



ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ Професионално
направление 4.3. Биологични науки (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

Специални благодарности

*Изключително признателна съм на целия колектив от катедра „Обща и промишлена микробиология“ за проявеното търпение, разбиране и помощта при изготвянето на настоящия дисертационен труд, както и за придобитите научни знания и опит през всички години на обучение!
Искам да благодаря на всеки поотделно, но по-специално на хората, които 6 години са неотлъчно до мен:*

Моят научен ръководител доц. д-р Венцислава Петрова - една енциклопедия от знания, от която научих толкова много. Без нея нямаше да се справя.

Доц. д-р Анна Томова - именно тя разгърна моя потенциал и ме накара да повярвам, че мога да преодолея всяка трудност.

На гл. ас. д-р Емилия Писарева благодаря за съдействието, съветите и ценния опит, който ми даде през годините.

Технически сътрудник Величка Бачорова - човекът, който винаги е бил неотлъчно до мен, дал ми е толкова много, научи ме на труд и дисциплина.

На моето семейство за подкрепата и вярата през всичките тези години!

Не на последно място, изключително признателна съм на катедра „Обща и приложна хидробиология“, по-специално на гл. ас. д-р Михаела Белухова за съдействието, прекрасното отношение и прекараното време пред микроскопа.

БЛАГОДАРЯ!

Без вас определено нямаше да се справя!

В памет на леля и дядо! Хората, които и за секунда не спряха да вярват в мен!

Съдържание

I. Списък с използваните съкращения.....	11
II. Увод	13
III. Литературен обзор	15
1. Дрождите като моделен организъм	15
2. Клетъчен цикъл при дрожди	16
2.1. Фази на клетъчния цикъл	18
2.2. G ₀ състояние при дрожди	22
3. Дрождите във фармакологичните изследвания.....	25
4. Механизъм на токсично действие на лекарствените препарати	27
4.1. Рецептор – зависимо лекарствено действие	28
4.2. Рецептор-независимо лекарствено действие	28
4.2.1. Химично реактивни агенти	29
4.2.2. Физично активни агенти.....	29
4.3. Генотоксични агенти.....	30
4.4. Агенти, осъществяващи нековалентно свързване.....	30
4.4.1. Промяна на ензимната активност	30
4.4.2. Свързване с нуклеинови киселини	30
4.4.3. Свободно-радикални реакции.....	31
4.5. Водороден пероксид – механизъм на действие.....	31
4.6. Механизъм на действие на ибупрофен	32
4.7. Механизъм на действие на менадион.....	34
4.8. Механизъм на действие на зеоцин	35
5. Влияние на физичните параметри върху преживяемостта на дрождевите клетки 37	
5.1. Влияние на температурата	38
5.2. Влияние на рН	39
5.3. Влияние на осмотичното налягане.....	41
5.4. Влияние на UV – лъчи	43
5.5. Влияние на гравитационна сила	45
5.6. Влияние на механичната сила	45
5.7. Влияние на ултразвук	47
6. Стресов отговор при дрождите <i>S. cerevisiae</i>	49
7. Биоинформатични подходи за изучаване състоянието на покой при дрождите <i>S. cerevisiae</i>	52

7.1.	Биоинформатика и системна биология	52
7.2.	Проектиране и развитие на биологична база данни	54
7.3.	Геномен анализ и изследване ролята на гени, отговорни за стресовия отговор и навлизане в G ₀ състояние.....	54
7.4.	Вътреклетъчна локализация на белтъци	56
7.5.	Анализ на генна експресия.....	57
8.	Заклучение	60
IV.	Цел и задачи.....	61
V.	Материали и методи.....	62
V.I.	Материали.....	62
1.	Микроорганизми	62
2.	Хранителни среди.....	62
V.II.	Методи	62
1.	Култивиране на щам <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741.....	62
1.1.	Поддържане на щама	62
1.2.	Изготвяне на посевен материал	62
2.	Микроскопско описание.....	63
3.	Събиране на биомаса.....	63
4.	Изолиране на различни дрождеви клетъчни популации в перколен плътностен градиент.....	63
5.	Дезинтегриране на дрождеви клетки и получаване на безклетъчен екстракт.....	63
6.	Изолиране на митохондриална фракция	64
7.	Изследване на въздействието на различни токсични агенти върху жизнеспособност на дрождеви пролифериращи, Q и NQ	64
7.1.	Определяне на LD ₅₀ на използваните токсични агенти.....	64
7.2.	Определяне клетъчната жизнеспособност на дрождеви пролифериращи, Q и NQ клетки след въздействие с токсични агенти	65
8.	Влияние на физични фактори върху преживяемостта на пролифериращи, Q и NQ клетки.....	65
8.1.	Оценка влиянието на температурен стрес	65
8.2.	Оценка влиянието на алкален и киселинен стрес	65
8.3.	Оценка въздействието на хиперосмотичен стрес	66
8.4.	Оценка въздействието на хипоосмотичен стрес	66
8.5.	Оценка въздействието на УВ-лъчение.....	66
8.6.	Оценка въздействието на гравитационната сила	67
8.7.	Оценка въздействието на механична сила	67
8.8.	Оценка въздействието на ултразвук.....	67

9. Биохимични анализи	67
9.1. Определяне на концентрацията на белтък по метода на Lowry et al., (1951).....	67
9.2. Определяне на карбонилни групи в белтъците по метод на Mesquita et al., (2014).....	68
9.3. Определяне концентрацията на ROS в клетката чрез NBT метод	70
9.4. Определяне концентрацията на вътреклетъчен редуциран и окислен глутатион по метода на Tietze (1969) и модифициран от Zhang (2000).....	71
9.5. Прекисно окисление на липиди по метода на Hodges et al., (1999).	72
10. Определяне генотоксичен ефект на зеоцин и менадион.....	73
11. Флуоресцентна микроскопия	74
11.1. Анализ на степента на фрагментация на митохондриална ДНК.....	74
11.2. Анализ на нивото на ROS в дрождевите митохондрии.....	74
12. Биоинформатични методи	74
12.1. Секвенционен подбор	74
12.2. Сравняване на множество секвенции чрез ClustalW	75
12.3. Вътреклетъчна локализация на изследваните ензими при щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741.	75
13. Статистически анализ на данните.....	77
V. Резултати и обсъждане	78
1. Динамика на растеж и клетъчна диференциация при дрожди <i>S. cerevisiae</i>	78
2. Дрождите като моделна система за оценка на въздействия от околната среда	82
2.1. Оценка на токсикологичното въздействие на химични агенти	82
2.1.1. Преживяемост.....	82
2.1.2. Цитотоксичност.....	88
2.1.2.1. Водороден пероксид (H ₂ O ₂).....	88
Количество ROS	88
Нива на окислени белтъци	89
Нива на окислени липиди.....	91
Нива на тотален глутатион	93
2.1.2.2. Менадион.....	94
Количество ROS	94
Нива на окислени белтъци	96
Нива на окислени липиди.....	97
Нива на тотален глутатион	98
2.1.2.3. Ибупрофен.....	100
Количество ROS	101

Окислени белтъци	102
Окислени липиди.....	104
Тотален глутатион.....	104
2.1.2.4. Зеоцин	105
Количество ROS	106
Окислени белтъци	107
Окислени липиди.....	108
Количество глутатион.....	109
2.1.3. Генотоксичност	116
2.1.3.1. Двойноверижни разриви в ДНК след третиране със зеоцин.....	116
2.1.3.2. Двойноверижни разриви в ДНК след третиране с менадион.....	119
2.2. Оценка на въздействието на различни физични фактори върху растежа на Log, Q и NQ дрождеви популации	120
2.2.1. Ефект на температурата върху преживяемостта на дрождевите клетки <i>S. cerevisiae</i> BY4741	121
2.2.2. Влияние на рН върху преживяемостта на дрождевите клетки <i>S. cerevisiae</i> BY4741	123
2.2.3. Влияние на осмотичен стрес върху преживяемостта на дрождевите клетки от щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741	126
2.2.3.1. Влияние на хипоосмотичен стрес	126
2.2.3.2. Влияние на хиперосмотичен стрес	127
2.2.4. Влияние на UV лъчи върху преживяемостта на дрождеви клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741	135
2.2.5. Ефект на гравитационната сила върху преживяемостта дрождеви клетки <i>S. cerevisiae</i> BY4741	137
2.2.6. Влияние на механична сила върху преживяемостта на дрождеви клетки <i>S. cerevisiae</i> BY4741	139
2.2.7. Ефект на ултразвука върху пролифериращи, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741	141
3. <i>In silico</i> анализ на гени от сигнални пътища, регулиращи навлизането в състояние на покой и отговора при стрес.....	143
3.1. TOR протеин киназа	145
3.2. Протеин киназа А (РКА).....	151
3.3. Протеин киназа С	154
3.4. Snf1p протеин киназа.....	161
VI. ИЗВОДИ.....	169
VII. ПРИНОСИ	171
VIII. Използвана литература	173

IX.	Публикации.....	228
X.	Участия в научни форуми	228
XI.	Участия в проекти	229

Списък на фигури

Фигура 1: Стационарна фаза при дрожди.....	18
Фигура 2: Клетъчен цикъл при дрожди <i>S. cerevisiae</i>	20
Фигура 3: G1 регулация при дрожди.....	21
Фигура 4: Жизнен цикъл при дрожди	22
Фигура 5: Обобщение на известните сигнални пътища, за които се смята, че контролират навлизането в състояние на покой.	24
Фигура 6: Реакция на Фентън и Хабер-Вайс.	32
Фигура 7: Структурна формула на ибупрофен	33
Фигура 8: Структурна формула на менадион.....	34
Фигура 9: Механизъм на действие на блеомицините	36
Фигура 10: Разделяне на микроорганизмите спрямо отношението им към рН (.....	41
Фигура 11: Хипоосмотичен и хиперосмотичен стрес	43
Фигура 12: UV-индуцирани повреди в ДНК, причинени от UV-A и UV-B лъчи.....	45
Фигура 13: Механизъм на въздействие с ултразвук.	48
Фигура 14: Схематично представяне на принципа на действие на метода при определяне на карбонилни групи в белтъците	69
Фигура 15: Динамика на растеж и усвояване на въглероден източник при периодично култивиране на хаплоиден щам <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	79
Фигура 16: Клетъчна диференциация и апоптоза при хаплоиден щам <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	81
Фигура 17: 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.....	83
Фигура 18: Преживяемост на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с химични агенти.....	84
Фигура 19. Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 5mM H_2O_2	89
Фигура 20: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741, след третиране с 5mM H_2O_2	91
Фигура 21: Нива на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 5mM H_2O_2	92
Фигура 22: Количество общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 5mM H_2O_2	94
Фигура 23: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране със 100μM менадион.....	96
Фигура 24: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране със 100μM менадион.....	97
Фигура 25: Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране със 100μM менадион	98
Фигура 26: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране със 100μM менадион	100
Фигура 27: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен.....	102
Фигура 28: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен.....	103
Фигура 29: Количество окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен.....	104
Фигура 30: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен	105

Фигура 31: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 50 µg/ml зеоцин.....	107
Фигура 32: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 50µg/ml зеоцин	108
Фигура 33: Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 50 µg/ml зеоцин	109
Фигура 34: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 50 µg/ml зеоцин	110
Фигура 35: Преживяемост при Log и Q клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с различни концентрации зеоцин	111
Фигура 36: Преживяемост при Log и Q клетки на щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741 след третиране с 50µg/ml зеоцин за различно време.....	112
Фигура 37: DAPI флуоресцентен анализ на митохондриална ДНК при Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741, третирани с 50 µg/ml зеоцин	113
Фигура 38: Определяне нивата на генерирани ROS след третиране на митохондриални фракции на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741 с 50 µg/ml зеоцин спрямо интензитета на флуоресценция след оцветяване с Rhodamine 123	115
Фигура 39: Спонтанни нива на DSBs в зависимост от растежната фаза при щам <i>S. cerevisiae</i> BY4741	116
Фигура 40: Индуциране на DSBs в <i>S. cerevisiae</i> BY4741, в зависимост от растежната фаза след третиране със зеоцин в концентрации 100-300µg/ml.	117
Фигура 41: Индуциране на DSBs чрез различни концентрации на менадион (50-150µM).	120
Фигура 42: Влияние на температурата върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	122
Фигура 43: Влияние на pH върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	124
Фигура 44: Влияние на хипоосмотичните условия на средата върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	126
Фигура 45: Влияние на 0.4 и 0.7M NaCl върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	129
Фигура 46: Влияние на различни концентрации на захароза върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	132
Фигура 47: Влияние на различни концентрации глицерол върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	134
Фигура 48: Ефект на UV - лъчи върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	135
Фигура 49: Влияние на гравитационната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	138
Фигура 50: Влияние на механичната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	140
Фигура 51: Влияние на ултразвука върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на <i>S. cerevisiae</i> BY4741	142
Фигура 52: Сравняване на секвенциите, извършено чрез ClustalW	146
Фигура 53: Матрица за процент идентичност, генерирана от ClustalW	146
Фигура 54: Матрица за процент идентичност, генерирана от ClustalW	150
Фигура 55: Сравняване на протеинови секвенциите протеин киназа A при <i>S. cerevisiae</i> и човек	153
Фигура 56: Матрица за процент идентичност, генерирана от ClustalW	153
Фигура 57: Сравнителен анализ на секвенции на протеин киназа C при <i>S. cerevisiae</i> и човек	156

Фигура 58: Матрица за процент идентичност между човешките и дрождевата протеин киназа С, генерирана от ClustalW	156
Фигура 59: Сравняване на секвенциите на Snf1p протеин киназа при <i>S. cerevisiae</i> с АМРК при човек.	162
Фигура 60: Матрица за идентичност между изследваните Snf1p и АМРК.....	162
Фигура 61: Функционални профили на стресов отговор при Log, Q и NQ клетъчни популации на <i>S. cerevisiae</i> BY4741. Представените данни изобразяват в % изменението на изследваните показатели спрямо нетретирани контролни култури.....	167

Списък на таблици

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..	117
Таблица 2: . Изследване на вътреклетъчната локализация на протеините, участващи в TOR протеин киназата	148
Таблица 3: Изследване на вътреклетъчната локализация на протеините, участващи в протеин киназа А (РКА) метаболитния път	154
Таблица 4: Изследване на вътреклетъчната локализация на протеините, участващи в протеин киназа С (РКС) метаболитния път	158
Таблица 5: Изследване на вътреклетъчната локализация на протеините, участващи в Snf1p протеин киназния път.....	164

I. Списък с използваните съкращения

1. Използвани съкращения на кирилица:

АСД – агаризирана среда за дрожди

АТФ – аденозин трифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

ЕПР – ендоплазматичен ретикулум

КФБ – Калиево-фосфатен буфер

МДА – Малоналдеhid

НАД(Н) – Никотинамид аденин динуклеотид

НАД(Ф)Н - Никотинамид аденин динуклеотид фосфат

ТХО – Трихлороцетна киселина

2. Използвани съкращения на латиница:

cAMP – цикличен аденозин монофосфат

CER - общ стресов отговор към средата

CLS – хронологична продължителност на живот

COX – циклооксигеназа

CFU – колонии образуващи единици

DNPH – 2,4- динитрофенилхидразин

DSBs – двойноверижни разриви в ДНК

DTNB –5,5'-дитиобис-(2-нитробензоена киселина)

ESR – външни фактори на средата

FDR – отделени ДНК фрагменти

HOG - високоосмоларен глицерол

Hsp - шаперони

GR – глутатион редуктаза

GSH –глутатион

GSSG – глутатион дисулфид

MAPKs – каскада от протеин кинази

MnSOD - манганова супероксид дисмутаза

NBT – нитроблу тетразолиум

NER – нуклеотидна ексцизионна репарация

NLS – сигнал за ядрена локализация

NSAIDs - нестероидните противовъзпалителни средства

OD – оптическа плътност

PBS – фосфатен солеви буфер

PCD - програмирана клетъчна смърт

PKA – протеин киназа

PKC – протеин киназа C

PTSs - пероксизомално-матрични насочващи последователности

RLS - репликативен жизнен цикъл

ROS – реактивни кислородни видове

RTG - митохондриална ретроградна сигнализация

SGD – база данни за дрожди

SOD - супероксид дисмутаза

TBA – тиобарбитурова киселина

TNB – 5-тио -2-нитробензоена киселина

Tor – протеин киназа

II. 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). Ето защо, използването им при изучаването на клетъчния отговор към различни вредни въздействия като токсични метаболити, лекарствени вещества, ксенобиотици и други замърсители, е от първостепенно значение както в сектори като здравеопазване и околна среда, така и в редица биотехнологични производства. 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.

През последните няколко десетилетия интересът към дрождите като модел за *in vivo* изследване на цитотоксичния и генотоксичния ефект на редица химични съединения и лекарства е силно засилен. С уникалните си генетични характеристики и висока степен на консервативност с висшите еукариотни организми, *S. cerevisiae* представляват подходяща система за изследване механизмите на химична токсичност. 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 G_0 , където такива метаболитни флуктуации са силно намалени и наподобяват клетки на бозайници, е предимство. Това позволява предсказване потенциалното действие 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 допринесат за идентифициране на клетъчните компоненти и пътища, които участват и играят ключова роля в токсикологичния отговор (Hamadeh et al., 2002; North and Vulpe., 2010).

