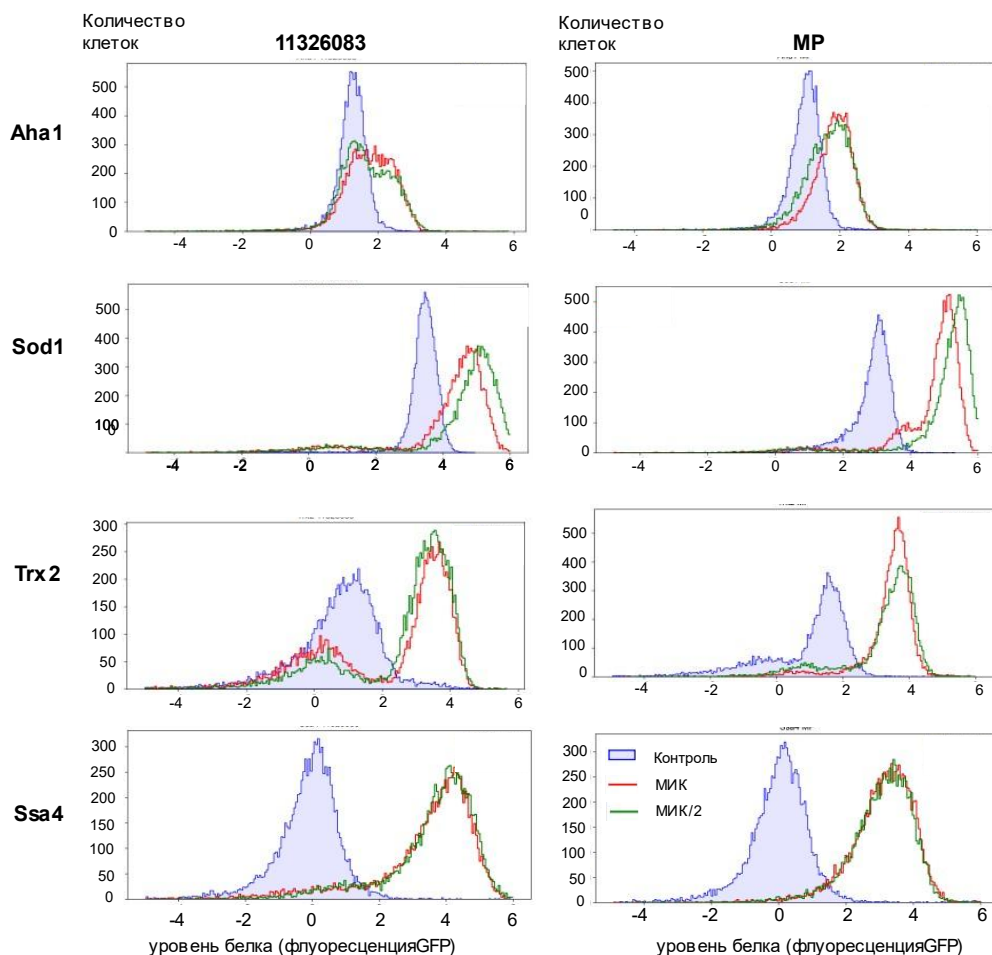


Рисунок 3 – Вещества MP и 11326083 вызывают сильный окислительный и протеотоксический стресс.

Чтобы подтвердить, что накопление в клетках меди является результатом воздействия на них веществ 11326083 и MP, эти препараты были протестированы на индукцию синтеза белков Cup1-1-GFP и Cup1-2-GFP, которые являются защитными металлотioneинами, участвующими в детоксикации меди. Эти белки показали устойчивое увеличение в присутствии препаратов 11326083 и MP (рисунок 4). Примечательно, что увеличение количества защитных ферментов намного слабее при МИК -эквивалентных концентрациях вещества 11326083, и реакция клеток на его воздействие сохраняется при гораздо более высоких концентрациях чем МИК.

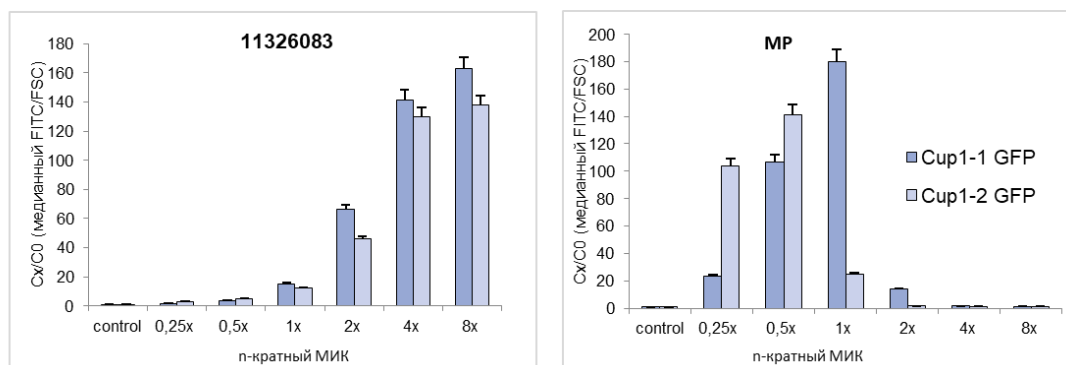


Рисунок 4 – Вещества MP и 11326083 демонстрируют специфическое увеличение ферментов Cup1-1/2-GFP, связывающих ионы меди.

1.2.1.3 Туникамицин

Известно, что туникамицин ингибирует присоединение гликозидных цепей к полипептидам в эндоплазматическом ретикулуме, вызывая их неправильное сворачивание. Как видно на рисунке 11, туникамицин значительно ($p < 0,05$) вызывал увеличение количества белков Pmi40 и Pre4 в клетках дрожжей. Белок Pmi40 превращает фруктозо-6-фосфат в манноза-6-фосфат, что необходимо для его гликозилирования в секреторном пути. Белок Pre4 является субъединицей протеасомы, участвующей в деградации поврежденных белков ЭПР. Кроме того, туникамицин значительно ($p < 0,05$) вызывал увеличение количеств Ydj1 и Tsa1, которые являются партнерами Hsp70 (рисунок 5).

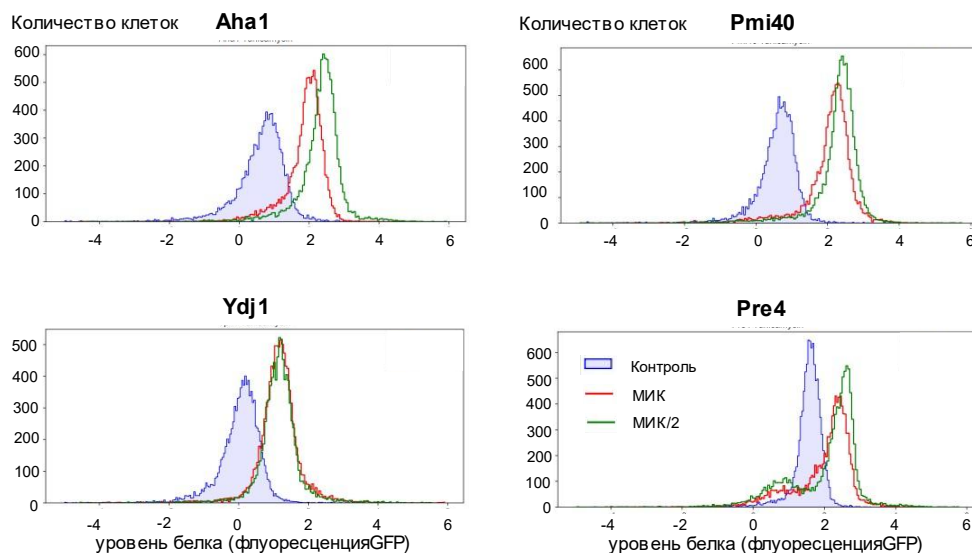


Рисунок 5 – Туникамицин индуцирует специфическое повышение уровня белков Pmi40 и Pre4.