В този контекст настоящият дисертационен 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 висши 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 G_0 дрождеви култури като система за скрининг и прогнозиране на токсикологичен отговор при висши еукариоти.

III. Литературен обзор

1. Дрождите като моделен организъм

Изборът на моделни организми за осъществяване на разнообразни изследвания е от ключово значение в науката (Altmann et al., 2007; Cogburn et al., 2007; Jonsson., 2007; Beck et al., 2008;; Veldman and Lin., 2008; Jin et al., 2009; Meyer and Vilardell., 2009). Такива организми се използват поради няколко причини: а) могат да помогнат за преодоляване на етични и експериментални ограничения б) осигуряват рамка, върху която да се разработят и оптимизират аналитични методи за стандартизиране и по-добро разбиране на биологичните процеси и в) моделните организми се подбират така, че да имат сходни метаболитни особености с други живи обекти, от които учените се интересуват (Karathia et al., 2011).

Дрождите *S. cerevisiae* са сред най-широко използваните еукариотни моделни организми. Това е първият организъм с изцяло секвениран геном ~12 Mbp, който служи като ценен източник на информация относно нуклеотидната последователност на човешки и други висши еукариотни гени (Goffeau et al., 1996; Schneiter., 2004; Wanichthanarak., 2014).

Тези организми са използвани като модел за изследване на различни процеси като регулиране на генната експресия (Biddick and Young., 2009), сигнална трансдукция (Hohmann et al., 2007), клетъчен цикъл (Nasheuer et al., 2002), метаболизъм (Brocard-Masson and Dumas., 2006; Lopez-Mirabal and Winther., 2008), апоптоза (Owsianowski et al., 2008), невродегенеративни заболявания (Miller-Fleming et al., 2008) и много други. Интересен е фактът, че около 40 % от гените за наследствени заболявания при хората имат хомолози при дрожди (Oliver., 2002). Това показва, че тези микроорганизми имат потенциал да бъдат използвани с фармацевтични и медицински цели, включително като платформа за биосинтеза на протеини и като тест система за разкриване биологичната същност на молекулните механизми (Hou et al., 2012; Munoz et al., 2012) на различни заболявания. Като примери за сложни биологични процеси, изучени в дрожди, могат да се посочат програмираната клетъчна смърт (PCD) и стареенето (Carmona-Gutierrez et al., 2010; Longo and Fabrizio., 2012). В допълнение, данните за генома на дрождите служат като ценен ресурс за по-нататъшни изследвания и приложения в биоинформатиката и системната биология.

Поради факта, че споделят сходни процеси на клетъчно делене с тези при човека, *S. cerevisiae* е добре установена моделна система за изучаване на клетъчното делене и за

провеждане на експерименти, свързани с по-доброто разбиране на онкологичните заболявания. Те се използват и в изследвания, свързани с невродегенеративни заболявания като болестта на Паркинсон. Установено е, че протеина α -синуклеин е ключов фактор за заболяването, като дрождите се влияят по подобен начин от натрупването на този протеин, което ги прави идеален модел за изследване пътищата за развитие и скрининг на потенциални лекарствени механизми (Mullan and Marsh., 2019).

Притежаването на някои важни характеристики от дрождевите микроорганизми позволява тяхното успешно използване както в молекулярните изследвания, така и за индустриални цели:

- ✓ те са добре проучени и лесни за култивиране, употреба и манипулации;
- ✓ съществуват утвърдени молекулярно-биологични подходи за анализ на тези микроорганизми, както и бази данни, генерирани от високопроизводителни технологии. *Saccharomyces* Genome Database (SGD) е основният ресурс за пъпкуващите дрожди (Cherry et al., 2012), който съдържа пълна информация за дрождевия геном и протеом, както и за други, свързани с тях характеристики;
- ✓ наблюдава се консервативност на дрождевите сигнални и метаболитни пътища с тези на по-висшите еукариоти;
- ✓ показват специфична чувствителност към токсични съединения (Petranovic and Nielsen., 2008).

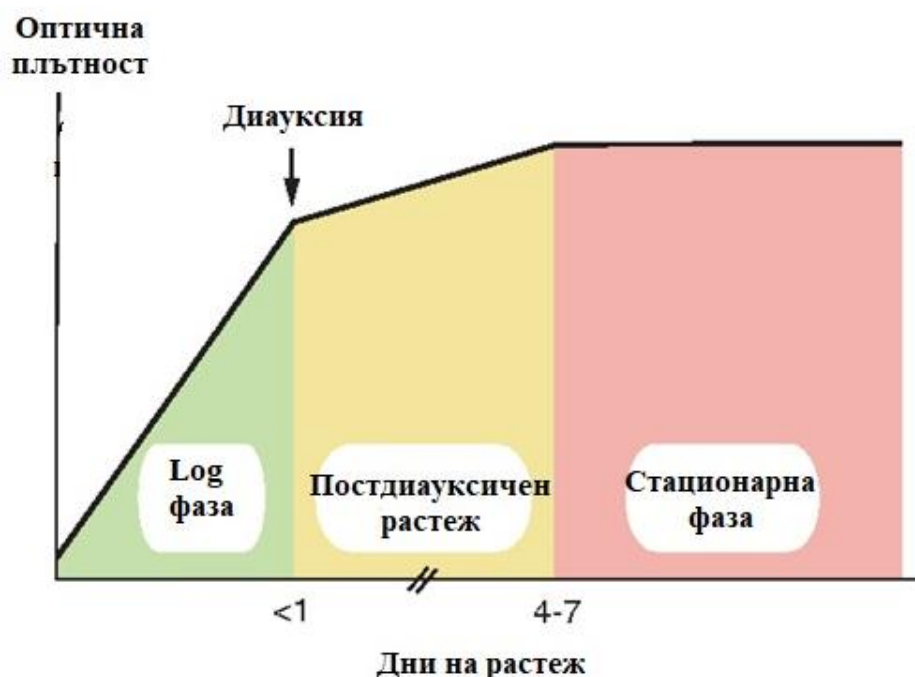
2. Клетъчен цикъл при дрожди

През последните няколко десетилетия интересът към дрождите като модел за *in vivo* изследване на цитотоксичния и генотоксичния ефект на редица химични съединения и лекарства, бе допълнително засилен. С уникалните си генетични характеристики и висока степен на консервативност с висшите еукариотни организми, *S. cerevisiae* представлява подходяща система за изследване и на механизмите на химична токсичност. От друга страна, използването на клетки *S. cerevisiae* в състояние на активна пролиферация е затруднено от физиологичната комплексност на процесите. Затова изследването на по-стабилното състояние на покой G_0 , където такива метаболитни флуктуации са силно намалени и наподобяват клетки на бозайници, е предимство. Това позволява предсказване потенциалното действие на подобни съединения при други видове, допринася за оценката на риска за околната среда и разработването на стратегии за детоксикация. При тези микроорганизми е установено, че ранният транскрипционен

отговор към някои токсични вещества включва повишена регулация на набор от гени, които участват в оксидативния стрес и антиоксидантен отговор (Teixeira et al., 2006a). Този процес корелира с повишени нива на хидроксилни радикали и окислени липиди в клетката. Предвид факта, че оксидативният стрес се свързва с неврологични заболявания, заболявания на ставите, стареене и рак, тези резултати могат да служат като доказателство за ефекта на токсични съединения върху човек при продължително или повтарящо се въздействие.

Растежът и пролиферацията на микроорганизми като дрождите *S. cerevisiae* се контролират отчасти от наличието на хранителни вещества. Когато тяхната концентрация в средата силно се понижи, тези микроорганизми навлизат в стационарна фаза на растеж, характеризираща се със спиране на клетъчния цикъл и специфични физиологични, биохимични и морфологични промени. Последните включват: удебеляване на клетъчната стена, натрупване на резервни въглехидрати и придобиване на термотолерантност. Наскоро установена характеристика на мутантни клетки, които са условно дефектни по отношение възобновяване на пролиферацията от стационарна фаза, предоставя доказателство, че стационарната фаза е уникално състояние от развитието на дрождите. Изучавани са и щамове с мутации, засягащи навлизането и оцеляването по време на стационарна фаза и е доказано, че се засягат най-малко седем различни клетъчни процеса, като: 1) сигнална трансдукция, 2) протеинов синтез, 3) протеиново N-терминално ацетилиране, 4) протеинов обмен, 5) протеинова секреция, 6) мембранна биосинтеза и 7) клетъчна полярност. Точният характер на връзката между тези процеси и оцеляването по време на стационарна фаза остава да бъде изяснен (Werner-Washburne et al., 1993).

Подобно на повечето клетки на Земята, които съществуват в състояние на покой, при дрождите навлизането в тази фаза от жизнения цикъл се предизвиква от недостиг на източник на въглерод. Излизането от това състояние настъпва, когато източникът на въглерод отново стане наличен (Martinez et al., 2004) (Фиг. 1).



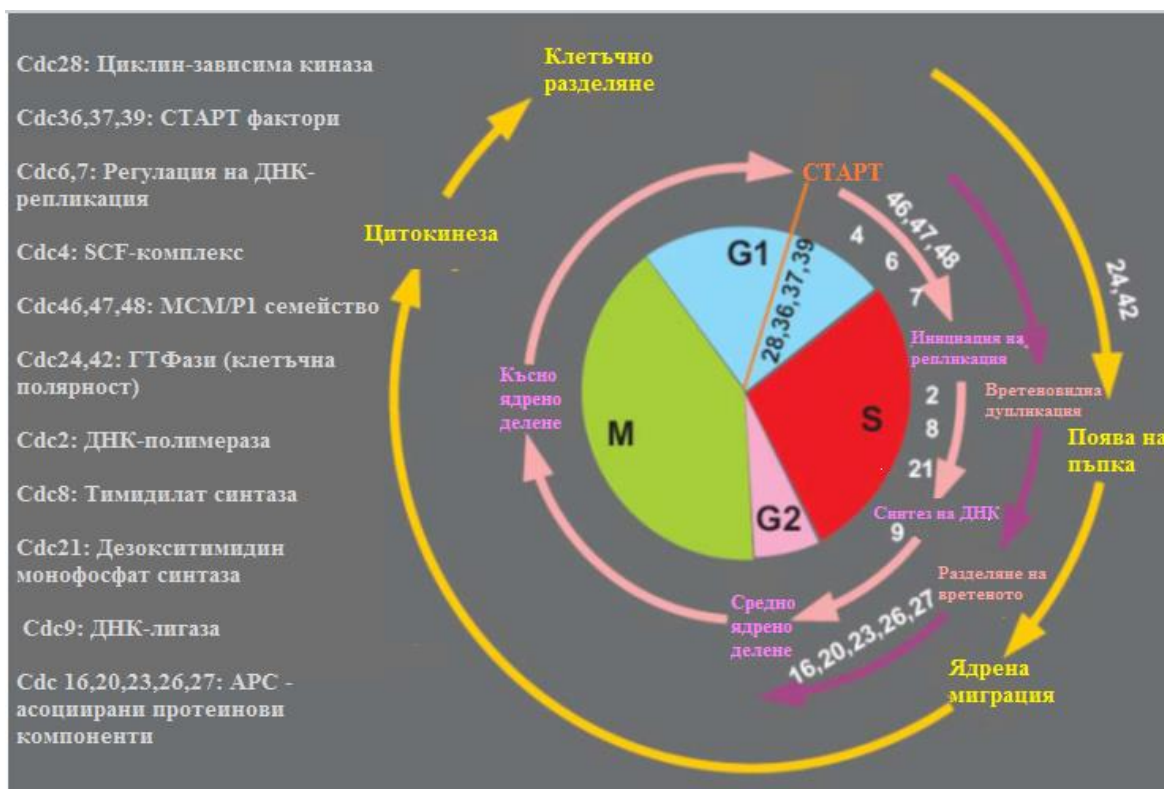
Фигура 1: Стационарна фаза при дрожди (Herman., 2002)

Дрождевите клетки в покой (обикновено изследвани в култури от стационарна фаза [SP]) проявяват много ниска метаболитна активност, включително ниски скорости на транслация (Fuge et al., 1994) и транскрипция (Choder., 1991; Jona et al., 2000). РНК-азите са в изобилие в тези клетки. (Gray et al., 2004). Дебелите клетъчни стени възпрепятстват клетъчния лизис, което затруднява изолирането на протеини и естествени протеинови комплекси. Независимо от това, значението на състоянието на покой във всички организми го прави завладяваща област за изследване, тъй като то е специфично регулирано и програмирано (Werner-Washburne et al., 1993; Herman., 2002; Gray et al., 2004).

2.1. Фази на клетъчния цикъл

Безполовото размножаване при дрождите *S. cerevisiae* се осъществява чрез пъпкуване (Roemer et al., 1996; Vogel et al., 2000; Ni and Snyder., 2001). Това не е случаен процес, а зависи от геометрията на клетката, както и от нейните генетични и физиологични особености. Клетъчният цикъл по своята същност се определя като периода между деленето на майчината клетка, с последващото делене на нейната дъщерна клетка. Представлява строго контролирана поредица от събития. Клетъчният цикъл включва както непрекъснати (клетъчен растеж), така и периодични събития (синтеза на ДНК и митоза). Периодичните събития могат да бъдат разделени на четири фази: ДНК синтеза (S фаза); постсинтетична фаза (фаза G2); митоза (фаза M); и пре-

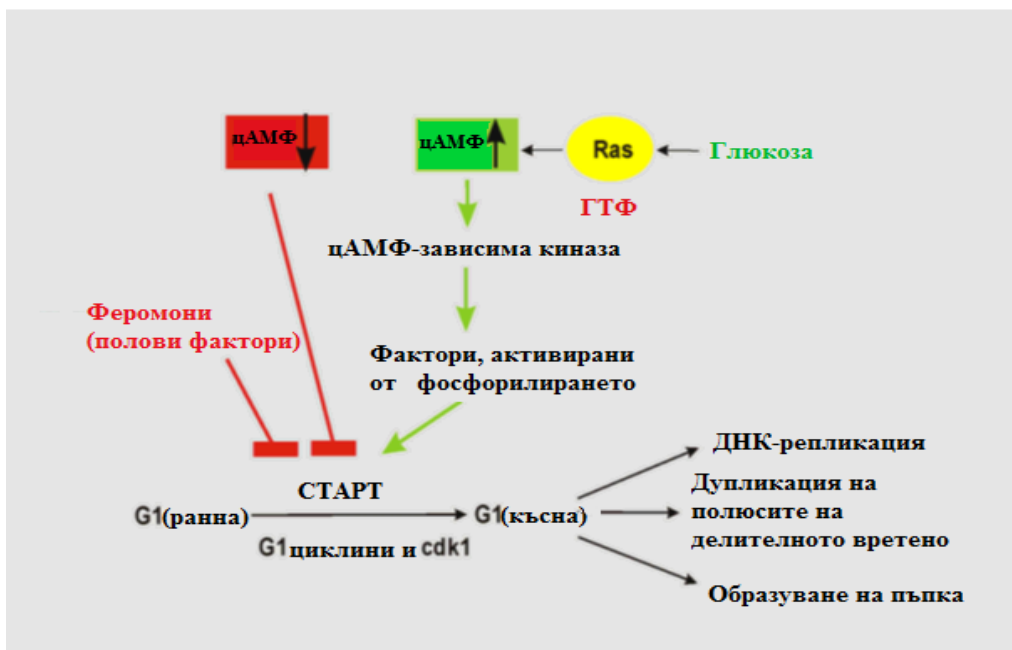
синтетична фаза (G1 фаза). Във фаза G1 от клетъчния цикъл пред дрождевата клетка има няколко възможности: може да завърши цикъла и да се раздели или да навлезе в състояние на покой (G₀). Разделянето на дрождевата клетка се предшества от нейното нарастване до достигане на критичен размер. Когато обаче се изчерпи глюкозата от средата, дрождевите микроорганизми напускат G1 фазата и преминават в G₀ състояние. В някои случаи, когато клетката е хаплоидна, след временно задържане във фаза G1, тя може да конюгира с клетка от противоположен полов тип. Диплоидната клетка, може да претърпи мейоза, вследствие на която да се формират четири хаплоидни спори. От молекулярна гледна точка, тези процеси са неразривно свързани. Правилното и регулирано протичане на процесите от клетъчния цикъл се контролира от система, която е добре изучена при *S. cerevisiae* (Mala and Nurse., 1998; Futcher., 2000; Lauren et al., 2001). Ключовата регулаторна точка на клетъчния цикъл се нарича START, като там се инициират процеси на синтеза на ДНК в S-фаза и дублиране на полярните телца на делителното вретено. При преминаване на START контролната точка, става репликация на ДНК и клетките прогресират напред в клетъчния цикъл. По този начин START регулира както клетъчния цикъл, така и клетъчния растеж. Недостигът на хранителни вещества, както и сливането на хаплоидни клетки, блокира преминаването на START контролната точка (Фиг. 2).