1.2.2 Исследование профилей ответа на вещества с неизвестным механизмом действия

1.2.2.1 Алкилированные аналоги цитидина

Метод SCRAPPY применили для изучения клеточных эффектов в ответ на воздействие на них химических веществ с неизвестным механизмом действия - N4-алкил-цитидинов (Ala-54, SOV4 и SOV8). Эти вещества представляют собой класс химических соединений, используемых для защиты произведений искусства от разложения, вызванного грибковыми патогенами, хотя их механизм действия пока остается неизученным. Для сравнения также был протестирован метод SCRAPPY на противогрибковом препарате на основе нуклеиновых кислот, который используется в клинике - 5-FC. Как показано на рисунке 6, наблюдали заметное ($p < 0,05$) повышение количества некоторых белков, связанных с биосинтезом аминокислот, а именно Hom2, Aro3 и несколько менее ярко выражено Trp3. Кроме того, наблюдалась повышение количества Trx2, участвующего в реакции на окислительный стресс. SOV-4 и Ala-54 также приводили к повышению количества Pdr5.

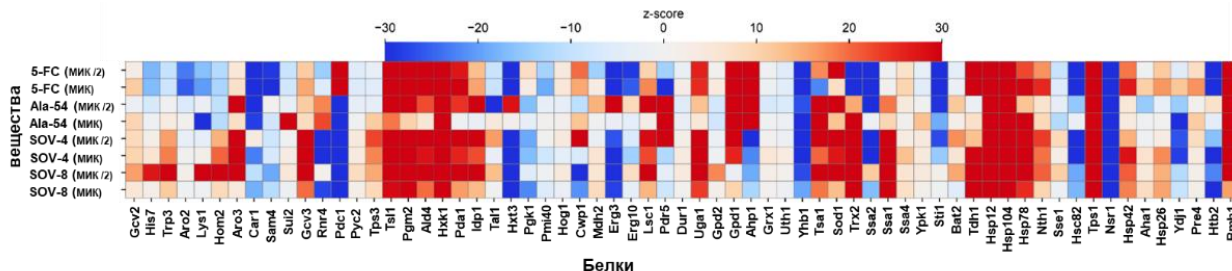


Рисунок 6 – Алкилированные аналоги цитидина вызывают увеличение уровня ряда белков, участвующих в биосинтезе аминокислот, и белков, ассоциированных с окислительным стрессом.

1.2.2.2 Тиазолидин-2,4-дион

1.2.2.2.1 Микозидин и его 3-бензоильное производное (3В-Мус)

Микозидин[®], 3,5-замещенное производное тиазолидин-2,4-диона, является противогрибковым препаратом для местного применения. Механизм их действия не охарактеризован, но недавно было продемонстрировано, что его действие сопровождается разрушением клеточной стенки грибов. Микозидин и его 3-бензоильное производное (3В-Мус) не показали характерного специфического профиля, за исключением того, что как и азолы, они значительно ($p < 0,05$) показали увеличение количества транспортера глюкозы Hxt3 (только при низкой концентрации микозидина) и переносчика лекарств Pdr5 (рисунок 1 и рисунок 7).

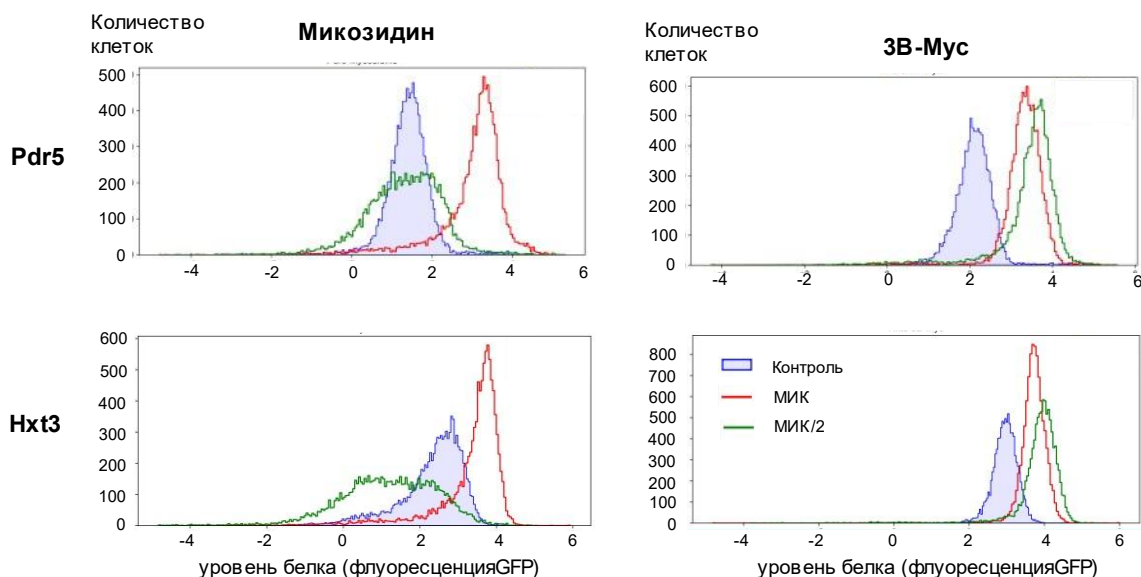


Рисунок 7 – Микозидин и его производное 3В-Мус индуцируют продукцию белков Hxt3 и Pdr5.

Чтобы проверить влияние различных концентраций микозидина на продукцию двух белков-транспортеров: Pdr5 и Hxt3, измерили их уровень их флуоресценции при различных концентрациях микозидина (от 0,5х до 4×МИК). Примечательно, что увеличение количества этих белков наблюдалось только при концентрации микозидина 0,5×МИК и исчезало при его более высоких концентрациях (рисунок 8).

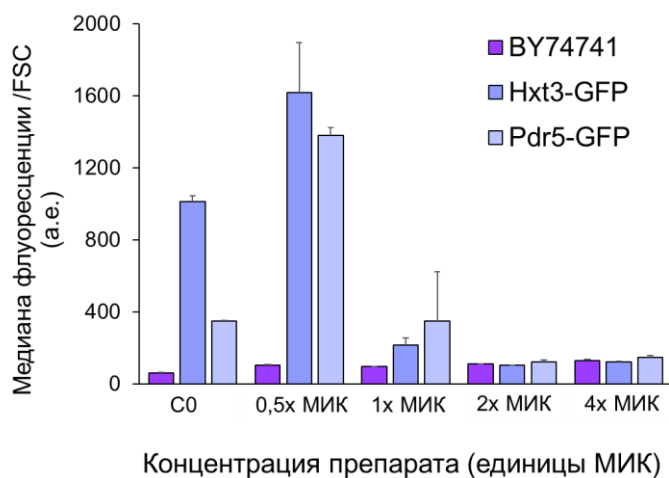


Рисунок 8 – Цитометрический анализ показывает, что количество белков Pdr5 и Hxt3 увеличивается после обработки клеток *S. cerevisiae* микозидином в концентрации 0,5×МИК (7,8 мкг/мл). Представленные данные – значения медиан флуоресценции живых клеток (не окрашиваются PI).

Определив, что уровень белков Pdr5 и Hxt3 увеличивается под действием микоцидина, было решено проверить, влияют ли эти белки на чувствительность клеток к микоцидину, используя штаммы, содержащие делеции соответствующих генов. Делеция *PDR5* не имела эффекта, в то время как делеция *HXT3* повышала чувствительность дрожжей к микоцидину (рисунок 9).

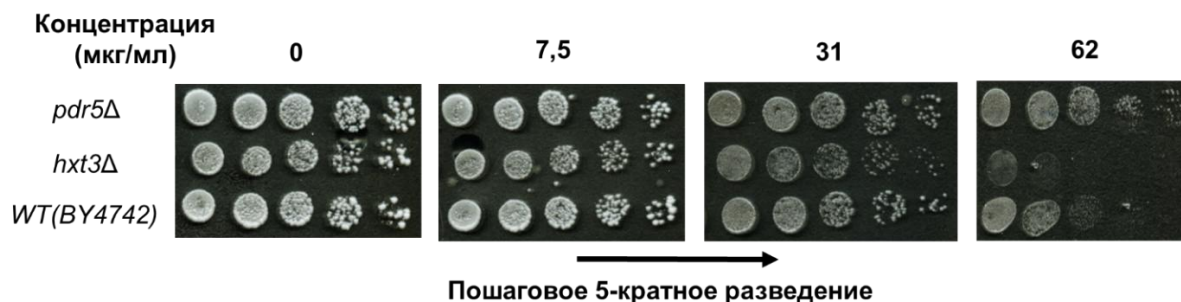


Рисунок 9 – Рост на среде YPD, содержащей различные концентрации микоцидина, штаммов дрожжей BY4742 дикого типа и мутантных штаммов *pdr5Δ* и *hxt3Δ*.

1.2.2.2.2 Вещество L-173

Вещество L-173 представляет собой недавно синтезированное гибридное производное тиазолидина-2,4-диона (ТЗД) и триазола, которое проявляет высокую противогрибковую эффективность. Однако, на сегодняшний день не известно является ли его антигрибковое действие комбинированной активностью тиазолидина и азольного фрагмента, или механизм его действия отличается от действия исходных веществ. Используя метод SCRAPPY, сравнили клеточные эффекты вориконазола, флуконазола, микоцидина и гибридного соединения L-173. Результаты показаны на рисунке 10. Оказалось, что реакция клеток на воздействие микоцидина и азолов сильно различается. В то же время L-173 показал реакцию аналогичную реакции на азольные препараты, как, например, значительное ($p < 0,05$) повышение количества Erg3 и Yhb1. L-173 приводил к менее сильному увеличению количества Hxt3, чем азольными соединениями, в то время как микоцидин демонстрировал увеличенное количество Hxt3 при концентрации МИК/2 и сниженное - при МИК. Наконец, L-173, по сравнению с азолами и микоцидином, не оказывает значимого влияния ($p > 0,05$) на уровни белков Vmh1 и Hsp104. Был рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s) для анализа связи между кратными изменениями медианных уровней белка. При концентрации МИК соединение L-173 демонстрировало незначительную, очень слабую положительную корреляцию с микоцидином ($r_s = 0,000787$, $p = 0,995$), но значительную сильную положительную корреляцию с флуконазолом ($r_s = 0,558$, $p < 0,001$) и вориконазолом ($r_s = 0,747$, $p < 0,001$). Аналогично, при 0,5-кратной концентрации МИК L-173 проявлял незначительную положительную корреляцию с микоцидином ($r_s = 0,055$, $p = 0,663$), значительную умеренную положительную корреляцию с вориконазолом ($r_s = 0,446$, $p < 0,001$) и значительную сильную положительную корреляцию с флуконазолом ($r_s = 0,5288$, $p < 0,001$).