Фигура 2: Клетъчен цикъл при дрожди *S. cerevisiae* (Feldmann and Butenandt., 2005)

Съществуват и допълнителни контролни точки, в които става задържане на клетките по време на клетъчния цикъл, с цел да се избегне увреждане на ДНК или клетъчна смърт. Тези контролни точки са разположени между G1-S и G2-M и се приемат за вътрешни регулатори, които задържат клетъчния цикъл, ако не са изпълнени предпоставките за продължаване на процеса. В тези случаи, след преминаване на зависимата от клетъчния размер контролна точка START, количеството на циклините (Cln, Clb) се увеличава драстично. Известни са повече от 11 вида циклини в дрожди, които участват в контрола на G1 (G1 циклини), G2 (G2 циклини) и ДНК синтезата (S-циклини). Редуването на фазите на клетъчния цикъл се дължи на механизми, водещи до йерархична регулация на различните семейства от циклини, като тяхното ниво в клетката се контролира чрез синтеза и програмирана протеолиза.

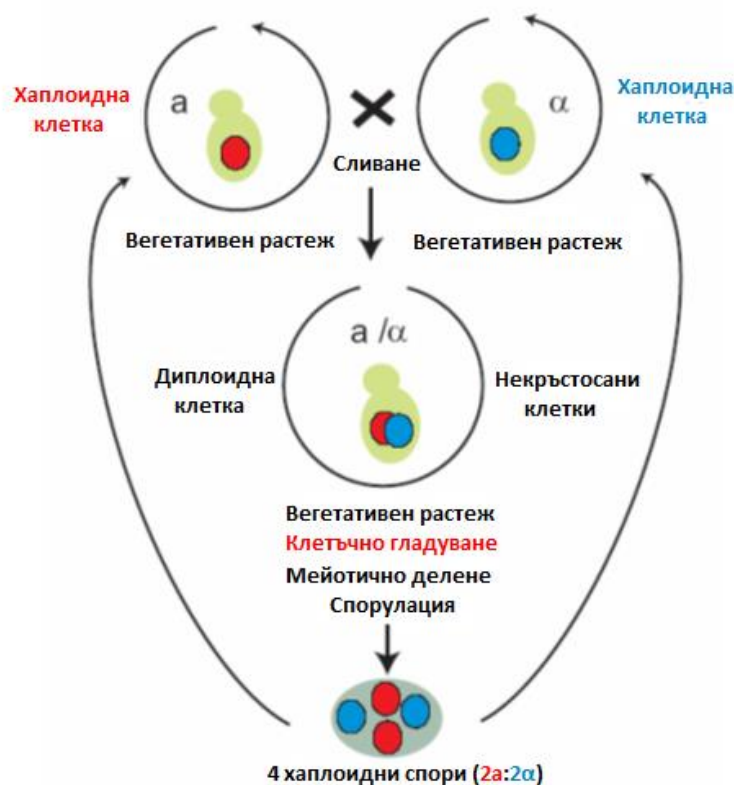
Правилното протичане на клетъчния цикъл се контролира и от наличните хранителни вещества. Концентрацията им (например, на глюкоза или азотни съединения) регулира вътреклетъчното ниво на цикличен аденозин монофосфат (цАМФ) чрез малък G протеин, Ras (Фиг. 3).



Фигура 3: G1 регулация при дрожди (Feldmann and Butenandt., 2005)

Повишените нива на цАМФ водят до активиране на цАМФ-зависима протеин киназа А (РКА), която се фосфорилира и задейства специфични транскрипционни фактори, които активират G1 фазата. Когато концентрацията на цАМФ е ниска, G1 фазата на клетъчния цикъл спира и дрождите навлизат в G₀ състояние (Mathiesen et al., 2013).

Въпреки че вегетативното размножаване е основният начин за размножаване при дрожди, полов процес също се осъществява, когато концентрацията на хранителни вещества в средата е ниска. Той се състои в сливане на хаплоидни клетки от противоположен полов тип, които секретират различни полови феромони - α и β (Shimoda., 2004). Формира се хетерокарион с диплоиден хромозомен набор, който може да се размножава чрез пъпкуване.



Фигура 4: Жизнен цикъл при дрожди (Feldmann and Butenandt., 2005)

При гладуване диплоидните клетки започват да се делят мейотично, при което спорулират, като накрая се образуват 4 хаплоидни спори в съотношение 2a:2α. Този процес се активира при лимитация по азот и се регулира от MAP-специфичен киназен сигнален път. При благоприятни условия, спорите прорастват и продължават да се делят митотично (Фиг. 4).

2.2.G₀ състояние при дрожди

Както стана ясно, в условия на хранителна лимитация дрожди *S. cerevisiae* могат да навлязат в две различни състояния на покой – спори или G₀ (Tomova et al., 2019). Кое състояние ще избере клетка зависи от редица генетични и метаболитни фактори. То се регулира и от набор от специфични растежни фактори и хормони. По време на навлизане в състояние на покой микроорганизмите претърпяват морфологични и физиологични промени, които им позволяват да се противопоставят на въздействието на стреса от околната среда. Както прокариотните, така и еукариотните клетки могат да съществуват в едно или друго състояние на покой в продължение на години (Werner-Washburne et al., 1993; Lewis., 2000). Малко се знае обаче за сигналите, отговорни за повторно навлизане

в клетъчния цикъл. При дрождите този процес обикновено е свързан с предоставяне на източник на въглерод (Granot and Snyder., 1993).

Предпочитаният източник на въглерод и енергия за дрождевите микроорганизми е глюкозата. Когато се култивират в течна среда, те метаболизират глюкозата предимно ферментативно, освобождавайки етанол в средата. Когато глюкозата стане ограничаващ фактор, клетките навлизат в диауксична фаза, характеризираща се с намалена скорост на растеж и превключване на метаболизма от гликолиза към аеробно разграждане на етанол. Когато и етанолът се изчерпи в средата, част от клетките навлизат във фаза на покой. Попаднали в това състояние те са подложени на стрес от липсата на хранителни вещества и натрупване на токсични метаболити, предимно от оксидативния метаболизъм, като се диференцират по начини, които им позволяват да поддържат жизнеспособността си за продължителни периоди от време. Някои от промените, които те претърпяват наподобяват промените в клетки, подложени на реакция на стрес, което води до индуциране на гени, отговорни за синтеза на HSP-белтъци като HSP26, HSP12, HSP82, HSP104, SSA3, както и натрупване на трехалоза (Werner-Washburne et al., 1993; Herman., 2002; Gray et al., 2004). През стационарна фаза на растеж дрождите започват да складираят резервни вещества като гликоген, триацилглицероли, а вероятно също и полифосфати (Taylor and Parks., 1979; Lillie and Pringle., 1980; Hosaka and Yamashita., 1984; Thevelein., 1984). Активира се автофагията (Noda and Ohsumi., 1998). Клетките в покой са по-устойчиви на топлинен и осмотичен стрес (Plesset et al., 1987), както и на въздействието на токсични съединения (DeNobel et al., 2000). За разлика от клетките в експоненциална фаза на растеж, те са в състояние да оцелеят продължителни периоди от време без добавяне на хранителни вещества (Lillie and Pringle., 1980). В същото време са в състояние да проявят подобен транскрипционен отговор към стрес като логаритмичните клетки (Jelinsky et al., 2000), както и бързо да активират транскрипцията на много гени при повторно добавяне на източник на въглерод (Martinez et al., 2004).

Ако дрождевите клетки гладуват по азот или фосфор, те също навлизат в покой, но не е известно дали клетките имат същите характеристики, както ако са лимитирани по източник на въглерод (Werner-Washburne et al., 1993; Herman., 2002; Gray et al., 2004; Zhang et al., 2009). Лишаването от хранителни вещества на диплоидните клетки не винаги може да доведе до G₀ състояние. Когато дрождевите диплоиди растат върху неферментируем източник на въглерод като ацетат и са лимитирани по азот, те претърпяват мейоза и спорулират (Kupiec et al., 1997).

Във всички случаи преходът на дрождевите клетки от експоненциална в стационарна фаза се регулира от няколко ключови метаболитни пътя: протеин киназа А, TOR, Snf1p и Rim15p, които сигнализируют промени, засягащи наличността на хранителни вещества, свързват се с транскрипционните фактори Msn2p, Msn4p и Gis1p и предизвикват обширно препрограмиране на транскрипционния апарат (Фиг. 5).



Фигура 5: Обобщение на известните сигнални пътища, за които се смята, че контролират навлизането в състояние на покой. TOR и PKA пътищата са активни в присъствието на хранителни вещества и имат способността да потискат състоянието на покой. Когато клетките изпитват недостиг на въглерод, и двата пътя се репресират. Дезактивирането на TOR причинява активиране (макар и временно) на PKC, което води до някои характеристики на покой, като например преустроена клетъчна стена. Snf1 пътят се инхибира от наличието на ферментируеми въглеродни източници като глюкоза. Когато тези източници са изчерпани от средата, Snf1 се активира и допринася за превключването от ферментативен към респираторен метаболизъм, което е от съществено значение за навлизане в състояние на покой. (Gray et al., 2004)

Въпреки засилените проучвания през последните години, точните събития, участващи в транскрипционната регулация по време на диауксия и покой не са напълно изяснени. Независимо от това множеството изследвания показват, че клетките на дрождите в G_0 и тези на висшите еукариоти споделят много общи характеристики, въпреки че се различават по един важен аспект. За разлика от много видове клетки в покой при бозайници, дрождевите клетки в покой показват значително по-ниска скорост на метаболизма. Независимо от това, *S.cerevisiae* представлява отличен модел за изследване на G_0 състояние. Имайки предвид, че клетките на многоклетъчните еукариотни организми прекарват по-голямата част от живота си във фаза G_0 , по-доброто разбиране на тези процеси в дрожди може да даде силен тласък в разкриването

механизмите на различни болестотворни процеси, такива като рак и стареене (Galdieri et al., 2010).

3. Дрождите във фармакологичните изследвания

Съвременната медицина е изправена пред предизвикателството да разработи по-ефективни и безопасни терапии за лечение на човешки заболявания, като токсикогеномиката е нова област в науката, която цели разработването на лекарства, оценка на риска и откриване на биомаркери (Guerreiro et al., 2003; Gomase and Tagore., 2008). Тя се основава на изучаването механизма на действие на лекарствата върху генома с използването на глобални подходи за идентифициране на кандидат-лекарствени мишени и извънцелеве ефекти (Swen et al., 2007; Wang and Weinshilboum., 2008; Ruderfer et al., 2009). Прилагането на тази стратегия е важна не само при идентифициране на нови препарати, но и при намиране на нови приложения на вече одобрени лекарства.

В областта на медико-биологичните изследвания и откриването на нови лекарствени препарати все повече се използват дрождите, като еукариотен моделен организъм (Simon and Bedalov., 2004; Mager and Winderickx., 2005; Menacho-Marquez and Murguia., 2007; Hoop et al., 2008b). Около 17 % от всички дрождеви гени са членове на семейства от гени ортолози, свързани с човешки заболявания, като по-голямата част от тези гени, имат хомолози при бозайници (Foury., 1997; Heinicke et al., 2007). Друго основно предимство на дрождите при откриването на лекарствени препарати, е приносът им за идентифициране механизмите на действие на съединенията, когато те са неизвестни. Освен това, *S. cerevisiae* в момента е единствената система, в която е възможно да се оценят всички мишени в клетката *in vivo* (Smith et al., 2010).

Методите, които се използват при дрожди, намират приложение и за изследване на човешки гени, определящи различни заболявания (Gammie et al., 2007; Yuen et al., 2007), скрининг на нови лекарства за лечение на рак, затлъстяване, прионни заболявания и др. (Tribouillard et al., 2006; Marjanovic et al., 2010), както и прогнозиране на отговора към съответното лекарство, въз основа на показатели като генотип и нива на експресия (Perlstein et al., 2007; Ruderfer et al., 2009; Chen et al., 2010). Информация от този характер може да се използва като насока за рационално проектиране на нови лекарствени деривати, с по-малко странични ефекти, и за приспособяване на лечение с лекарства към индивидуални генотипове на пациенти.

В едно интересно проучване дрождите се използват за идентифициране на вторични мишени на азотсъдържащи бисфосфонати - лекарства, които обикновено се използват за лечение на заболявания, свързани с костите, включително рак (Bivi et al., 2009). Единствената известна мишена на тези съединения е фарнезил пирофосфат синтаза, но авторите установяват, че действието на този препарат при дрожди включва повреди в ДНК и цитоскелета. Наборът данни, получен от изучаването на дрожди, е валидиран при бозайници и потвърждава участието на нови биологични процеси и специфични гени, които представляват потенциални нови мишени за съединения с антитуморна активност (Bivi et al., 2009). Нулеви дрождеви мутанти също са използвани за идентифициране на мишени на 78 съединения с различна химична структура и терапевтично значение (Lum et al., 2004), което води до идентифициране на ланостерол синтаза в биосинтетичния път на стерола, като мишена на антиангиналното лекарство молсидомин, докато процесинга на рРНК се определя като потенциална мишена на клетъчния растежен инхибитор 5-флуорурацил. В скрининг проучване е изпитано едновременно действието на 10 различни съединения (включително противоракови и противогъбични агенти) върху колекция от мутантни дрождеви щамове (Giaever et al., 2004), в резултат на което е идентифицирана близка химична структура в три от съединенията, които инхибират мутантен щам ERG24. Това предполага, че клетките реагират по подобен начин на съединения със сходна структура. Няколко съединения с *in vivo* активност срещу дрожди и приони при бозайници са идентифицирани на базата на скрининг при дрожди (Tribouillard et al., 2006), което утвърждава този метод като икономичен и ефективен, високопродуктивен подход за идентифициране на нови прионов инхибитори или за извършване на цялостни проучвания на структурната активност на вече изолирани лекарства против приони при бозайници. Резултатите също така подчертават консервативността на биохимичните пътища, контролиращи формирането на приони.

Независимо от предимствата на дрождите като биологични тест-системи, при тях съществуват и недостатъци, към които спадат: простото устройство на дрождите не позволява изучаване на сложни явления и не може да се предоставят данни за органна или тъканна специфична токсичност. Освен това, изследванията върху дрожди дават приблизителни сведения за токсичните дози на съединението, тъй като *S. cerevisiae* обикновено е по-толерантен микроорганизъм спрямо високи дози на токсични вещества от по-висшите еукариотни клетки. Това вероятно се дължи на клетъчната стена, която служи като бариера, съдържаща редица активни ефлуксни помпи и механизми за

детоксикация, които присъстват в клетките на дрожди и заедно затрудняват определянето на реалната концентрация на приложеното токсично вещество (Sá-Correia et al., 2009; Smith et al., 2010). Друго ограничение е възможното отсъствие на адекватни молекулни мишени в дрождите, тъй като някои цитотоксични съединения засягат физиологични механизми, които не съществуват в дрожди (Foury., 1997; Mager., 1997; Parsons et al., 2003; Winderickx., 2005). Освен това, откриването на хомология между дрождеви и човешки гени не означава непременно, че те са ортолози (Foury., 1997; Heinicke et al., 2007), което от своя страна изисква допълнителни експериментални анализи.

Независимо от това, използването на нови технологии и прилагането на глобалните молекулярни анализи, свързани с ефектите на лекарствените препарати, използващи дрождите като моделна система, разкриват неподозирани по-рано неизвестни молекулни мишени или причинени неблагоприятни ефекти. Дрождите са доказана ценна начална платформа за скрининг и прогнозиране токсичното действие на нови или все още непроучени лекарства / химикали, както и за изследване механизмите на токсичност. Тези първоначални анализи са много улеснени от използването на дрожди, като се има предвид, че сигналните и регулаторни пътища са силно консервативни и могат да разкрият взаимодействията на химичен препарат с очакваните или неочаквани генни, протеинови или метаболитни мишени. Изследването на дрождите, както и на други моделни организми, с междувидовото сравняване на важни гени / протеини, участващи в токсикологичния отговор, ще улесни бъдещото разбиране на токсичния отговор на системно ниво. Очаква се тази стратегия да позволи прогнозирането на действието на лекарствените препарати и в други видове.

4. Механизъм на токсично действие на лекарствените препарати

Терапевтичните агенти имат специфичен начин на действие. В конвенционални дози, тези вещества имат избирателна активност, т.е. имат тесен спектър на действие. В допълнение, фармакологичният профил на такива препарати често зависи значително от химичната им структура, като простите молекулни модификации могат драстично да променят лекарствената активност. Тези белези на лекарственото действие предполагат, че съществува индивидуална тъканна специфичност. Такива тъканни елементи трябва да имат консервативни физикохимични свойства, за да позволят на определени съединения да се комбинират с тях, като едновременно с това ги инхибират. Тези „биологични партньори“ на действието на лекарството се наричат рецептори. Наличието на рецептори

за екзогенно действащи медикаменти предполага, че тези агенти често имитират или инхибират действията на ендогенните лиганди за тези рецептори. Всъщност, лекарствените препарати рядко предизвикват нови ефекти, вместо това те променят съществуващите физиологични функции (Yagiela et al., 2011).