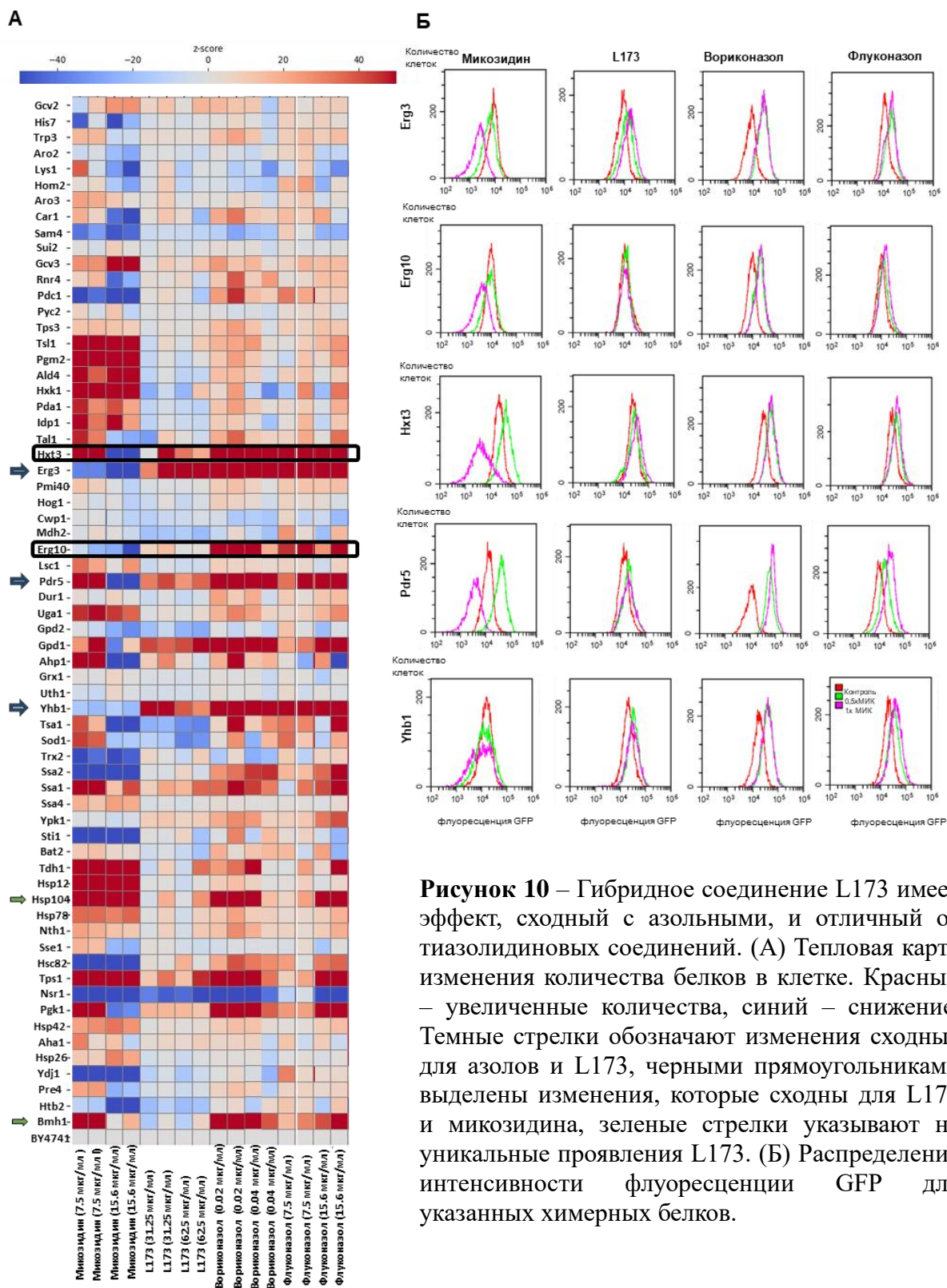


Рисунок 10 – Гибридное соединение L173 имеет эффект, сходный с азольными, и отличный от тиазолидиновых соединений. (А) Тепловая карта изменения количества белков в клетке. Красный – увеличенные количества, синий – снижение. Темные стрелки обозначают изменения сходные для азолов и L173, черными прямоугольниками выделены изменения, которые сходны для L173 и микозидина, зеленые стрелки указывают на уникальные проявления L173. (Б) Распределение интенсивности флуоресценции GFP для указанных химерных белков.

На тепловой карте (рисунок 10) представлено, что был зафиксирован повышенный уровень *Pdr5*. При делеции гена *PDR5* наблюдалась повышенная чувствительность дрожжевых клеток к азолам и L-173, но не к микозидину (рисунок 11А). Более того, микозидин вызывал значительное ($p < 0,05$) снижение интенсивности *Erg3* в отличие как от азолов, так и от L-173. После делеции *Erg3* наблюдалась повышенная чувствительность дрожжей к микозидину, тогда как резистентность как к азолам, так и к L-173 увеличивалась. (рисунок 11Б).

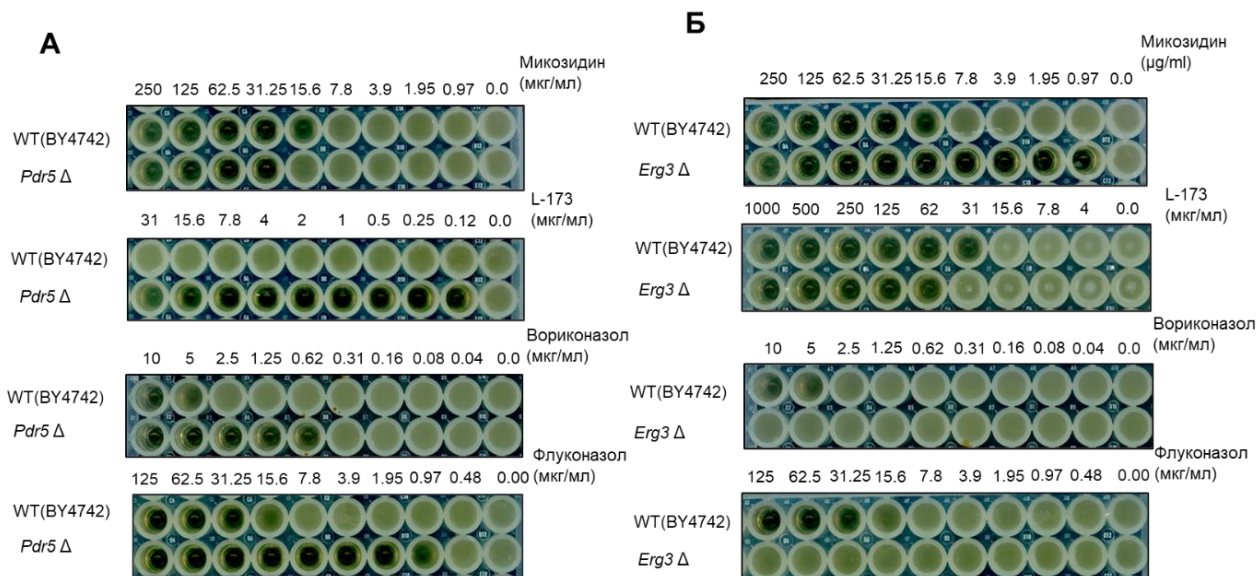


Рисунок 11 - определение МИК азолов, триаколидина и их гибридного соединения L-173 для делеционных мутантов *pdr5*Δ и *erg3*Δ. **А)** делеция гена *PDR5* вызывает повышение чувствительности к азолам и L-173, но не к микозидину. **Б)** делеция гена *ERG3* вызывает чувствительность к микозидину и устойчивость к азолам и L173.

Неоднородные изменения уровней митохондриальных белков в клеточной популяции

Возможность проточной цитометрии предоставлять данные на уровне отдельных клеток позволяет методу SCRAPPY ответить на вопрос о том, могут ли различные клеточные популяции в суспензии по-разному реагировать на воздействие лекарственных препаратов. Распределение флуоресценции для каждого белка из панели проанализировали и провели их скрининг вручную. В то время как большинство белков реагировало на воздействие антимикотиков одинаково (унимодально), уровень митохондриального белка Ald4-GFP или широко распределялся по популяции клеток или был несколько бимодальным. В ответ на обработку дрожжей некоторыми препаратами (5-FC, медь-транспортные препараты и триаколидины) часть клеток сохранила свой исходный уровень флуоресценции, в то время как другая (значительная) часть продемонстрировала повышенный уровень белка. Idp1, который также является митохондриальным белком, продемонстрировал такую же реакцию, но только после лечения триаколидинами, как показано на рисунке 12.

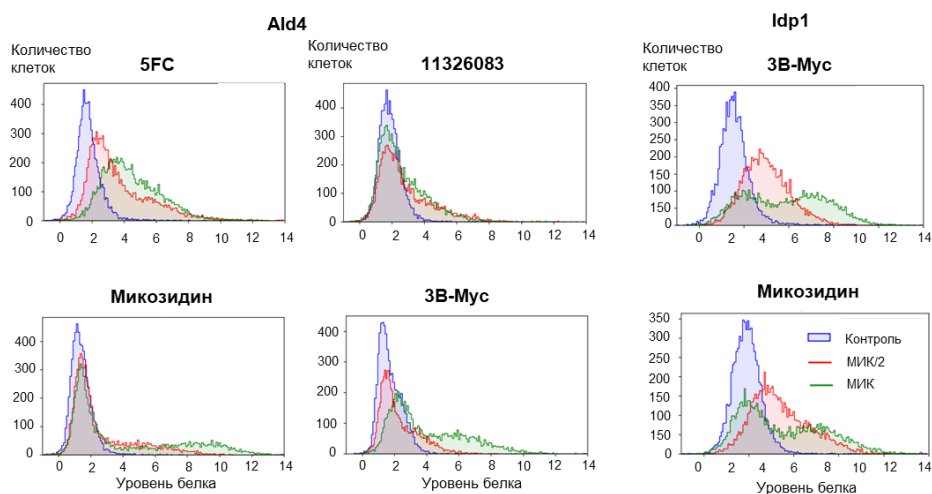


Рисунок 12 – Митохондриальные белки Ald4 и Idp1 проявляют неоднородную реакцию на воздействие различных веществ. Распределение после обработки ненормально или бимодально.