4.1. Рецептор – зависимо лекарствено действие

В продължение на много години след тяхното откриване, рецепторите остават загадка за фармаколозите. Малко се знае за тях, освен факта, че те са сложни макромолекули, притежаващи лиганд-свързващо място за взаимодействие със специфични агенти и ефекторно място за инициране на фармакологичния отговор. С развитието на биохимичните методи за изолиране, откриване и характеризиране на протеини обаче, ензимите стават достъпни като моделни системи за изследване на взаимодействията лекарство-рецептор. Ензимите проявяват много от свойствата, които се приписват на рецепторите. Те са макромолекули с измерими биологични функции, като притежават специфични реактивни места за избрани субстрати. Тясната връзка между ензимите и рецепторите е подчертана в началото на 40-те години на миналия век, когато става очевидно, че някои ензими са и лекарствени рецептори. Нуклеиновите киселини също служат като рецептори за ограничен брой агенти. Някои антибиотици и антинеопластични съединения пречат на репликацията, транскрипцията или трансляцията на генетичния материал чрез обратимо или необратимо свързване към нуклеиновите киселини. Други вещества, включително хормоните на щитовидната жлеза, аналози на витамин D, полови стероиди и надбъбречни кортикостероиди, също променят транскрипцията, но тук засегнатата ДНК се активира или инхибира в резултат на лекарствено взаимодействие с отделен рецепторен протеин в цитозола или ядрото на клетката. Най-често рецепторите се разполагат на повърхността на клетъчните мембрани. С развитието на омикс технологиите, изучаването на рецепторите значително напредна и позволи натрупването на огромно количество данни относно ефекта и механизма на действие на голям брой фармакологични съединения (Yagiela et al., 2011).

4.2. Рецептор-независимо лекарствено действие

Нито едно описание на действието на дадено химично вещество не би било пълно без разглеждане на фармакологичните ефекти, които то упражнява чрез рецептор-независими механизми. Освен факта, че тези лекарства действат без необходими посредници, няма данни, които специфично да групират този разнороден набор от

съединения. Самото разнообразие от лекарствени препарати изключва всякаква обединяваща връзка между дозата и ефекта им на действие. Въпреки това, често се получават криви, изобразяващи зависимостта между концентрацията на лекарственото вещество и крайния резултат. Тези лекарства са разделени произволно в две категории: химично реактивни агенти и физично активни агенти (Yagiela., 2011).

4.2.1. Химично реактивни агенти

Химично реактивните агенти включват широк набор от съединения, някои от които се свързват с малки молекули или йони, докато други атакуват протеини или други макромолекули. Основно, тези препарати се активират от медикаменти, които са рецептор медиирани. С изключение на някои хелатиращи агенти, те не притежават специфичност и реагират индивидуално с широк набор от субстанции. Реакциите с тези агенти се осъществяват с ковалентно свързване или силно йонно прикрепване, като обикновено не се свързват с хидрофобни или слаби електростатични взаимодействия (Yagiela., 2011).

4.2.2. Физично активни агенти

Физично активните агенти често се използват терапевтично, защото са химически инертни и безопасни. Магнезиевият сулфат например е ефективен, защото не може да се абсорбира от гастроинтестиналния тракт и упражнява осмотичен ефект, причинен от задържане на големи количества вода в чревния лумен. Дебелото черво се разтяга и се стимулира да претърпи експулсивно свиване. Подобен физичен механизъм се предизвиква и от водородния пероксид. Въпреки че е силно реактивен, водородният пероксид е полезен при почистване на рани, поради ефервесцентното си действие. Освобождаването на газови мехурчета спомага физическото отстраняване на остатъци от наранените тъкани.

Физически активните агенти обикновено проявяват изненадваща липса на структурна специфичност. За много агенти изискванията за активност са определена фармакологична инертност, съчетана със способността да се прилагат във високи концентрации (в сравнение с повечето други лекарства), без причиняване на прекомерна токсичност (Yagiela., 2011).

4.3. Генотоксични агенти

Мутациите в ДНК могат да възникнат спонтанно или в резултат на химично действие на агенти с ендегенен или екзогенен произход. Генетичната токсикология изследва именно такива агенти, които могат да увредят ДНК и хромозомите на клетките. При еукариотните организми генетичното увреждане на соматичните клетки може да доведе до злокачествено заболяване. Могат да се повлияят неблагоприятно репродукцията или да се провокира появата на наследствени мутации (Philips and Arlt., 2009).

4.4. Агенти, осъществяващи нековалентно свързване

4.4.1. Промяна на ензимната активност

По-голямата част от токсичните реакции във връзка с медицинската терапия са провеждат чрез обратимо свързване на лекарствата със специфични места на клетъчните ензими. Последните постижения във връзка с изясняването структурата на хлоринергични и адренергични рецептори показват, че това са протеини, които споделят свойствата на ензимите като алостеризъм. Изследвания показват, че някои терапевтични действия могат да се изменят, в следствие прилагане на комбинация от химичен агент и ензим (Maynert and Hammond., 1976).

4.4.2. Свързване с нуклеинови киселини

Планарните молекули, като акридиновите багрила, показват идентичност с базовите двойки на двойноверижната ДНК и по време на ДНК репликацията водят до повишаване на „frameshift“ мутациите или изместване рамката на четене (Arcos and Argus., 1974). Изследването на широк набор от химични препарати, включващи актиномицин D, адриамицин, дауномицин, етидиев бромид и други, показва, че те се свързват здраво към НК, вероятно чрез интеркалация, и много от тези субстанции проявяват мутагенна активност (Ames and Yanofsky., 1971; Calberg-Bacq., 1971; Le Pecq et al., 1975). Повечето от направените проучвания обаче, са в микроорганизми и рискът от мутагенната активност на тези химични агенти при човек не може да бъде точно оценен. Първоначално бе широко застъпено мнението, че канцерогенната активност на полицикличните въглеводороди е зависима от интеркалацията в ДНК. Сега е очевидно, че по-важна характеристика на канцерогенезата е образуването на реактивни метаболити

и последващото им ковалентно свързване с макромолекулите в клетката (Miller., 1970; Heidelberger., 1975;).

4.4.3. Свободно-радикални реакции

Хомолитичното делене за образуване на свободни радикали се смята се, че е друг основен механизъм, отговорен за увреждането на редица човешки органи и тъкани (Recknagel and Glende., 1973). Този процес се катализира от смесената функция на оксидазата в ендоплазмения ретикулум. Образуваните краткоживущи свободни радикали, откъсват водород от мембранните фосфолипиди, като по този начин се образуват нови свободни радикали, които причиняват сливане на двойните връзки и разцепване на мастните киселини, водейки до липидна пероксидация.

В обобщение може да се каже, че различните механизми на действие на токсичните агенти водят до нарушаване на клетъчната структура и функция, а това от своя страна предизвиква все по-голям научен интерес по отношение разработването на нови изследователски подходи, базиращи се на различни моделни организми. Ето защо, в настоящия дисертационен труд е разгледан токсикологичният отговорът на дрожди *S. cerevisiae* към четири широко използвани в медицинската практика терапевтични агента – водороден пероксид, ибупрофен, менадион и зеоцин.

4.5. Водороден пероксид – механизъм на действие

Окислителните агенти предимно са нискомолекулни съединения, които лесно преминават през клетъчните стени и мембрани, свързват се с компонентите на клетката, като ги увреждат, вследствие на което може да се стигне до апоптоза. Водородният пероксид (H_2O_2) е ключов представител на класа реактивни кислородни видове (ROS), които по-специално се генерират в процеса на дишане, но също така и като странични продукти от клетъчния метаболизъм. H_2O_2 участва в много физиологични процеси като сигнална трансдукция, клетъчна диференциация и пролиферация, като също така играе роля в медирането на имунните отговори при висшите еукариоти. Той е слабо реактивно съединение и може да действа като слаб окислител или редуктор, който трудно реагира с различни биологични макромолекули - липиди, ДНК и белтъци (освен ако посочените не съдържат повече реактивоспособни тиолови групи или метионинови остатъци) (Hampton et al., 1997; Halliwell., 1999).

Водородният пероксид може да се образува вътреклетъчно, в резултат на някои ензимни реакции, или да действа като екзогенен генератор на оксидативен стрес. Високите нива на H_2O_2 са токсични за всички клетки и предизвикват клетъчна смърт в зависимост от типа на клетката, нейното физиологично състояние, времето на излагане на този агент, концентрацията на H_2O_2 и средата за култивиране (Imlay and Linn., 1987; Gonzalez-Flecha and Demple., 1997; Hampton and Orrenius., 1997; Clement et al., 1998; Halliwell and Gutteridge., 1999). Токсичният му механизъм се дължи на способността му да се превръща в изключително реактивоспособен хидроксилен радикал ($\text{OH}^\bullet$). Това се осъществява чрез излагане на ултравиолетова светлина или в присъствието на преходни метални йони. При свързването на водороден пероксид и преходен метал, като желязо или мед, протича Хабер-Вайс реакция, която е тип Фентънова реакция, силно токсична за биологичните системи (Фиг. 6). Хидроксилният радикал индуцира серия от верижни реакции на перекисно окисление на липидите в клетки, изложени на този агент и може да доведе до увреждане на ДНК и клетъчна смърт.



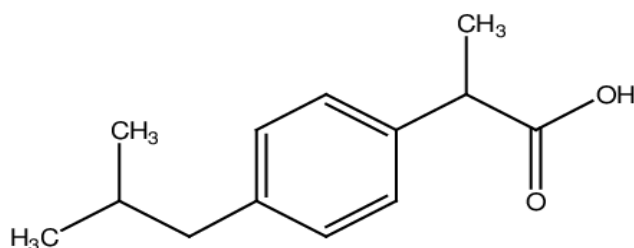
Фигура 6: Реакция на Фентън и Хабер-Вайс. Редуцирана форма на преходни метали (M^n) реагира чрез реакцията на Фентън с водороден пероксид (H_2O_2), което води до генериране на $\text{OH}^\bullet$. Супероксидният радикал ($\text{O}_2^{\bullet -}$) може също да реагира с окислената форма на преходни метали ($\text{M}^{(n+1)}$) в реакцията на Хабер-Вайс, което води до генериране на M^n , което след това отново повлиява редокс цикъла (Ayala et al., 2014)

4.6. Механизъм на действие на ибупрофен

Нестероидните противовъзпалителни средства (NSAIDs) се използват широко при лечението на болка и възпаление. Приемането на лекарства от тази група обаче е свързано със сериозни нежелани лекарствени реакции. Ето защо, механизмите, които обуславят токсичността им, са обект на интензивни проучвания, в които дрождите *Saccharomyces cerevisiae* играят ключова роля като еукариотна моделна система.

Ибупрофенът е NSAIDs, което се получава от пропионова киселина и се счита за първото от пропион-производните лекарствени препарати (Adams., 1992) (Фиг. 7). Формулата на ибупрофен е 2-(4-изобутилфенил) пропионова киселина и първоначалното

му разработка е през 1960 г., а проучванията са свързани с използването му като безопасната алтернатива на аспирин (Rainsford., 2003). Ибупрофенът е патентован през 1961 г. и е пуснат за употреба за първи път срещу ревматоиден артрит в Обединеното кралство през 1969 г. и в САЩ през 1974 г. Това е първото предлагано без рецепта NSAID (Halford., 2012).



Фигура 7: Структурна формула на ибупрофен (Abualhasan., 2015)

Въз основа на механизма си на токсичност, NSAIDs се разделят в три класа: клас I включва диклофенак, индометацин и кетопрофен. Основна роля при токсичното им действие играят митохондриалното дишане и формирането на радикали, които повишават токсичността им, докато ABC-транспортите я понижават. Митохондриите и оксидативният метаболизъм също допринасят за токсичността на лекарства от клас II, ибупрофен и напроксен, но те не са главната клетъчна мишена на тези съединения. Ибупрофенът е единственото NSAIDs, което не активира механизмите, участващи в клетъчния отговор при множествената лекарствена резистентност. Клас III NSAIDs сулиндак, кеторолак и зомепирак са нетоксични при дрожди (van Leeuwen et al., 2011).

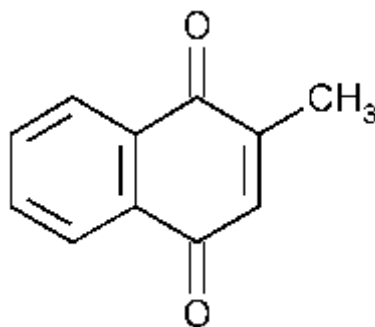
Точният механизъм на действие на ибупрофен не е известен. Въпреки това той се счита за NSAID и по този начин той е неселективен инхибитор на циклооксигеназата (COX) - ензим, участващ в синтеза на простагландини (медиатори на болка и треска) и тромбоксан (стимулатори на кръвосъсирването), по пътя на арахидоновата киселина (Rao and Knaus., 2008). Ибупрофенът инхибира активността както на Cox-1, така и на Cox-2. Инхибирането на активността на Cox-2 намалява синтезата на простагландини, участващи в медирането на възпаление, болка, треска и подуване, докато инхибирането на Cox-1 се смята, че причинява някои от страничните ефекти на ибупрофен, включително язва (Rao and Knaus., 2008). Установено е, че ибупрофенът може да повлияе пакетирането на фосфолипидните монослоеве чрез свързване на липидни компоненти, които се знае, че присъстват в еукариотните клетки. От друга страна ефектът на

ибупрофена върху мембранните структури предполага, че тази молекула може да има и алтернативни мембранны мишени, протеините. Следователно са необходими допълнителни проучвания, за да се установят механизмите, чрез които ибупрофенът проявява своето действие на молекулно ниво (Lygre and Moe., 2003).

4.7. Механизъм на действие на менадион

Структурно хиноните обхващат пигменти, антибиотици, витамин К и коензими. Тези компоненти може да се различават химично при различните еукариотни организми и активно участват като агенти на едноелектронен трансфер в аеробния метаболизъм. Следователно те представляват химични агенти, често използвани в изследването на оксидативния стрес (De Paiva et al., 2004). Интересът към тях е силно засилен и поради факта, че някои химиотерапевтични агенти съдържат хинонови ядра (Monks and Lau., 1998; Monks and Jones., 2002; De Paiva et al., 2004).

Менадионът (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин К3) е полициклично ароматно съединение от групата на хиноните, което се използва широко в проучванията на оксидативния стрес, както и като хемотерапевтично средство при лечение на артрити и като антитуморен агент (Pitsillides et al., 1990; Nutter et al., 1991) (Фиг. 8). Той може да функционира и като прекурсор в синтеза на витамин К.



Фигура 8: Структурна формула на менадион (Wilk., 2007)

Описани са два основни механизма на цитотоксично действие на менадион в различните биологични системи. Първият механизъм е свързан с индуциране на оксидативен стрес в клетката, вследствие процес на редукционно циклизиране, съпроводено от генериране на супероксидни радикали (Hassan and Fridovich., 1989). Менадионът претърпява едноелектронна редукция от ензими като микрозомална

НАДНФ-цитохромна Р-450 редуктаза или митохондриална НАДН убихинонова оксидоредуктаза, при което се получават съответните полухинонови радикали. При аеробни условия, те участват в редукционното циклизиране, при което се генерират реактивни кислородни видове (ROS) като супероксиден анион ($O_2^{\cdot-}$) и водороден пероксид (H_2O_2).

При втория механизъм менадионът действа като потенциален електрофилен агент, способен да взаимодейства с тиолови групи от белтъчни молекули и глутатион. (Di Monte et al., 1984).

Оксидативният стрес сам по себе си е процес, който води до увреждане на мембраните, белтъците и ДНК, което може да доведе до апоптоза (Costa and Moradas-Ferreira., 2001). Доказано е, че това е свързано с естествените процеси на стареене и заболявания като атеросклероза, рак, Алцхаймер и други невродегенеративни нарушения (Costa and Moradas-Ferreira., 2001). Този тип стрес може да бъде генериран ендогенно, по аеробен път или екзогенно, чрез излагане на токсични вещества (Costa and Moradas-Ferreira., 2001). Менадионът е мултивитамин и терапевтичен агент за хипотромбонемия и рак, като неговият цитотоксичен механизъм е свързан с прекомерно генериране на ROS като супероксидни радикали, синглетен кислород и водороден пероксид. Поради тази причина, това съединение широко се използва като модел за изучаване на оксидативен стрес (Seung et al., 1998; Chung et al., 1999).

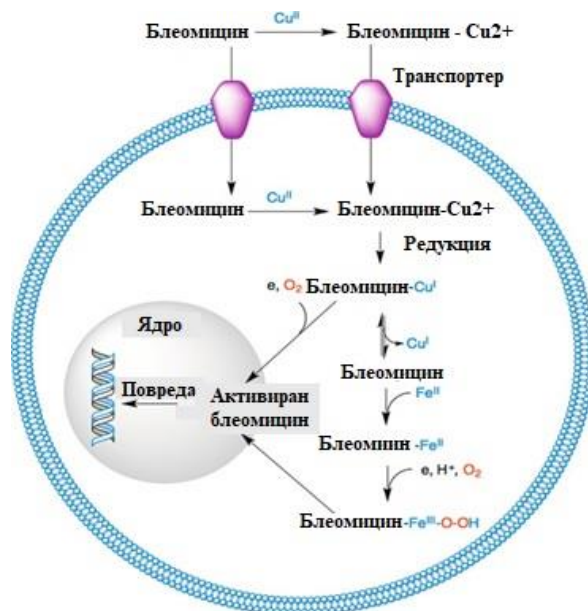
4.8. Механизъм на действие на зеоцин

Редица вещества, които генерират окислителни промени, действат главно върху молекулата на ДНК. Такова съединение е зеоцинът, радиомиметик, който е водно-разтворим, Cu^{2+} - съдържащ гликопептид. Той принадлежи към семейството на блеомицините (BLM) / флеомицините, естествени гликопептиди, продуцирани от вида *Streptomyces verticillus*, които са често приложими в клиничната практика като противотуморни лекарства.

Терапевтичният им ефект включва тяхната способност да причиняват едно- или двойноверижни разриви в молекулата на ДНК, в присъствие на необходимите кофактори Fe^{2+} , O_2 и едноелектронен редуктор (Stubbe and Kozarich., 1987; Burger., 1998; Claussen and Long., 1999; Chen and Stubbe., 2004).

Обикновено блеомицините (BLM) се активират след навлизане в клетките, в присъствието на редуцирани преходни метали (Fe^{2+} или Cu^+) и кислород (Burger et al., 1981). Активираният BLM може да отстрани 4'-водородния атом от C4' на

дезоксирибозната част на пиримидините, като се получават 4'-радикални междинни съединения, които могат допълнително да бъдат превърнати в 4'-окислени апуринови/апиримидинови (AP) места или ДНК с празно пространство с 3' - фосфоглюколат/5'-фосфат (3'-PG/5'-P) краища (Wu et al., 1985; Rabow et al., 1990). Нарушаването на водородните връзки между комплементарните бази може да доведе до разкъсване на двойноспиралната ДНК верига (DSBs), което е пагубно за клетката, ако не се поправи правилно (Chen et al., 2008). BLM-индуцираните ДНК лезии не са произволно разпределени в генома, тъй като 5'-GT* и 5'-GC* динуклеотидите (звездичката [*] показва разцепения нуклеотид) са предпочитаните места за свързване на BLM ('Andrea and Haseltine., 1978). Мутагенезата на BLM е потвърдена в множество организми (Moore., 1978; Koberle and Speit., 1991; Povirk et al., 1994; Fernandez et al., 2020). В допълнение към заместването на базата, лечението с BLM също води до честа делеция на една база (Povirk et al., 1994). При навлизането на зеоцин в клетката, той е в неактивна форма, но след редукция на медния катион до Cu^{1+} и отстраняването му от сулфохидрилни съединения в клетката, зеоцинът се свързва с ДНК, като индуцира едно- или двуверижни разриви в ДНК. Те водят най-често до хромозомни реорганизации и са трудно поправими (Berdy et al., 1980; Krol et al., 2015) (Фиг. 9).



Фигура 9: Механизъм на действие на блеомицините (Avendaño and Menéndez., 2015)

Третираните с BLM клетки показват повишен процент на мутации, но основните механизми на тяхното токсично действие остават неясни. Изследвани са например, глобалните геномни промени в третираните с BLM клетки на дрождите *Saccharomyces*

cerevisiae. Използвайки генетичен анализ и секвениране на целия геном, се открива, че степента на мутации може да бъде значително повишена в клетките на *S. cerevisiae*, които са третирани със зеоцин. Делецията на една база и заместването на тимин (Т) с гуанин (G) в мотива 5'-GT-3' представят най-яркия пример за индуцираните от зеоцин генетични промени. Това е главно резултат от транслезия на синтеза на ДНК, включваща Rev1 и полимераза ζ . Третирането със зеоцин води до честа загуба на хетерозиготност и хромозомни пренареждания в диплоидните щамове. В проведените експериментални изследвания са идентифицирани и множество геномни промени, които допринасят за BLM резистентност в третираните със зеоцин мутанти. Като цяло, тези проучвания предоставят нови прозрения за генотоксичността и еволюционните ефекти на BLM (Zheng et al., 2022).

Освен това е доказано, че зеоцинът има преоксидантен, мутагенен и канцерогенен ефект в *S. cerevisiae* (Todorova et al., 2015b). Полимеразите са от решаващо значение за жизнеспособността на третираните със зеоцин дрождеви клетки при прилагане на по-високи дози. Потвърждава се, че множество геномни промени са свързани с повишена резистентност към зеоцин, предоставяйки нови данни за това как се развива устойчивостта към блеомицините в клетките (Zheng et al., 2022).

5. Влияние на физичните параметри върху преживяемостта на дрождевите клетки

Дрождевите микроорганизми се използват широко и за промишленото производство на различни видове биотехнологични продукти. Тяхната ферментационна ефективност обаче е силно намалена от резките изменения в околната среда и влиянието на различни физични фактори. Техният механизъм на действие е обект на редица научни изследвания от десетилетия, като едни от най-важните физични фактори, оказващи ефект върху микроорганизмите са температурата, рН, наличие или отсъствие на кислород, осмотичното налягане, наличието на свободна вода, звуковите вълни, UV – лъчите и др. Всички те в различна степен повлияват скоростта на растеж или индуцират апоптоза в микробните клетки. В природата съвместно съжителстват много видове и изменящите се условия на околната среда причиняват драматични трансформации на микробиомите поради различната устойчивост и темпове на растеж на микроорганизмите. Всеки микробен вид има набор от оптимални условия, при които се развива най-добре. Въпреки това, тъй като условията в естествената среда варират значително, микроорганизмите развиват толерантност към редица условия на околната среда. Например, много от тях

имат оптимална температура на растеж 30°C, но все пак ще растат, макар и по-бавно, при 4°C (Watson., 2006).

5.1. Влияние на температурата

Ниските и високите температури влияят върху растежа и развитието на микроорганизмите и затова е необходимо да се познават долната и горната граница, за да се установи при кои температури те се развиват най-оптимално. Въпреки това микробните клетки имат способност да растат, независимо дали в средата присъстват всички необходими хранителни вещества, влажност и кислород, ако температурите са благоприятни за техния растеж (Wei., 2021).

Понижаването на температурата води до силно намаляване скоростта на ензимните реакции в клетката. Повечето биологични системи, включително и дрождите, показват около 2-3 пъти по-ниска скорост на метаболизма при понижаване на температурата с 10°C. Ниската температура може да повлияе отговора на микроорганизмите към промяната в околната среда директно или индиректно. Директният ефект включва намаляване на растежната скорост, ензимните активности, които изменят клетъчната композиция и различните хранителни изисквания. Индиректният ефект е свързан с промяна в разтворимостта на молекулите, дифузията на хранителни вещества, пропускливостта на мембраните и клетъчна плътност (Clark., 2002). Tai et al., (2007) обсъждат ролята на температурата за правилното протичане на клетъчни процеси като протеинов синтез и ензим-субстратно свързване. По-ниската температура като цяло забавя ензимната кинетика. Температурата също е важна за поддържане на флуидността на мембраната и нейния синтез. Фосфолипидите също се влияят от промяната на температурата (Tai et al., 2007). Когато намалява температурата се увеличава синтеза на липиди в мембраната (Hunter and Rose., 1972). Обратно, с повишаване на температурата дифузията протича с висока скорост, което води до по-бързо достигане на фазата на максимален растеж.

Влиянието на температурата силно зависи и от фазата на развитие на дрождевите микроорганизми. Учени приписват редица отличителни характеристики на дрождите в стационарна фаза, включително повишена устойчивост към топлинен и осмотичен стрес в средата. Клетките в покой например, са много по-устойчиви към действието на топлинен шок, в сравнение с тези, намиращи се в експоненциална фаза на растеж (Plesset et al., 1987), което от своя страна води до по-голяма термотолерантност в G₀ състояние. Счита се, че термоустойчивостта се придобива при преминаване на клетките от

експоненциална в стационарна фаза (Schenberg-Frascino et al., 1972).

Температурата е един от най-важните физични параметри, който има директно влияние върху дрождевия растеж и ферментационният процес (Watson., 1987). Въпреки, че много от дрождите, участващи в получаването на алкохол и хлебни продукти, са мезофилни микроорганизми, са способни да растат при температури от 0°C до 48°C (Watson., 1987). Установено е, че дрождевата растежна скорост и метаболизъм нарастват когато температурата се движи от субоптимална към оптимална стойност и намаляват когато температурата се повиши над оптималните стойности за растеж (Thevelein., 1984).

Температурната чувствителност на дрождите се използва и при изучаване на техните патологични характеристики. *S. cerevisiae* е известен и общопризнат като безопасен микроорганизъм (GRAS статус), но броят на докладваните инфекции при хора, причинени от него, се увеличава, като се наблюдават фатални такива дори при относително здрави индивиди (Muller et al., 2011). Оказва се, че генната експресия на *S. cerevisiae* може да се промени в резултат на излагане на топлинен стрес, да се инициира специфично нагъване на редица протеини, което да доведе до промяна в клетъчния растеж и активиране на паразитен начин на живот (Helen et al., 2001). По този начин ефектът на повишените температури върху третичната структура на протеините може да бъде обект на допълнителни проучвания, за да стане ясно коя температура инхибира такава синтеза и да се предотврати патогенния ефект, упражняван от *S. cerevisiae*.

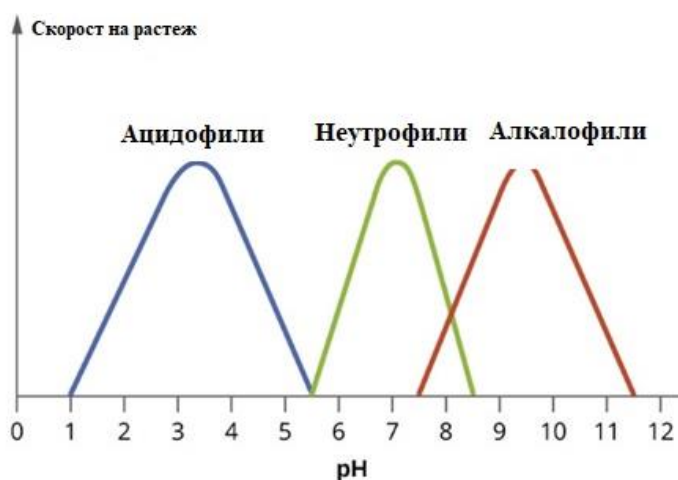
5.2. Влияние на рН

Микроорганизмите и в частност дрождевите организми имат способността да задвижват поредица от биогеохимични процеси, от окислително-редукционни реакции до глобалния цикъл на въглерод и други елементи (Bennett et al., 2001; Falkowski et al., 2008; Maguffin et al., 2015). В замяна, техният метаболизъм се контролира от широк спектър променливи параметри на околната среда, включително рН, един от най-значимите параметри на околната среда, влияещи върху растежа и оцеляването на микроорганизмите (Фиг. 10) (Lennon and Jones., 2011; Amend et al., 2013). Концентрацията на водородните йони (рН) е първичният контрол, който определя разнообразието на микробните съобщества в широк спектър от биогеохимични условия (Chen et al., 2004; Kemmitt et al., 2006; Bethke et al., 2011; Zhalnina et al., 2015, Thompson et al., 2017).

Особени предизвикателства възникват за микроорганизмите, когато концентрацията на водородни йони е висока (кисело или ниско pH), което може да е резултат от естествени геохимични процеси или микробни метаболитни процеси, които често генерират органични киселини като странични продукти. При ниско pH протонирането на биологичните молекули влияе върху техния заряд и следователно както структурата, така и функцията им могат да бъдат засегнати неблагоприятно. Двойният липиден слой обикновено е непроницаем за водородните йони и тази характеристика позволява протонният градиент през мембраната да се използва за генериране на енергия (Mitchell., 1961). Въпреки това, слабите органични киселини, като лактат или ацетат, се протонират при ниско pH (в зависимост от pKa на техните киселинни групи) и следователно незаредени и по-липофилни, могат да проникнат в липидния бислой и да освободят своите протони във вътреклетъчната среда, където pH често е по-близо до неутралното и над pKa стойността на киселинната група. По този начин органичните киселини представляват особено предизвикателство за микробните клетки, тъй като те могат да предизвикат цитоплазмено подкиселяване и разрушаване на протонните градиенти, особено когато извънклетъчната среда е кисела (Hirshfield et al., 2003; Mira and Teixeira., 2013). Дрождевите микроорганизми обикновено реагират на киселинния стрес, като предотвратяват увреждащия спад на вътреклетъчното pH (pHi) под прагово ниво, необходимо за жизнеспособността на клетките. Като цяло се използват три различни стратегии за предотвратяване на такъв критичен спад на pHi (Foster., 2004; Krulwich et al., 2011; Lund et al., 2014). Първо, клетките често използват ензимно катализирани реакции, които консумират протони: реакциите на декарбоксилиране често служат за тази цел, тъй като протонът се включва необратимо в реакционния продукт след отстраняването на CO₂. Примери са декарбоксилирането на аминокиселини, като глутамат, аргинин или лизин. Второ, клетките могат да активират реакции, които синтезират основни съединения, за да подпомогнат неутрализирането на ниското pH. Производството на амониак от урея или съдържащите аминокиселини, като аргинин или глутамин обикновено се използват за наутрализиране на киселинността (Krulwich et al., 2011; Pennacchietti et al., 2018). Трето, много видове микробни клетки елиминират протоните за сметка консумацията на АТФ. Протоните могат да се отделят от някои бактерии с помощта на F₁F₀-АТФ-аза (Russell., 2007; Krulwich et al., 2011), докато при някои видове плесени или дрожди се използва специална протонна транслоцираща ефлуксна помпа (в *Saccharomyces cerevisiae* това е добре проучената протонна помпа Pma1) (Mira et al., 2010). Самите аниони на органичните киселини могат

да действат като инхибитори когато се натрупват при високи вътреклетъчни концентрации, а от своя страна както бактериите, така и дрождите са развили механизми за екскретиране на анионите чрез мембранны помпи (Mira et al., 2010; Du et al., 2018). Понижаването на рН или наличието на органични киселини, често непряко, може да доведе до генериране на реактивни кислородни видове (ROS) (Schellhorn and Stones., 1992; Kim et al., 2006; Bruno-Bárcena et al., 2010), които от своя страна да предизвикат увреждане на ДНК както в бактерии, така и в дрожди (Ribeiro et al., 2006; Jeong et al., 2008).

Повечето от ензимите осъществяват своята функция в малки рН граници, в които ензимната активност е най-висока. рН оптимумът за *S. cerevisiae* е 5,5. Киселините и основите водят до денатурация на ензимната структура чрез разкъсване на основни водородни и йонни връзки, в резултат на което субстратът не може да остане комплементарен на активния център. Освен това, зарядът на аминокиселините в активния център на ензимите, се променя при промяна на рН на средата, което също пречи на формирането на ензим-субстратен комплекс. Под и над рН оптимума, скоростта на ензимните реакции в клетката драстично намалява (UKEssays., 2018).



Фигура 10: Разделяне на микроорганизмите спрямо отношението им към рН (Parker et al., 2016)

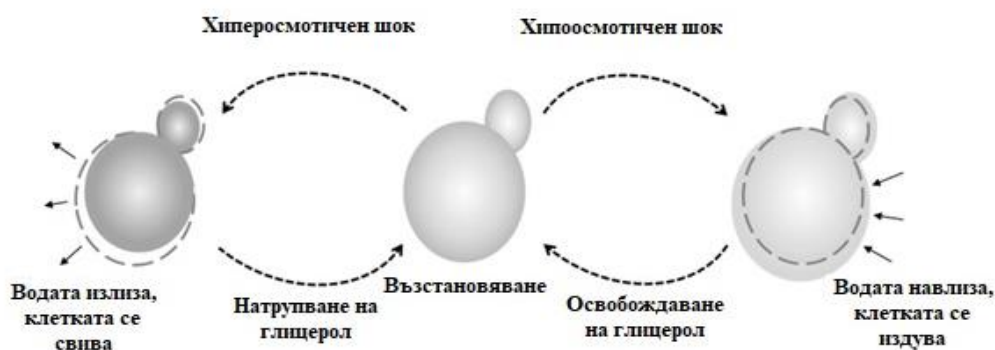
5.3. Влияние на осмотичното налягане

Микроорганизмите успешно колонизират почти всяка ниша на Земята, където имат достъп до вода. Активността на водата се определя като химичен потенциал на свободната вода в разтвор и се изразява в тенденцията на водата да участва в биохимичните реакции (Hohmann., 2002b). При хиперосмотичен шок, водата изтича от клетката, което води до свиването ѝ и следователно повишаване на концентрациите на

всички вещества, присъстващи в цитоплазмата. Обратно, при хипоосмотичен стрес, водата навлиза в клетката, причинявайки увеличаване на клетъчния обем и намаляване концентрацията на разтворените вещества. Затова клетките трябва да адаптират своята вътрешна осмоларност чрез получаване на подходящ клетъчен обем и вътрешна водна оптимална концентрация, за да се осигури правилното протичане на биохимичните процеси и възстановяването на тургорното налягане (Blomberg and Adler., 1992; Hohmann., 2002a). Тъй като загубата или усвояването на вода са бързи процеси, които са от решаващо значение за механизмите на оцеляване, те имат способността да се активират веднага след внезапна осмотична промяна (Blomberg and Adler., 1992). Въпреки това, адаптацията след хиперосмотичен шок може да отнеме няколко часа (Blomberg and Adler., 1992; Hohmann., 2002b).