Для подтверждения данных, полученных с помощью проточной цитометрии, изучали локализацию соответствующих белков в клетках при их обработке микозидином с помощью флуоресцентной микроскопии. В контрольных клетках (без обработки изучаемых препаратов) митохондрии представляли собой единые длинные нитевидные структуры, а после обработки клеток препаратами, в случае обоих белков наблюдалось явное изменение морфологии митохондрий, а также гетерогенные изменения количества белка. Это полностью подтверждает данные, полученные методом проточной цитометрии (рисунок 13).

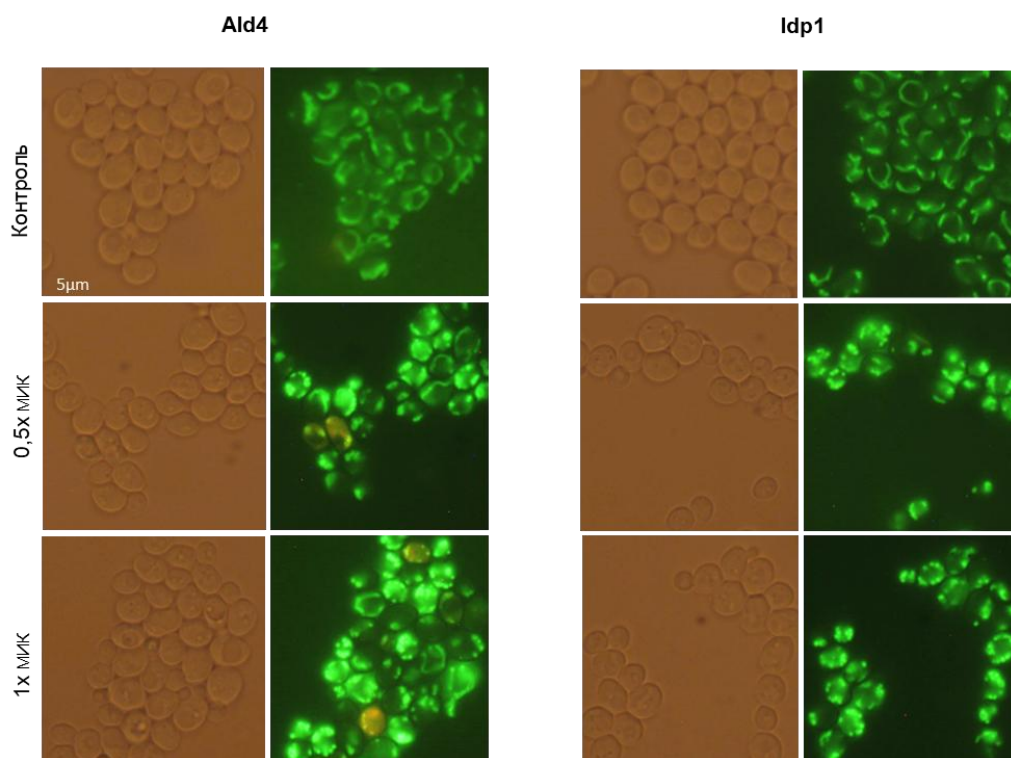


Рисунок 13 – Изменение морфологии митохондрий под действием микозидина. Флуоресцентная микроскопия в условиях видимого света и флуоресценции GFP дрожжевых клеток с мечеными GFP белками Ald4-GFP и Idp1-GFP, обработанных микозидином.

2. мониторинг количества GFP-меченого гистона Htb2 для быстрой детекции влияния антимикотиков на клеточный цикл дрожжей

Для того, чтобы проверить, могут ли гистоны, помеченные GFP, предоставлять информацию, аналогичную измерениям содержания ДНК, сначала определили, какие гистоны лучше подходят для отслеживания содержания ДНК в дрожжевых клетках. Для этого использовались штаммы *S. cerevisiae* из систематической коллекции штаммов с GFP-мечеными белками. Методом проточной цитометрии были исследованы (на стадии экспоненциально растущей культуры) штаммы, продуцирующие 10 различных меченых гистонов. В случае гистонов Hhf1, Hho1, Hta2, Htb1, Htb2 и Htz1 флуоресценция GFP значительно превышала аутофлуоресценцию, однако только в случаях Hta2 и Htb2 наблюдались выраженные бимодальные распределения интенсивности флуоресценции, как и распределения содержания ДНК, что указывало на соответствие количества гистонов в клетках содержанию в них ДНК.

На основе этих наблюдений Htb2-GFP был выбран для последующих экспериментов, поскольку этот меченый белок чаще всего использовали в литературе для визуализации ядра в живых клетках. Для изучения механизма действия различных антимикотиков дрожжевые клетки *S. cerevisiae* BY4741, в которых белок Htb2 был помечен GFP, в течение 6 часов обрабатывали различными противогрибковыми веществами (Флуконазол, Вориконазол, 2 меркаптопиримидин-N-оксид (MP), 11326083, микозидин, 3-бензоильное производное микозидина (3В-Мус),

туникамицин, 5-фторцитозин (5-FC), SDS и SOV4) в концентрациях равных МИК и МИК/2. Затем клетки окрашивали йодидом пропидия (PI) и измеряли флуоресценцию с помощью проточной цитометрии. Как показано, соединения азолов не изменяли распределение количества гистонов (рисунок 14А), в то время как триазолидины (микозидин и 3В-Мус) и соединения ионофоров меди (MP, 11326083) вызвали арест клеток с количеством гистонов, соответствующим фазе 1С. Туникамицин и 5-FC вызвали накопление в популяции клеток в фазе 2С. SDS, по-видимому, вызывает задержку развития клеток в S-фазе при более низких концентрациях и заставляет клетки останавливаться в фазе 2С при концентрации равной МИК. SOV4 приводил к тому, что большинство живых клеток демонстрировали обилие гистонов, соответствующих фазе 1С. Интересно, что, поскольку SDS, и SOV4 вызывали значительную гибель клеток, наблюдали пик клеток, окрашенных йодидом пропидия (PI), перед 1С (рисунок 14Б).