S. cerevisiae еволюира, за да възстанови своя воден баланс чрез натрупване на съвместимия осмолит глицерол (Hohmann., 2002b). Разнообразна гама от молекули могат да действат като съвместими осмолити, например: аминокиселини, полиоли и захари, метиламини, метилсулфонови съединения и урея (Yancey., 2005). Осмолитите функционират за намаляване на вътреклетъчния воден потенциал и по този начин привличат водата в клетката. Освен това осмолитите могат да имат уникална защитна метаболитна роля като антиоксиданти, осигуряващи редокс баланс (Yancey., 2005). Когато клетките имат достатъчни нива осмолити, при възстановено тургорно налягане и обем, растежът може да се възобнови в състояние на висока осмоларност (Фиг. 11). Така адаптираните клетки са по-защитени, когато са изложени на нови стресови условия (Siderius et al., 1997).

Обратно, при хипоосмотичен шок външната осмоларност намалява и водата навлиза в клетката. Ето защо и дрождевите клетки реагират с намаляване на нивото на вътреклетъчния глицерол и така поддържат правилното тургорно налягане (Tamas et al., 1999; Levin., 2005).



Фигура 11: При хиперосмотичен стрес водата изтича от клетката, което води до почти незабавно намаляване на клетъчния обем и съответно увеличаване концентрацията на всички вещества, присъстващи в цитоплазмата. Адаптацията включва натрупване на глицерол и по този начин създаване на подходящо тургорно налягане и възстановяване на клетъчния обем. Обратно, при хипоосмотичен стрес, водата навлиза в клетката, причинявайки увеличаване на клетъчния обем. Адаптирането става чрез освобождаване на прекомерно количество глицерол, за да се предотврати спукване и по този начин се балансира тургорното налягане (Babazadeh., 2014)

5.4. Влияние на UV – лъчи

Ултравиолетовата светлина унищожава микроорганизмите като бактерии, дрожди, плесени, вируси и водорасли. Потискането растежа на микроорганизмите чрез UV лъчи се прилага в практиката от дълги години, като има широко приложение (Qualls and Johnson., 1983; Zemke et al., 1990, Rames et al., 1997; Warriner et al., 2000; Lin and Blatchley., 2001; Favier et al., 2001). Известно е, че UV лъчите имат стерилизиращо действие в зависимост от параметри като дължина на вълната и микробна концентрация (Wallbank et al., 2001; Bourrouet et al., 2001). Дължина на вълната между 200-300 nm, която е свързана с абсорбцията на ДНК, причинява апоптоза на клетките (Ishida et al., 1991). UV радиацията предизвиква увреждане на ДНК, което е потенциално смъртоносно за клетките и е канцерогенно за животни (Hockberger., 2002). Проучванията при делящи се и пъпкуващи дрожди показват, че гените, които са отговорни за оцеляването под действие на UV лъчи, кодират два фактора за възстановяване на ДНК (Strathern et al., 1981; Phipps et al., 1985), както и контролни протеини, които регулират клетъчния цикъл в отговор на увреждане на ДНК (Hannan et al., 1975; al-Khodairy and Carr., 1992). Тези гени са еволюционно запазени сред еукариотите, така че могат успешно да се използват при изучаване на различни молекулярния механизъм (Aravind et al., 1999). Пиримидиновият димер е най-разпространената форма на ДНК увреждане, за което е известно, че се предизвиква от UV, като тази повреда се отстранява от ДНК чрез нуклеотидна ексцизионна репарация (NER) (Cadet et al., 2007).

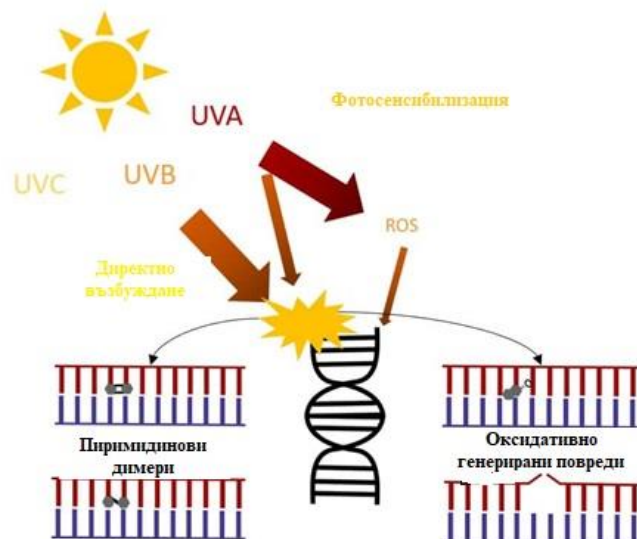
NER е основен път за репарация на ДНК, който може да елиминира различни ДНК повреди, генерирани главно от мутагени на околната среда, като ултравиолетово (UV)

облъчване и химични съединения и водещи до изкривяване на ДНК спиралата (Gillet and Schärer., 2006). Еукариотният NER се състои от два подпътя: глобален геномен NER (GG-NER) и NER, свързан с процеса на транскрипция. Първият е особено важен за потискане на UV-индуцирана мутагенеза и канцерогенеза (Kusakabe et al., 2019).

Когато присъстват по време на S фазата, пиримидиновите димери формират празно място в дъщерната ДНК верига (Rupp and Howard-Flanders., 1968; Lopes et al., 2006). Репарацията на тези повреди е пострепликационна и включва хомоложна рекомбинация, байпас полимерази и други (Friedberg., 2005). UV лъчите имат способността да формират пиримидинови димери и в РНК освен в ДНК, което от своя страна може да повлияе не само репликацията, но и транскрипцията. (Goosen and Moolenaar., 2008; Cutler and Zimmerman., 2011).

Слънцето излъчва радиация с дължина на вълната под формата на видима и невидима светлина. Невидимата светлина съдържа ултравиолетовата светлина, която може да бъде класифицирана в три вида: UVA, UVB и UVC. UVA не се абсорбира от озоновия слой и следователно попада директно в тропосферата; тя прониква в клетките на кожата, причинявайки преждевременното ѝ стареене и влияе върху имунитета. UVB се абсорбира частично чрез озона, като е отговорна за увреждането на ДНК, което води до рак и клетъчна апоптоза. UVC се абсорбира напълно от озоновия слой.

Лесните за култивиране представители от род *Saccharomyces* са подходящ модел за идентифициране въздействието на UV лъчите върху молекулата на ДНК (Barahona et al., 2016). Друга причина за широкото им използване в изследователският процес се основава и на приликите в репродукцията и метаболизма им с човешките клетки. Когато са изложени на UV лъчи, дрождите мутират (Фиг. 12) по механизми, сходни с тези при висшите еукариоти (Alhamdy and Al-Sowayan., 2020).



Фигура 12: UV-индуцирани повреди в ДНК, причинени от UV-A и UV-B лъчи (Waters., 2017)

5.5. Влияние на гравитационна сила

Според някои учени, микроорганизмите могат да оцелеят при гравитация повече от 400 000xg, която е повече от тази на Земята,. Хората за разлика от тях, могат да понасят сили, равни на около три до пет пъти гравитацията на повърхността на Земята (g). Екстремната "хипергравитация" от 400 000xg обикновено се среща само в космически среди.

Част от способността на микроорганизмите да издържат на хипергравитация е свързана с техните размери, съгласно Deguchi., (2011). Колкото по-голям е един организъм, толкова по-чувствителен е той към гравитационните сили. Многоклетъчните организми, включително и човека, не понасят силата само на няколко пъти g. За разлика от еукариотните клетки, които изграждат нашите тела, бактериалните клетки нямат специализирани органели, които се утаяват под действието на хипергравитация. Ето защо прокариотните клетки са по-малко чувствителни на действието на гравитационните сили. Защо обаче някои микроорганизми са по-устойчиви от други не е напълно изяснено и са необходими допълнителни проучвания по въпроса (Than., 2011).

5.6. Влияние на механичната сила

Физичните сили играят ключова роля в оцеляването и функционирането на всички живи форми на живот. Напредъкът в клетъчната биомеханика и механобиология може да даде ключови прозрения във физиологията на еукариотните организми, но

малко се знае за влиянието на физичните сили върху микробния метаболизъм (Harper and Hernandez., 2020).

Механичните свойства на клетъчната стена играят съществена роля относно растежа и формата на *S. cerevisiae*. За разлика обаче от огромните познания за генетиката на *S. cerevisiae*, малко се знае за техните механични свойства. Отговорът на цялата клетка към приложените механични сили се определя от взаимодействието на няколко фактора, включително силата и еластичността на отделните молекули, съставляващи клетъчната стена, триизмерното подреждане на тези молекули и генетичните фактори, програмиращи състава и сглобяването им (Smith et al., 1999). Идентифицирани са много гени, които пораждат аберантни форми, въпреки че не е известно как генните продукти влияят на формата (Harold., 1995). Последните постижения в атомно-силовата микроскопия позволяват да се измери еластичността на глюкопиранозния пръстен (основният мономер в клетъчната стена на *S. cerevisiae*) (Marszalek et al., 1998), но не е известно какви са механичните свойства на сглобяването на молекулите (Ruiz-Herrera., 1992), нито как условията на околната среда им влияят. Необходими са изследвания във всички тези области, за да може на фундаментално ниво да се разбере по-добре растежът и формирането на клетката. Ясно е, че определянето на механичните свойства на клетъчната стена е съществена част от този процес и че към днешна дата те са слабо проучени.

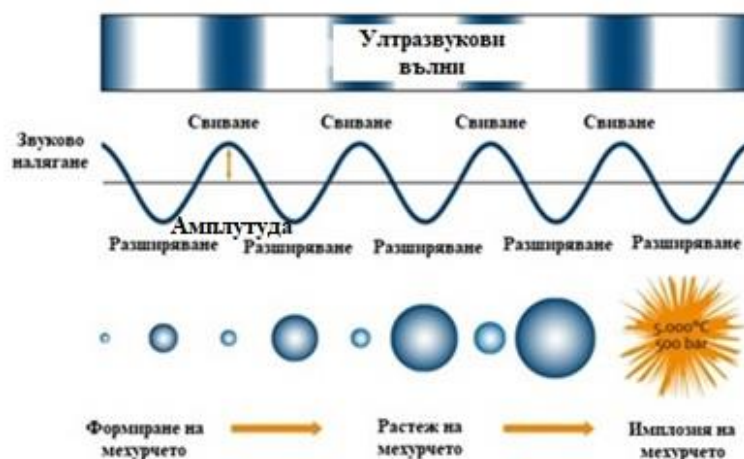
Изучаване на механиката на дрождевата клетка играе значителна роля и при изследване на биологията на микробните повърхности: потокът на течността и контактът между клетките и повърхностите са две повсеместни и важни характеристики за съществуването на дрождевите микроорганизми в естествена среда. Напредъкът в микромасщабното инженерство и микроскопията предоставят мощни инструменти за изследване влиянието на физичните сили върху микробното сензорно възприятие и адаптация (Rusconi et al., 2014). Още повече, познанията върху механичните свойства на дрождевите микроорганизми би спомогнало за разработването на по-ефективни подходи за разрушаване на техните клетки. В литературата са описани различни методи за клетъчен лизис, които могат да бъдат приложени за екстракция на различни клетъчните компоненти. Например, за обща екстракция на протеини може да се използва литиев ацетат (LiAc) в комбинация с NaOH, което води до повишаване на пропускливостта на клетъчните стени на дрождите, освобождавайки протеините от клетките (Zhang et al., 2011). За разлика от това, за екстракция на липиди, по-ефективен подход е хомогенизирането на клетъчна суспензия в присъствието на органични разтворители и

стъклени перли с диаметър 0,25–0,30 mm (Schneider and Daum., 2006). Авторите показват, че методът позволява разрушаване на клетките в продължение на четири цикъла от 30 s при 1700 rpm с пауза от 30 s между циклите. По отношение на извличането на полизахариди, които се намират главно в клетъчните стени, първо, трябва да се вземе предвид дали се цели получаването на нативни молекули или фрагменти от β -глюканите. Един от методите за извличане на β -глюкани включва клетъчно фрагментиране, което се получава чрез използване на стъклени перли или ултразвук. Някои по-сложни методи за извличане на β -глюкани, включват използването на комбинация от ултразвук, алкални вещества и ензими (Zheng et al., 2019).

5.7. Влияние на ултразвук

Ултразвукът се дефинира като акустична енергия или звукови вълни с честота над 20 kHz. Обикновено се смята, че ултразвукът е пагубен за клетъчния растеж; въпреки това, клетките могат да растат в озвучаване с нисък интензитет поради неговите свойства, а именно: 1) способността му да ускорява транспортирането на малки молекули в разтвор и 2) неспособността му да отделя напълно клетките (или дори неживите частици) от повърхностите. Въпреки че първият аспект е добре известен, вторият е слабо проучен; и всъщност неговата антитеза е общоприета – погрешното схващане, че ултразвукът е много ефективен при премахване на клетки и частици от повърхности.

Ултразвукът ускорява движението в течността чрез поне два механизма. Първият е акустичен поток, при който импулсът от насочени разпространяващи се звукови вълни се прехвърля към течността, което я кара да тече в посоката на разпространение на звука. Акустичният поток се увеличава с интензитета на озвучаване и има данни за акустичен поток със скорости до 14 cm/s (Starritt and Duck., 1989).



Фигура 13: Механизъм на въздействие с ултразвук (Johansson, 2017).

Вторият и по-забележим механизъм за засилване на движението е известен като микропоток и се осъществява чрез натрупване на газови мехурчета в течността (Elder., 1959; Nyborg., 1982; Starritt and Duck., 1989; Dyson., 1982; Martin et al., 1982; Rooney., 1988). Циклите на ниско и високо акустично налягане карат газовите мехурчета да се разширяват и свиват, което от своя страна създава сила на срязване около осцилиращите мехурчета (Nyborg., 1982). Стабилна кавитация се получава, когато акустичният интензитет е достатъчно нисък, така че мехурчетата да не се разрушат напълно по време на цикъла на свиване. Началото на стабилна кавитация значително увеличава транспорта; такъв транспорт се ускорява с увеличаване на акустичния интензитет, тъй като се образуват по-големи и многобройни кавитационни мехурчета и амплитудата на трептене се увеличава. Ултразвукът с висок интензитет и ниска честота ($< 100 \text{ kHz}$) обикновено се използва за почистване на твърди повърхности, като повърхности на стъклени съдове, метални инструменти, пластмасови изделия и други (Crawford., 1968; Bulat., 1972; Zips et al., 1990; Mott et al., 1998; Maisonhaute et al., 2002). Високочестотният ултразвук с ниска плътност се използва широко за генериране на голямо количество окислително-редукционни радикали, като например окисляване на органични замърсители във водна среда.

Установено е, че ултразвук с подходяща дължина на вълната може да стимулира растежа на микроорганизмите. Той променя жизненото състояние на микробните клетки, което води до ускоряване на тяхната пролиферация и биосинтезата на повече продукти на метаболизма. Всъщност ултразвукът увеличава пропускливостта на мембраната, ускорява преноса на вещества и насърчава растежа и размножаването на клетките. Изследване на Wang et al., (2003) върху влиянието на ултразвукови вълни с нисък

интензитет върху общото натрупване на Ca^{2+} в клетките на *Saccharomyces cerevisiae* показва, че то може значително да се повиши под действието на приложеното третиране.