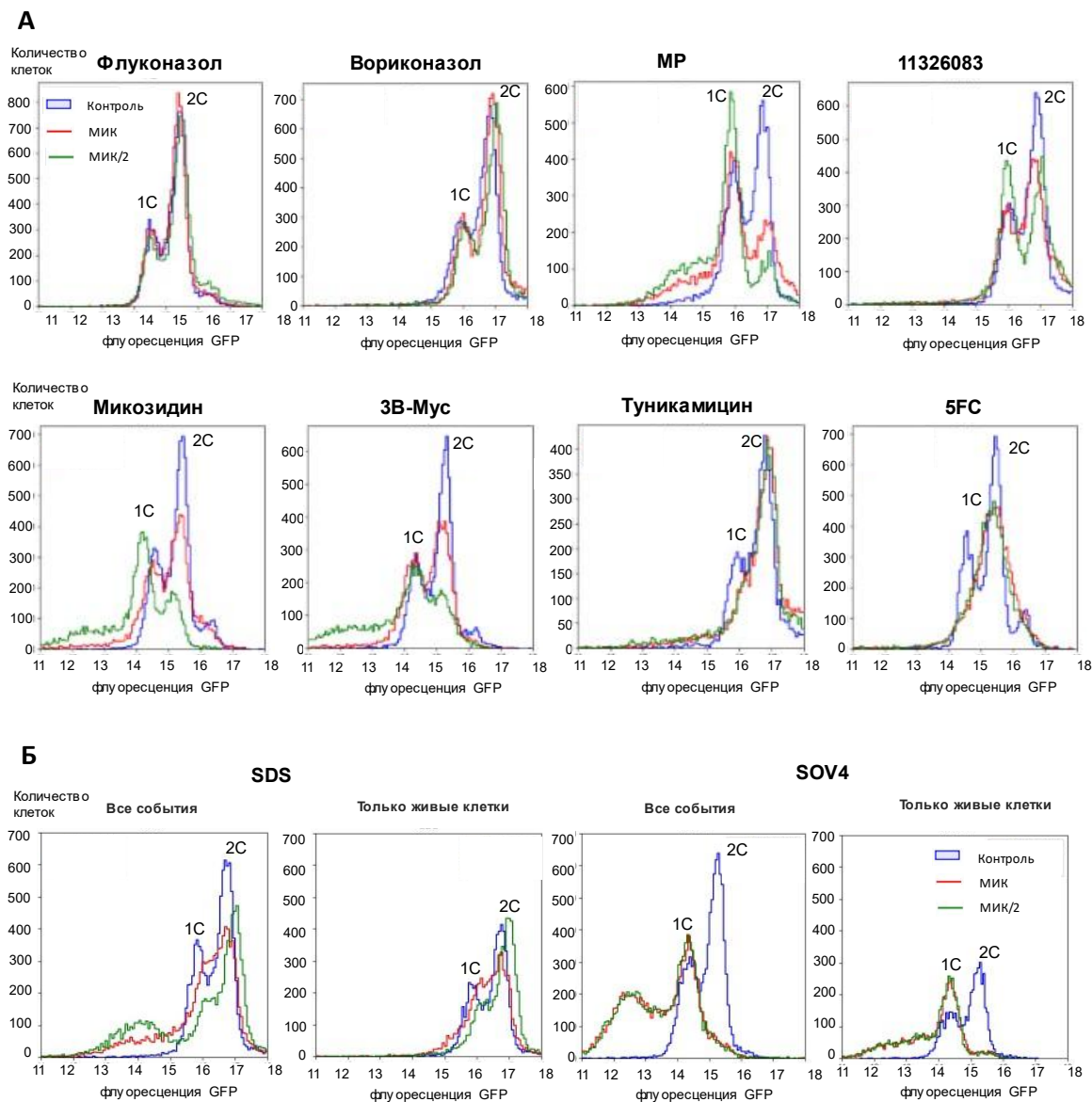


Рисунок 14 – Количественная оценка содержания гистонов с использованием Htb2-GFP демонстрирует влияние противогрибковых соединений на клеточный цикл. (А) Цитометрические данные об изменениях флуоресценции Htb2-GFP в PI-отрицательных клетках; (Б) цитометрические данные об изменениях флуоресценции Htb2-GFP в PI-отрицательных клетках (отмечено - только живые клетки) и во всех клетках (отмечено - все события).

3. изучение противогрибковой активности новых и традиционных полиеновых препаратов

Коллеги из Института новых антибиотиков им. Гаузе разработали новую серию полиенов путем амидирования карбоновой группы. Это простая модификация, которая может улучшать растворимость препарата, в т.ч. и полиенов. Цель исследования состояла в том, чтобы оценить повышенную растворимость в воде этих вновь синтезированных амидных производных полиенов и изучить их противогрибковые свойства против мутантов дрожжей *S.cerevisiae*, которые несут целевые делеции генов в пути биосинтеза эргостерола. Кроме того, стремились исследовать фунгицидное и фунгистатическое действие натамицина и его недавно синтезированных производных на дрожжевые клетки.

Максимальные значения растворимости рассчитывали измеряя концентрацию вещества в надосадочной жидкости насыщенных растворов. Как показано в таблице 2, все вновь синтезированные производные продемонстрировали значительно улучшенную растворимость по сравнению с исходными соединениями.

Таблица 2 - Растворимость амидов полиенов.

Полиеновые противогрибковые препараты	Максимальные значения растворимости воде(г/л)	Вновь синтезированные производные	Максимальные значения растворимости воде(г/л)
Натамицин	0,06	LCTA 3115	>100
		LCTA3282	0.9
Нистатин	0,36	LCTA 3317	100
		LCTA 3255	100
		LCTA 3285	100
Амфотерицин	0,75	LCTA 3114	100
		LCTA 3315	20
		LCTA 3283	3

В литературе описано, что несколько мутаций в пути синтеза эргостерола индуцируют как резистентность, так и чувствительность к полиеновым противогрибковым агентам. Было решено исследовать, могут ли новые производные быть более эффективными против резистентных мутантов дрожжей *S. cerevisiae*, содержащих специфические делеции генов на последних этапах пути биосинтеза эргостерола. Чувствительность к препарату анализировали у пяти мутантов с делециями генов ERG ($\Delta erg6$, $\Delta erg2$, $\Delta erg3$, $\Delta erg5$ и $\Delta erg4$) на фоне мутанта дикого типа BY4742. в таблице 3, показали, что мутанты *erg3* Δ и *erg6* Δ наибольшую устойчивость к полиенам и их производным, в то время как мутанты *erg4* Δ проявляли повышенную чувствительность.

Таблица 3 - Соотношение МИК мутанта и МИК штамма дикого типа изучаемых антимикотиков при воздействии на штаммы с мутациями в пути синтеза эргостерола.

Протестированные штаммы*	Амфотерицин	LCTA 3114	LCTA 3283	LCTA 3315	Нистатин	LCTA 3255	LCTA 3285	LCTA 3317	Натамицин	LCTA 3115
<i>Δerg6</i>	3	4	4	7,3	14	6	8	7	2	1
<i>Δerg2</i>	1	0,7	1,3	1,7	1	0,8	0,8	1,6	1	0,6
<i>Δerg3</i>	0,8	0,8	2	2,7	3,5	4	4,5	3,5	2	2
<i>Δerg5</i>	0,8	0,8	1	0,7	2	1	2	1,8	1	0,6
<i>Δerg4</i>	0,4	0,8	0,8	0,6	0,9	0,2	1	0,6	0,6	0,6

*Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз. В таблице приведено среднее значение. Красный цвет обозначает повышенную резистентность, зеленый - повышенную восприимчивость.