6. Стресов отговор при дрождите *S. cerevisiae*

Как отговарят дрождевите клетки на постоянните въздействия от околната среда? Оказва се, че тези микроорганизми се характеризират с бърза молекулна реакция към настъпващите промени. Различни изследвания показват, че дрождевите организми притежават разнообразни механизми, които им позволяват бързо да реагират на вредни въздействия, дори и в условия на много ниски концентрации на токсични агенти. Един такъв механизъм е стохастичният процес на пренареждане на гените (стохастично превключване), който стимулира определени клетки от популацията да станат резистентни към ефекта на вредния фактор от околната среда. Друг вид адаптация е адаптивната устойчивост, появяваща се като следствие от активирането на специфична програма за стресов отговор. При дрождите функционират различни такива механизми, сред които различаваме стресов отговор към външни фактори на средата (ESR), предизвикан от много и различни изменения в околната среда и известен още като общ стресов отговор (CER). Съществуват и множество механизми, специфични за конкретни стресови фактори (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001). ESR представлява метаболитна програма, свързана с активността на два хомоложни транскрипционни фактора, Msn2p и Msn4p (наричани Msn2p / Msn4p), които са общи за много различни видове екологичен стрес. Тази програма се характеризира с инхибиране на експресията на голям набор от гени, чиито продукти са свързани с растежа на клетките, и активиране на гени, чиито продукти контролират процесите на протеолиза, възстановяване на увредените протеини, предотвратяване на окислителното увреждане и реорганизацията на клетъчните структури. Включването на тези защитни механизми осигурява поддържането на метаболитната хомеостаза в клетката. В тези условия се активират и гени, чиито продукти позволяват икономично използване на наличните въглеродни и енергийни източници или използване на алтернативни източници на въглерод (Gasch et al., 2000; Chen et al., 2003). Реакцията към конкретен фактор от околната среда е уникална, тъй като се състои от елементи както от специфичния, така и от ESR. В дрождевите митохондрии, например са идентифицирани елементи на стресов отговор, характерни и за бактериални клетки, които се явяват медиатори на строгия стресов отговор (гуанозин тетрафосфат (ppGpp) и гуанозин пентафосфат (pppGpp)). Активирането на тези процеси може допълнително да повлияе фенотипа на дрождевата

клетка в условия на стрес (Pao et al., 1977; Hamagishi et al., 1981). Изследвания на Yamada et al., (2003) и на Ochi et al., (2012) потвърждават, че (p) ppGpp в дрождевите клетки може да регулира експресията на няколко гена, включително гени, отговарящи при стрес. Въпреки че при дрождите не е наблюдавана активност на ppGpp-синтезиращ ензим, продукцията на този уникален нуклеотид в цитозола на клетката, вследствие експресията на хетероложен ген Sj-RSH от халофилното растение *Suaeda japonica* (хомолог на бактериалния ген SpoT / RelA, кодиращ ppGpp синтетаза), успява да осигури устойчивост към различни видове стрес, като осмотичен стрес, както и такъв, породен от етанол, водороден пероксид, висока температура и замръзване. По този начин, освен системите за стресов отговор, специфични за еукариотите, дрождевите клетки могат да имат и латентна консервативна система, аналогична на тази при прокариоти, в която ppGpp е молекула медиатор. Предходни проучвания показват, че голям набор от дрождеви гени (около 900) показват подобен драстичен отговор към голямо разнообразие от промени в околната среда, включително температурен шок, водороден пероксид, менадион, диамид, дитиотреитол, хипер- или хипоосмотичен шок, лимитация по аминокиселини, изчерпване на азотен източник и преминаване в стационарна фаза (Gasch et al., 2000). Проведени са и много наблюдения върху глобалните ефекти на голямо разнообразие от лекарствени препарати върху генната експресия. В повече от 27 от тези проучвания е направено паралелно сравнение (т.е. контролни клетки срещу изложени на стрес клетки), като в някои случаи провежданите експерименти за дълги периоди от време. Въпреки че в тези проучвания е събрана много ценна информация, хетерогенността в последващите протоколи изключва просто сравнение между различните лекарствени реакции. По-специално е изключително трудно да се идентифицират различните регулаторни мрежи и да се установят техните хронологични връзки. Въпреки това, подобни подходи са особено ценен източник на информация, в случай на анализ на клетъчния цикъл (Pramila et al., 2002); те обаче са по-малко подходящи за описание на хронологията на транскрипционните събития, в случай на стресов отговор. Това вероятно се дължи на естествената сложност на геномния отговор, който трябва да се справи с голямо разнообразие от химични фактори.

При *S. cerevisiae* съществува голямо разнообразие от общи транскрипционни фактори като Yap1 или Msn2 / Msn4, както и по-специализирани фактори като семейство Pdr, които предлагат широк спектър от геномни отговори към новите условия на околната среда. Yap1 е по-известен с ролята си в регулирането на транскрипционния отговор при оксидативен стрес (Moye-Rowley., 2003). В този контекст Yap1 активира две

групи гени, i) кодиращи H_2O_2 и ROS - обезвреждащи ензими (*SOD1-2*, *CTT1*, *TSA1* и др.) и ii) редокс активни съединения, които поддържат цитозола в редуциран вид чрез НАДФН (*TRR1-2*, *GLR1*, *GRX1* и др. (Delaunay et al., 2002). Редица изследователи твърдят, че ключова роля играе тиоловата пероксидаза Grx3, която е необходима за образуването на дисулфиден мост между N- и C-крайния цистеинов регион (c-CRD) на Yap1 фактора в присъствието на H_2O_2 . Тази модифицирана форма на Yap1, освободена от Crm1p – медиран ядрен експорт, се натрупва в ядрото и може да активира съответните репортерни гени (Delaunay., 2002). В допълнение, Yap1 може да регулира отговора на дрождите към действието на някои химични вещества и токсични метали (Wemmie et al., 1997). Също така е наблюдавано, че Yap1 разграничава оксидативен стрес, предизвикан от окислителния агент H_2O_2 и химичен стрес, предизвикан от диамид. Реакцията при оксидативен стрес, генериран от менадион или синглетен кислород, включва бързо активиране на група от специфични гени, медирано също от транскрипционен фактор Yap1p и / или Skn7p. Продуктите на тези гени са отговорни за детоксикацията на формираните супероксидни радикали (супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза 3 и антиоксиданти, специфични за тиоловите групи). При тези условия също се активират гени, чиито продукти участват в окислително-редукционни реакции (Stephen et al., 1995; Brombacher et al., 2006).

При специфичният отговор на стресови въздействия се активират специфични пътища за определения тип стрес. Тук се включва активирането на специфични защитни и възстановяващи механизми, чийто краен ефект е устойчивост на същите фактори на стрес. Пример за специфичен отговор е индуциране синтезата на шаперони (Hsp), които улесняват нагъването на други протеини, в условия на топлинен шок. Реакциите на 28 различни нагъвания, зависими от Hsp активността, изискват присъствието на АТФ. Намаляването на нивото на АТФ обикновено води до повишена експресия на гени, чиито продукти участват в процесите за генериране на енергия (Hardie., 1999). Посредник на специфичния отговор при топлинен шок е транскрипционният фактор на топлинния шок - Hsf1p-протеин, консервативен при дрожди и човек.

Специфичният отговор при повишено външно осмотично налягане включва активиране на транскрипционния фактор Smp1p, медиран от протеин кинази (МАРК), участващи в пътя на високо-осмоларния глицерол (HOG). Този път играе значителна роля за регулирането на активността на редица гени, чиито продукти са необходими на клетките, за да се адаптират към условията на хипер или хипоосмотична среда (De Nadal et al., 2003). Допълнително, изчерпването на глюкозата, която е предпочитан въглероден

и енергиен източник за дрождите, води до дерепресия синтезата на специфични ензими, които позволяват растежа на дрождевите клетки върху алтернативни субстрати, като етанол или глицерол (Boy-Marcotte et al., 1998).

Във всички случаи ранният стадий на стресов отговор включва промяна в активността на вече съществуващи ензими и подготовка на клетките за синтеза на нови протеини, т.е. възприемане на стресов стимул и активиране на пътищата за предаване на стресови сигнали и транскрипционни фактори, регулиращи активността на специфични гени. На този етап може да бъде избран един от два различни пътя за последваща трансформация на клетката: забавяне на растежа в условия на лек и/или умерен стрес или спиране на растежа, но с шанс за оцеляване, в условия на силен стрес. Отговорът към слаб стрес зависи от характера и интензивността на фактора, предизвикващ стреса, и води до устойчивост на клетките към последващ силен стрес от същия тип (същата устойчивост на стрес) или кръстосана стресова устойчивост между двойки различни стресови фактори. Тя включва биосинтеза на специфичен набор от протеини, посттранслационни модификации на тези протеини и техните специфични реакции в клетката. Стрес-индуциращите фактори, може да действат в различна степен на интензивност. Лекият стрес обикновено се отнася до фактор, действащ в сублетална доза, който не редуцира преживяемостта на клетките, а само забавя растежа им. Най-често такъв стимул активира стресовия отговор, който мобилизира клетъчните защитни механизми. Силният стрес се отнася до състояния, които временно спират клетъчния цикъл във фаза G1 (Johnston and Singer., 1980). Ефектите от силния стрес обикновено причиняват увреждане на клетъчните макромолекули и предизвикват структурни и функционални промени с различен обхват. Последните симптоми на силен стрес могат да бъдат ускоряване на процеса на стареене или индуциране на апоптоза или некроза в клетката (Madeo et al., 1999; Wawryn et al., 1999; Galluzzi et al., 2011;). Следователно, един и същ стимул, в зависимост от дозата, може да предизвика противоположни физиологични ефекти.

7. Биоинформатични подходи за изучаване състоянието на покой при дрождите *S. cerevisiae*

7.1. Биоинформатика и системна биология

В днешно време биоинформатиката се превръща в основна част от повечето научни изследвания, свързани с живота (Marcus., 2008). Тя представлява важна

интердисциплинарна част от науката, с която се извличат биологични данни, с помощта на изчислителен анализ. Биоинформатиката прилага концепции и методи от много области като математика, статистика, генетика, компютърни науки, физика, химия, медицина и биология и предоставя информация от различни биологични данни (Marcus., 2008).

Основните направления на биоинформатиката могат да бъдат обединени в три различни групи: 1) да се улесни управлението на данни и достъпа и споделяне на съществуваща информация под формата на база данни, като база данни за ДНК последователности GenBank (Benson et al., 2013), за функционална геномика ArrayExpress (Rustici et al., 2013), за молекулни взаимодействия BioGRID (Stark et al., 2011), 2) да се стимулира разработването на алгоритми и инструменти за разрешаване на биологични въпроси, например алгоритъм за идентифициране на специфични биологични характеристики в списък от гени (Oliveira et al., 2008), Cytoscape за визуализация на мрежи за взаимодействие (Shannon et al., 2003) и metaMA за мета-анализ (Marot et al., 2009) и 3) да се подпомогне прилагането на инструменти и методи за извличане на полезни знания от данните, например анотации на геноми, реконструкция на метаболитни пътища и анализ на експресия в целия геном (Luscombe et al., 2001).

Наличието на експерименти с висока производителност позволява разглеждането на клетките като системи, при които свойствата на системата се изучават като цяло, а не като отделни части (Palsson., 2006). Системната биология може да се разглежда и като подход за разбиране на биологичните системи, които лежат в основата на мрежи от взаимодействащи си компоненти (Munoz et al., 2012). Също така обединява биолози, математици, компютърни специалисти, инженери и физици за изследване на комплексни биологични системи. Основната цел на системната биология е да получи количествено представяне на данни, които представляват интерес и могат да бъдат описани под формата на различни математически модели. Тези модели се използват за прогнозиране поведението на клетките/организмите при различни условия или като модели за интегративни анализи (Kohl et al., 2010; Munoz et al., 2012). Всичко това включва използването на биологични бази данни, включително тези, генерирани от високопроизводствени технологии (метаболомика, транскриптомика и интерактомика) и прилагането на изчислителни подходи за интегриране на получените данни, с цел реконструкция на моделно поведение и извършване на последващи анализи.

7.2. Проектиране и развитие на биологична база данни

След развитието на технологиите за секвениране на ДНК с висока производителност, биоинформатиката стана основна дисциплина за извличане на информация от геномните последователности (Barnes., 2007). Терминът информатика е описан от Altman., (2012), който гласи: „това е изследване, свързано с представянето, съхраняването, търсенето, извличането и анализирането на съответната информация (Altman., 2012)”. Биологичните данни могат да дадат информация, съхранявана в ДНК последователности, експресия на РНК, триизмерни протеинови структури, протеинови взаимодействия, клинични данни и публикувана литература. С други думи биоинформатиката е област от науката, която използва различни методологии и изчислителни технологии за структурно съхраняване на биологична информация под формата на бази данни, които спомагат за разрешаването на биологични мистерии и експериментално проектиране.

Всъщност биоинформатичните бази данни и софтуерни инструменти стават незаменима част от научните изследвания в наши дни. Те съдържат информация от научни изследвания за живота, вариращи от необработени данни с висока производителност до резултати от различни анализи. Такива бази данни могат да бъдат класифицирани в различни категории, например бази данни за последователност и структура на нуклеинова киселина ([GenBank Overview \(nih.gov\)](#)), бази данни за протеинова последователност и структура ([UniProt](#)), бази данни за метаболитни и сигнални пътища ([KEGG GENOME Database](#)), бази данни за специфични организми ([Saccharomyces Genome Database |SGD \(yeastgenome.org\)](#)) и бази данни за микрочипове и гена експресия ([ArrayExpress < BioStudies < EMBL-EBI](#)).

7.3. Геномен анализ и изследване ролята на гени, отговорни за стресовия отговор и навлизане в G₀ състояние

S. cerevisiae е един от най-широко използваните моделни организми в областта на молекулярната биология, биотехнологията и за изследване на процеси, свързани с човешкото здраве и заболявания (Petranovic and Nielsen., 2008). Принципите на действие на фундаментални клетъчни механизми, като репликация на ДНК, рекомбинация на ДНК, клетъчно делене, протеинова хомеостаза и везикуларен трафик, са еволюционно запазени при дрожди и по-висши еукариоти (Fields and Johnston., 2005; Winderickx et al., 2008). Установено е, че гените на дрождите също имат хомолози при бозайници, например *RAS1* и *RAS2* са хомолози на *RAS* протоонкогените на бозайници (Botstein et

al., 1997). Ето защо, провеждане на изследвания с дрожди (или чрез класически комплементарни анализи за човешки протеини, които имат хомолог при дрожди или от хуманизирани дрождеви системи за човешки протеини, които нямат дрождев аналог) допринася за разкриване на функционалните роли или биологичните последици от мутации в човешки протеини (Winderickx et al., 2008; Botstein and Fink., 2011). В днешно време за дрождите има относително изчерпателен набор от омикс данни на ниво геном, транскриптом, интерактом и метаболом. Тази налична информация улеснява изследванията в областта на системната биология, която наблюдава повече от индивидуални гени и протеини, но разглежда как тези молекули взаимодействат и работят заедно, за да установят свойствата на живите клетки. Бидейки моделен организъм, който се използва широко за изследване на основни клетъчни процеси, каквито са навлизането в състояние на покой и стресов отговор, за дрождите понастоящем има натрупана значителна по обем информация, описваща клетъчните компоненти, техните взаимодействия и състояния на биологичните мрежи. Данните, описващи тези компоненти и взаимодействията между тях, включително геномни секвенции (Bussey et al., 1997), протеинови комплекси (Gavin et al., 2006) и белтък-ДНК взаимодействия (Harbison et al., 2004) могат да бъдат използвани, за изучаването на мащабните мрежи от взаимовръзки между молекулите на биологичната система, като по този начин се изгражда основа за глобалното разбиране на биологичните процеси. Дали дрождевата клетка ще навлезе в пролиферативен клетъчен цикъл или ще премине в състояние на покой, е строго регламентирано и изключително важно решение. Подобно на дрождевата клетка, човешките клетки също са в състояние обратимо да излязат от клетъчния цикъл, в отговор на промени в околната среда (липса на хранителни вещества и растежни сигнали) и да преминат във фаза на покой. Неадекватният клетъчен отговор към външни промени може да доведе до неконтролирано клетъчно делене, което е в основата на раковите заболявания, или до невъзможност за размножаване, което от своя страна води до дефекти в развитието, преждевременно стареене и дефекти при зарастване на рани. Основните сигнални пътища и гени, за които се знае, че участват в регулирането на процесите на навлизане и излизане от стационарна фаза, включително пътищата TORC, Ras / PKA и AMPK, са консервативни при дрождите и човека (Tatchell., 1986; de Winder., 1999; Fabrizio et al., 2001; De Virgilio and Loewith., 2006; Longo and Fabrizio., 2012). Въз основа на това е удачно създаването на *in silico* модели за изучаване на сигналните механизми на оксидативния стрес и навлизането на клетките в покой при човека, разгледан в сравнителен аспект с моделния обект *S. cerevisiae*.

7.4. Вътреклетъчна локализация на белтъци

Една от основните цели в клетъчната биология и протеомика е да се идентифицират субклетъчните места и функции на протеините, за да се разберат пътищата, които регулират биологичните процеси на клетъчно ниво. Този подход има важно значение за развитието на системната биология и разработването на нови лекарствени препарати. От особен интерес са протеините с много локации или динамични характеристики, тъй като те могат да имат някои много специални биологични функции, които са интригуващи както от фундаментална, така и от фармакологична гледна точка (Glory and Murphy., 2007; Smith., 2008). Специфичното насочване на протеини към вътреклетъчните компартменти се медира от дефинирани сигнални последователности. За да се постигне мултинасочване към различни части на клетката се използват различни стратегии.

При *in silico* предсказването на субклетъчната локализация на протеините, в зависимост от тяхната последователност, се използват няколко подхода. Единият подход се опитва да идентифицира мотиви, разпознаваеми от транспортните белтъци и рецептори на белтъчния транспортен механизъм, за да се насочат протеиновите продукти от цитозола към други субклетъчни локализации (Mott et al., 2002). Този подход е ограничен от сравнително малките познания за тези сигнали (липсата на детекция на известни мотиви не е сигурно доказателство, че протеинът остава в цитозола).