Чтобы дополнительно охарактеризовать различия между натамицином и его производными, клетки *S. cerevisiae* BY4741 подвергали воздействию натамицином, LCTA3115 и LCTA3282 в течение заданной продолжительности времени (1 час, 4 часа и 24 часа) как в водном растворе, так и в жидкой среде YPD. Последнее было сделано для сравнения влияния соединений на делящиеся и неделящиеся клетки. Затем дрожжевые клетки были нанесены на твердую питательную среду YPD для полуколичественной оценки количества выживших клеток после обработки различными химическими веществами. Полученные данные показали, что в условиях использования водного раствора натамицин практически не обладает фунгицидным действием даже при высоких концентрациях, а производные натамицина LCTA3115 и LCTA3282 обладают фунгицидным действием (рисунок 15А). Примечательно, что для LCTA3282 этот эффект был гораздо сильнее. Интересно, что, когда дрожжевые клетки были обработаны тестируемыми соединениями в жидкой среде YPD вместо воды (рисунок 15Б), проявилась заметная и необычная тенденция. После 4 часов инкубации с антимикотиками при концентрации равной 1х МИК как натамицин, так и его производное LCTA3115 вызывали уменьшение количества колоний, хотя этот эффект не наблюдался при более высоких концентрациях. Аналогичным образом, после 24 часов инкубации натамицин продемонстрировал уменьшение количества колоний при его концентрациях равных 1х МИК и 2х МИК, но не при более высоких концентрациях, в то время как LCTA3115 продемонстрировал уменьшение количества колоний при концентрациях равных 2х МИК и 4х МИК. Примечательно, что производное натамицина LCTA3282 показало фунгицидный эффект уже после 1 часа инкубации с дрожжевыми клетками при концентрации равной 8-кратной МИК. Эти данные указывали на то, что гибель клеток под действием натамицина и его производного может зависеть от того, происходит или нет клеточное деление.

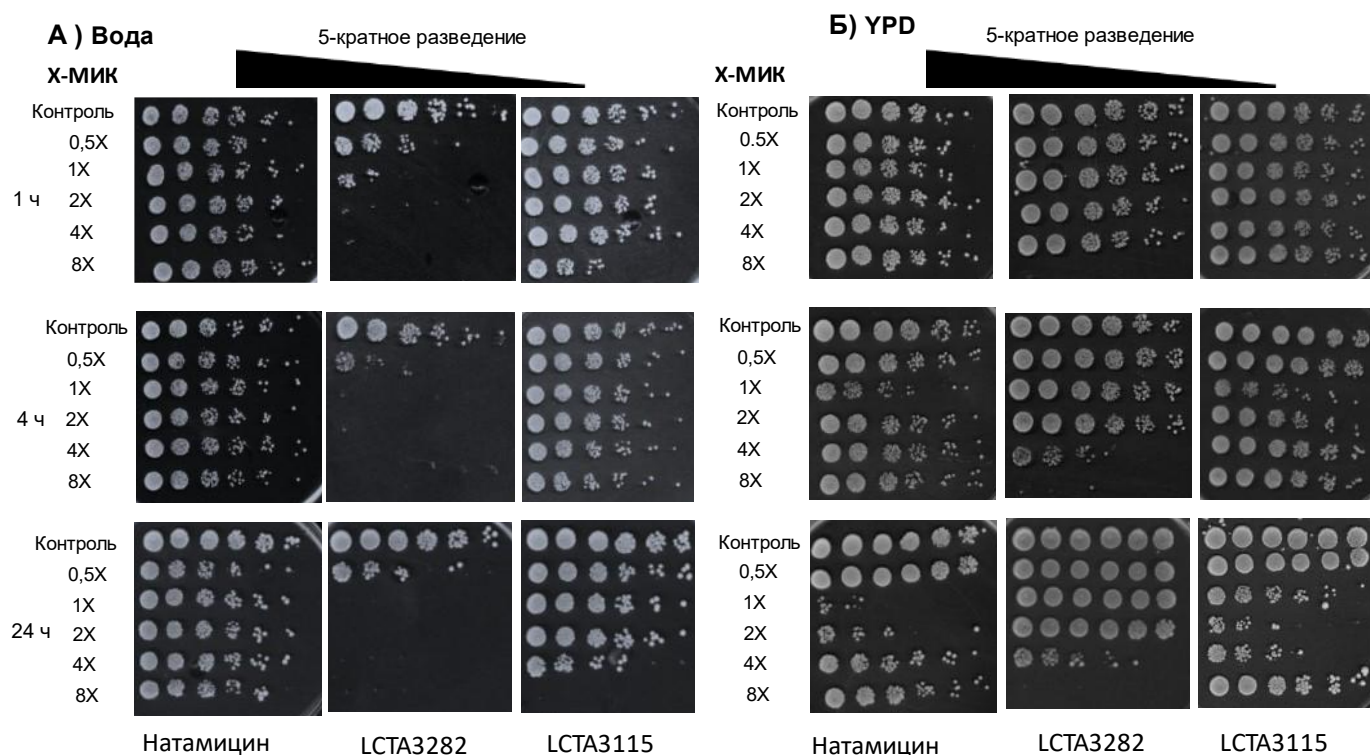


Рисунок 15 - Натамицин и его производное LCTA3115 не имеют сильного фунгицидного эффекта при обработке в воде, и имеют необычный фунгицидный эффект при концентрации близкой к МИК. Клетки подвергали обработке этими соединениями в течение определенного периода времени в А) водном растворе Б) в растворе YPD, а затем наносили на твердую питательную среду YPD для полуколичественной оценки количества выживших колоний (колоний образующих единиц - КОЕ).

ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция штаммов, *S. cerevisiae*, продуцирующих белки, конъюгированные с GFP. Коллекция штаммов стала основой нового метода - SCRAPPY (Single Cell Rapid Assay of Proteome Perturbation in Yeast), позволяющего определить изменения протеома на уровне отдельных дрожжевых клеток. Метод SCRAPPY позволяет анализировать изменения в количестве конъюгированных с GFP белков клеток *S. cerevisiae*, под воздействием различных антимикотиков.
2. Разработан новый метод анализ клеточного цикла клеток *S. cerevisiae* при мониторинге флуоресцентного сигнала GFP слитого с гистоном Htb2. Этот подход расширяет возможности выявления нарушений клеточного цикла при воздействии антимикотиков.
3. Исследованные алкилированные нуклеозиды вызывают увеличение уровня белков связанных с метаболизмом аминокислот, а также окислительный стресс.
4. Микозидин, 3,5-замещенное производное тиазолидин-2,4-диона, вызывает специфическое повышение уровня транспортера глюкозы Hxt3. Делеция гена, кодирующего этот транспортер, повышает чувствительность клеток к микозидину. Показана важная роль Hxt3 в защите клеток от последствий воздействия на них микозидина.
5. Ответ клеток на новое гибридное соединение L173, состоящее из азольной и тиазолидиновой части, сходен с ответом на азольные, но не тиазолидиновые антимикотики (микозидин), что указывает на то, что активной является только его азольная часть.
6. Исследованные в работе новые амиды полиенов различаются по действию на разные мутанты с нарушением пути биосинтеза эргостерола, что может быть обусловлено разным сродством к определенным предшественникам эргостерола.
7. Гибель клеток под действием натамицина и его производного LCTA3115 происходит только при концентрации, близкой к МИК. Это означает, что в высоких концентрациях натамицин обладает фунгистатическим действием, а его фунгицидный эффект проявляется при более низких концентрациях, когда клетки способны делиться.

АННОТАЦИЯ

Грибковые инфекции ежегодно приводят к смерти до 1,5 миллионов человек, однако разнообразие противогрибковых препаратов ограничено, а устойчивость к существующим средствам представляет серьёзную проблему. В данном исследовании была разработана быстрая методика для анализа реакции грибковых клеток на противогрибковые агенты с использованием генетически модифицированных штаммов дрожжей. Путем маркировки 64 белков дрожжей зелёным флуоресцентным белком (GFP) и отслеживания изменений с помощью проточной цитометрии, для различных противогрибковых веществ были выявлены различные профили воздействия. Этот метод позволил получить новые данные о механизмах действия ряда соединений, включая алкилированные нуклеозиды и тиазолидиновые противогрибковые средства, а также провести сравнительный анализ классических и новых препаратов. Дальнейшие исследования показали, как эти соединения влияют на клеточный цикл, причем разные вещества вызвали различные паттерны остановки клеточного деления. В частности, было отмечено, что медные ионофоры вызывают остановку клеточного цикла с уникальным распределением гистонов, что является первым подобным открытием. Кроме того, в исследовании были рассмотрены классические полиеновые противогрибковые средства и их производные, выявившие различия в устойчивости среди мутантов дрожжей. Важными открытиями стали повышенная устойчивость к полиеновым производным у мутантов с удалённым геном *ERG6* и уникальная фунгицидная активность натамицина и его производных при концентрациях, близких к МИК, что ранее не описывалось для полиенов.

ANNOTATION

Fungal infections result in up to 1.5 million deaths annually, yet the diversity of antifungal drugs is limited, with resistance to existing treatments posing a significant challenge. This study developed a rapid approach to analyze fungal responses to antifungal agents using genetically modified yeast strains. By tagging 64 yeast proteins with green fluorescent protein (GFP) and monitoring changes with flow cytometry, distinct impact profiles were identified for different antifungal substances. This method provided new insights into the mechanisms of action of various compounds, including alkylated nucleosides and thiazolidine antifungals, and enabled comparative analysis of classical and new drugs. Further investigation revealed how these compounds affect the cell cycle, with different substances causing distinct patterns of cell arrest. Notably, copper ionophores were observed to cause cell arrest with unique histone distribution, marking a first in such findings. Additionally, the study examined classical polyene antifungals and their derivatives, uncovering varying resistance patterns in yeast mutants. Significant findings included the increased resistance to polyene derivatives in mutants lacking the *ERG6* gene and a unique fungicidal activity of natamycin and its derivatives at concentrations close to MIC, which was previously undescribed for polyenes.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах международного цитирования Scopus и WOS:

1. Grosfeld, E. V., Bidiuk, V. A., Mitkevich, O. V., **Ghazy, E. S.**, Kushnirov, V. V., & Alexandrov, A. I. (2021). A systematic survey of characteristic features of yeast cell death triggered by external factors. *Journal of Fungi*, 7(11), 886. (Q1, IF 4,2).
2. Levshin, I. B., Simonov, A. Y., Lavrenov, S. N., Panov, A. A., Grammatikova, N. E., Alexandrov, A. A., **Ghazy, E. S.**, Savin, N. A., Gorelkin, P. V., & Erofeev, A. S. (2022). Antifungal thiazolidines: Synthesis and biological evaluation of mycosidine congeners. *Pharmaceuticals*, 15(5), 563. (Q1, IF 4,9).
3. Tevyashova, A. N., Efimova, S. S., Alexandrov, A. I., **Ghazy, E. S.**, Bychkova, E. N., Solovieva, S. E., Zatonksy, G. B., Grammatikova, N. E., Dezhenkova, L. G., & Pereverzeva, E. R. (2022). Semisynthetic Amides of Polyene Antibiotic Natamycin. *ACS Infectious Diseases*, 9(1), 42-55. (Q1, IF 4,0).
4. Tevyashova, A., Efimova, S., Alexandrov, A., Omelchuk, O., **Ghazy, E. S.**, Bychkova, E., Zatonksy, G., Grammatikova, N., Dezhenkova, L., & Solovieva, S. (2023). Semisynthetic amides of amphotericin B and nystatin A1: A comparative study of in vitro activity/toxicity ratio in relation to selectivity to ergosterol membranes. *Antibiotics*, 12(1), 151. (Q1, IF 4,3).
5. Kulakova, M. V., **Ghazy, E. S.**, Ryabov, F., Stanishevskiy, Y. M., Agaphonov, M. O., & Alexandrov, A. I. (2023). Histone Abundance Quantification via Flow Cytometry of Htb2-GFP Allows Easy Monitoring of Cell Cycle Perturbations in Living Yeast Cells, Comparable to Standard DNA Staining. *Journal of Fungi*, 9(10), 1033. (Q1, IF 4,2).
6. Levshin, I. B., Simonov, A. Y., Panov, A. A., Grammatikova, N. E., Alexandrov, A. I., **Ghazy, E.S** & Polshakov, V. I. (2024). Synthesis and Biological Evaluation of a Series of New Hybrid Amide Derivatives of Triazole and Thiazolidine-2, 4-dione. *Pharmaceuticals*, 17(6), 723. (Q1, IF 4,9).

Тезисы конференций

7. **Орейф Эслам Шаабан Мохамед Гази**, Эльманахлы Мохаммед Эмам, Ризк Марко Джордж. Применение Нанотехнологий Для Противодействия Резистентности К Противомикробным Препаратам. Юбилейная V научно-практическая конференция «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Россия, г. Москва, 18 декабря 2020). Материалы С 66-72
8. **Гhazi Орейф Эслам Ш.**, Станишевский Я.М., Макаров В. А., Александров А. И. Анализ противогрибковой активности новых оригинальных веществ в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* для дальнейшего применения методов массового скрининга мутантов и анализа

- протеомных изменений. 3-й российский микробиологический конгресс. (Россия, г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г). Материалы конгресса С 167.
9. Alexander I. Alexandrov, **Eslam S.M.O. Ghazy**, Victoria A. Bidiuk, Fedor D. Ryabov, Olga V. Mitkevich, Olga B. Riabova, Yaroslav M. Stanishevskiy, Michael O. Agaphonov, et al. SCRAPPY – a single cell rapid assay of proteome perturbation in yeast for identifying the mode of action of novel antifungal molecules. симпозиум Института Вестердайка по грибковой эволюции в Академии искусств и наук Королевства Нидерландов (Нидерланды, г. Амстердам, 17–18 апреля 2023). Сборник трудов С20.
 10. **Гhazi Э.Ш.**, Ураков В.Н. молекулярный инструмент для замены GFP на mScarlet в систематической GFP-коллекции дрожжей. Международный форум природоподобных технологий (КурчатовГенТех-2023). (Россия, г. Москва, 17 – 20 октября 2023 г).Сборник трудов С 30-31.
 11. **Oreif Eslam Sh.M.G.**, Stanishevskiy Y.M., Bourakba S. Antifungal drugs; mechanism of action and resistance and new strategies in the discovery of new antifungals. XI Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Россия, г. Москва, 30 ноября - 1 декабря 2023). Сборник трудов С 387-390
 12. Bourakba S. **Oreif Eslam Sh.M.G.** Natural medicinal plants and their antifungal effect. XI Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Россия, г. Москва, 30 ноября - 1 декабря 2023). Сборник трудов С 352-355.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- **ДНК**- дезоксирибонуклеиновая кислота
- **МИК**-минимальная ингибирующая концентрация
- **КОЕ**-колониеобразующая единица
- **YPD**-от англ. yeast extract peptone dextrose — дрожжевой экстракт пептон декстроза
- **GFP**-от англ. green fluorescent protein- Зелёный флуоресцентный белок
- **УФ**- Ультрафиолетовое излучение