Вторият подход използва хомоложни последователности на белтъците от експериментално проверена локализация (Nair et al., 2002).

Третият подход използва аминокиселинния състав на белтъка, основавайки се на хипотезата, че физикохимичните свойства на белтъчните остатъци трябва да бъдат свързани по някакъв начин с физикохимичните свойства на средата, в която протеинът изпълнява своята функция (Gardy et al., 2002; Höglund et al., 2006). Този подход има предимството, че може да се прилага към всеки набор от компартменти и белтъци, при условие че има достатъчно данни.

Повечето съществуващи методи за предсказване на протеинова субклетъчна локализация могат да покрият само 5 до 12 места за локация. Също така, те са ограничени да се справят с протеини с едно местоположение и по този начин не успяват да работят за мултиплексни протеини, които могат едновременно да съществуват или да се таргетират до две или повече локации. Всъщност мултиплексните протеини от този вид обикновено притежават някои важни биологични функции, достойни за специално

внимание. Понастоящем един от най-ефективните софтуеъри е този разработен от Chou and Shen., (2010), наречен „Euk-mPLOC 2.0“, който позволява идентифициране на еукариотни протеини сред следните 22 места: (1) акрозома, (2) клетъчна стена, (3) центриола, (4) хлоропласти, (5) цианела, (6) цитоплазма, (7) цитоскелет, (8) ендоплазмен ретикулум, (9) ендозома, (10) извънклетъчно, (11) апарат на Голджи, (12) хидрогенозома, (13) лизозома, (14) меланозома, (15) микрозома (16) митохондрия, (17) ядро, (18) пероксизома, (19) плазмена мембрана, (20) пластид, (21) тяло на Шпиндел и 22) вакуола.

7.5. Анализ на генна експресия

Според централната догма на молекулярната биология, генната експресия е процес, при който ДНК последователността се транскрибира в генен продукт или РНК. Микрочиповете и наскоро РНК секвенирането (RNA-seq) се използват широко за измерване нивата на генна експресия, които са прилагат в няколко контекста, включително изследване на генните функции, разкриване на регулаторни модели, изучаване на съвместна експресия и идентифициране на предполагаеми маркери. Данните за транскриптома са достъпни в няколко публични бази данни като ArrayExpress (Rustici et al., 2013) и Gene Expression Omnibus (GEO) (Barrett et al., 2013). Изчислителните и статистическите методи играят важна роля в обработката и извличането на информация от тези база данни. Една от най-известните платформи е Bioconductor, която съдържа R софтуерни пакети за анализ на микрочипове и други високопроизводствени геномни данни (Reimers and Carey., 2006).

Появата на високопроизводителни геномни техники, заедно със завършването на проекти за секвениране на генома, идентифициране на протеин-протеинови взаимодействия и реконструкция на геномни пътища, ускори развитието на системните биологични изследвания в дрождите *S. cerevisiae*. По-специално, откриването на биологични пътища в дрождите се превърна във важен аспект на системната биология, която има за цел да разбере взаимодействията между молекулите вътре в клетката, водещи до определени клетъчни процеси в отговор на специфичната среда. Докато съществуващите теоретични и експериментални подходи позволяват изследването на добре известни пътища, участващи в метаболизма, генната регулация и сигнална трансдукция, биоинформатичните методи предлагат нови прозрения за изчислително моделиране на биологичните пътища. Тези подходи разглеждат серия от молекулни взаимодействия в клетката при различни условия, които водят до крайни биологични функции. Сигналите от външната среда предизвикват вътрешни химични

реакции с цел справяне с конкретни задачи. Например, функцията на МАРК-съдържащ комплекс може да бъде променена чрез фосфорилиране на компонентите му от активна МАРК в съответния сигнален път (Chen and Thorner., 2007). През последното десетилетие са разработени много мащабни експериментални и изчислителни подходи за дешифриране на химичните реакции в метаболитните пътища, генната регулация в регулаторната мрежа и предаването на сигнали в сигналните пътища. Идентифицирането на връзката между гени, протеини или молекули в биологичните пътища е от решаващо значение за разбирането на сложните биологични дейности и биологичните функции.

S. cerevisiae, като един от най-интензивно изследваните едноклетъчни еукариоти, обикновено се използва като моделен организъм за откриване на подобни клетъчни процеси и специфични протеинови функции в други организми. Съществуват редица много важни функционални пътища, като липидния метаболизъм (Nielsen., 2009) и клетъчния цикъл (Hartwell., 2002), които са идентифицирани при дрождите и екстраполирани в човек (Botstein et al., 1997). Именно чрез развитието на системните биологични изследвания в дрождите, *S. cerevisiae* успешно е използван за характеризиране на пълната картина на клетъчните процеси и при висшите еукариотни клетки.

Така например стареенето е процес, свързан с прогресивно намаляване на възможността за противодействие на клетъчния стрес и повреда (Sharon et al., 2009). Също така, това е и ендегенен стимул за апоптоза. Има две парадигми на стареене, описани в дрождите: репликативна продължителност на живот (RLS) и хронологична такава (CLS). RLS се измерва чрез броя удвоявания на майчината клетка преди нейната смърт, докато CLS е времето за оцеляване на неделящите се популации при дълъг период на култивиране (Longo and Fabrizio., 2012). И при двата типа се стига до клетъчна апоптоза, като започват активно да се натрупват кислородни радикали и се активира клетъчната каспаза (Sharon et al., 2009).

Репликативното стареене на дрожди е потенциален модел за процеса на стареене при пролифериращи клетки, като човешки стволови клетки, докато хронологичното стареене служи като модел за стареене на постмитотични типове клетки като мозъчните и мускулните (Rockenfeller and Madeo., 2008). За разлика от RLS, CLS се влияе пряко от наличието на хранителни вещества. Липсата на хранителни вещества кара клетките да влязат в диауксична и стационарна фаза, показвайки няколко физиологични промени, като ниска скорост на транскрипция, намален метаболизъм, намален белтъчен синтез, дебели клетъчни стени и липса на пъпкуване. Дрождевата клетка също натрупва

молекули за съхранение като гликоген, триацилглицерол, полифосфат и трехалоза (Galdieri et al., 2010). Пътища на сигнална трансдукция, които регулират преживяемостта и реакциите на стрес са идентифицирани и са установени като еволюционно запазени. Те са рапамицин (TOR), протеин киназа А (PKA) и път на Snf1 (Fabrizio and Longo., 2003; Galdieri et al., 2010).

Промените в околната среда могат да повлияят негативно клетъчната хомеостаза, което може да е в резултат на клетъчна повреда, а не в резултат от липса на растеж или смърт. По този начин живите организми могат бързо да се адаптират в отговор на оцеляването към околната среда. Дрождите развиват стратегии за отговор при стрес чрез ремоделиране на програмата за генна експресия с промени в рН, температура, хранителни условия, осмотично налягане, нива на кислород, лекарства и токсични компоненти (Gasch et al., 2000). Репрограмирането на генната експресия може да се проследи именно чрез ДНК микрочипове (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001; Knijnenburg et al., 2009). Тези геномни изследвания позволяват да се придобие представа за регулиране реакциите на стрес.

В повечето проучвания дрождите реагират на промените в околната среда чрез промени в генната експресия на хиляди гени (Gasch and Werner-Washburne., 2002). Сред тях около 900 гена се променят при различни условия на външната среда и те се обозначават като гени за отговор при стрес от околната среда (ESR - environmental stress response (ESR) genes). Има приблизително 300 гена, участващи при стресовия отговор и това са гени, които се включват във въглехидратния метаболизъм (например *FBP26*, *TPS1,2,3* и *GSY2*), нагъването на протеини (например *HSP26,42,78* и *SSA3*), при разграждане на протеини (например *UBC5,8* и *UBI4*) и при оксидативен стресов отговор (напр. *CTT1* и *SOD1*) (Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001; Gasch and Werner-Washburne., 2002). Повечето от тези ESR гени съдържат STRE мотив (AGGGG) в своите промотори, разпознаващ се от Msn2 и Msn4, които могат да се считат за общи транскрипционни фактори на стреса.

Въпреки това, гените в ESR се регулират от различни транскрипционни фактори, които са специфични за това състояние, напр. Yap1 и Hsf1 регулират ESR гените в отговор на оксидативен стрес или топлинен шок, съответно (Gasch et al., 2000; Gasch and Werner-Washburne., 2002). Освен това, общо около 600 репресирани гени участват в метаболизма на РНК, рибозомните протеини и протеиновия синтез, което показва, че клетките се опитват да съхранят енергия по време на адаптацията си към нови условия (Causton et al., 2001; Gasch and Werner-Washburne., 2002).

8. Заключение

Натрупването на химически замърсители в околната среда представлява безспорна опасност за човешкото здраве и екосистемите. Все още обаче е слабо проучен токсикологичния отговор на клетъчно и молекулно ниво, вследствие излагането на клетките на токсични съединения - информация, която, ако е налична, би улеснила анализите, свързани с оценка на риска на редица лекарствени препарати. Във връзка с това изучаването на клетъчния отговор към стресови въздействия (както химични, така и физични) е от първостепенно значение в широк кръг области - от здравословна околна среда, фармакология и разработване на лекарства, до биотехнологията като цяло.

От друга страна използването на еукариотния дрождеви микроорганизъм *Saccharomyces cerevisiae* като модел за натрупване на познания относно ефекта на различни токсични съединения върху метаболизма, чрез прилагане на високо възпроизводими омикс методи и биоинформатични подходи за анализ, заедно с целенасочени изследвания от молекулярната и клетъчна биология, ще увеличи нашето разбиране и ще осигури интегративен поглед върху начина, по който клетките взаимодействат с обкръжаващата ги среда. С уникалните си генетични характеристики и висока степен на консервативност с висшите еукариотни организми, *Saccharomyces cerevisiae* представлява подходяща система за изследване на механизмите на химична токсичност и физичен стрес. Още повече през последното десетилетие бе доказано, че клетъчният покой блокира процеса на клетъчна диференциация и корелира с устойчивостта към химиотерапевтични противоракови средства и ксенобиотици; характеристики, които са общи за възрастни стволови клетки и вероятно туморни стволови клетки (Harnes and DiRenzo., 2009). В тази връзка характеризирането и използването на *S. cerevisiae* G₀ клетки, като модел за изучаване на токсикологичния отговор и механизмите на резистентност в еукариотната клетка, ще бъде значимо научно постижение.

IV. Цел и задачи

Досега са регистрирани повече от 25 милиона химични вещества в база данните Chemical Abstract (<http://www.cas.org>) и е направена оценка, че ежегодно в околната среда се натрупват повече от 10 000 синтетични химикала. Въпреки факта, че съединенията с промишлен произход осигуряват многобройни предимства, няма съмнение, че те и замърсяват околната среда. Поради това, съществува необходимост от разработване на моделна система, която да служи за оценка на екологичната токсичност чрез реално биологично въздействие.

В този контекст, основна цел на настоящия дисертационен труд бе:

Изучаване приложимостта на клетки *Saccharomyces cerevisiae* в различни фази от жизнения цикъл като еукариотен модел за 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 химични 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.

V. Материали и методи

V.I. Материали

1. Микроорганизми

При разработване на експерименталната част от дисертационния труд беше използван дрождеви щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) (Harsch et al., 2010), хаплоид, от немската колекция EUROSCARF.

2. Хранителни среди

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 от щама беше използвана течна хранителна среда YPD със състав: глюкоза 2 %, пептон 1 %, дрождев екстракт 1 %; pH 6,5.

V.II. Методи

1. Култивиране на щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

1.1. Поддържане на щама

Използваният щам се поддържа върху течна хранителна среда АСД (състав (g/l): глюкоза 20, пептон 10, дрождев екстракт 5 с pH=6-6,5).

1.2. Изготвяне на посевен материал

Дрождевият щам BY4741 е култивиран в ерленмайрови колби с обем 500ml с 100 ml течна хранителна среда YPD. Последната се стерилизира, охлажда, след което колбите се инокулират с 24 часова култура от щама.

Култивирането е извършено на ротационен Шутел апарат при 205 rpm, на хранителна среда YPD при 30°C за 14 часа с цел изолиране на клетки в логаритмична фаза на растеж и за 7 дни за получаване на Go дрождеви култури.

2. Микроскопско описание

С помощта на свеж покривен препарат е проследено морфологичното състояние и чистотата на дрождевата култура. Процентът на клетките преминали в и излезли от G_0 състояние е определен микроскопски с чрез броячна камера на Бюркер. Процентът живи, мъртви и пъпкуващи клетки е определен микроскопски чрез оцветяване с метиленово синьо.

3. Събиране на биомаса

Събирането на биомасата е осъществено чрез центрофугиране на културалната течност при 5000 rpm за 10 минути. Промитата биомаса е съхранявана на -20°C или 4°C в зависимост от последващите анализи.

4. Изолране на различни дрождеви клетъчни популации в перколен плътностен градиент

Изолрирането на клетки в логаритмична фаза на растеж (Log) на щам *S. cerevisiae* BY4741 е осъществено на 24 час от проведенето култивиране. Разделянето на клетъчните популации от късна стационарна фаза на растеж (168 час) е постигнато чрез центрофугиране в перколен плътностен градиент на дрождеви култури изолирани (Allen et al., 2006). В центрофужни епруветки са отпипетирани 6 ml от следната компонентна смес - перкол : 1,5 M NaCl, в съотношение 9:1 (v/v). Епруветките са центрофугирани при 13 800 rpm (19 240g) за 15 минути при 20°C , с цел формиране на градиент. Приготвена е клетъчна суспензия от дрождева биомаса в стационарна фаза с $\text{OD}_{540} = 200$ (2×10^9 кл/ml), суспендирана в 8 ml 0,1 M Tris-HCl буфер с pH=7,5. Тя е наслоена върху формирания градиент и центрофугирана при 400 g за 60 минути при 20°C . Обособените горна (нископлътностна) и долна (високоплътностна) клетъчни фракции са събрани отделно, промити двукратно с 40 ml 0,1 M Tris-HCl буфер с pH=7,5 и центрофугирани на 4000 rpm при 20°C . Клетките в G_0 (Q - quiescent) състояние съставляват високоплътностната долна фракция, докато NQ-клетките (Non-Quiescent) са в горната, нископлътностна фракция.

5. Дезинтегриране на дрождеви клетки и получаване на безклетъчен екстракт

Промитата свежа биомаса от логаритмични, G_0 и NQ клетки е ресуспендирана в 0.05M калиево-фосфатен буфер (КФБ) с pH=7.8 и към така получената суспензия бяха добавени стъклени перли ($425 \div 600 \mu\text{m}$) в крайно съотношение клетки: стъклени перли:

буфер = 1 : 1 : 2. Дезинтегрирането е проведено в хомогенизатор Bullet Blender за 10 min при скорост 8000 rpm. Полученият безклетъчен екстракт е съхраняван при -20°C за последващи биохимични анализи.

6. Изолиране на митохондриална фракция

Дрождеви сферопласти са получени след 90 min инкубация на 37°C в 50mM TRIS-HCl, 0,5M сорбитол, 10mM EDTA, 20mM DTT и зимолиаза, pH 7,5. Дрождевите митохондрии са изолирани от предварително получените сферопласти след осмотичен шок в дестилирана вода, съгласно процедурата на Holtta et al., (1977). Клетъчните фракции са отстранени чрез центрофугиране на 1000 x g за 10 min. Тежката митохондриална фракция (ригидни митохондрии) е отделена след центрофугиране за 20 min при 3500 x g на 4°C. Получената митохондриална утайка е промита трикратно с буфер А, съдържащ 0,5 M сорбитол, 50 mM TRIS-HCl, 10mM EDTA, pH 7.5. Събраните митохондрии са ресуспендирани и лизирани във вода посредством процедурата на замразяване - размразяване.

7. Изследване на въздействието на различни токсични агенти върху жизнеспособност на дрождеви пролифериращи, Q и NQ

7.1. Определяне на LD₅₀ на използваните токсични агенти

Проведен е колониен анализ като скринингов метод за определяне на диапазона от концентрации на изпитваните токсични вещества – H₂O₂, менадион, ибупрофен и зеоцин и избор на LD₅₀ за всяко съединение. За целта дрождевият щам е култивиран на хранителна среда АСД, към която, след охлаждане, е добавян H₂O₂ в крайна концентрация – 5 mM, 10 mM, менадион в крайна концентрация – 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM, 120 µM, зеоцин в крайна концентрация – 50 µg/ml, 75 µg/ml и 100 µg/ml и ибупрофен в крайна концентрация – 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.1 mg/ml и 1.5 mg/ml. Добавянето на токсичните съединения е провеждано непосредствено преди залагане на експеримента, като са приготвяни по две петрита от всяка изпитвана концентрация и е работено успоредно с клетки в логаритмична фаза и G₀ състояние. Клетъчните суспензии, използвани в експеримента, са с оптична плътност OD₅₄₀ = 1.0 (10⁵ - 10⁶ кл/мл). В стерилни епендорф епруветки са изготвяни десетократни разреждания на така получената дрождева суспензия (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴). От всяко разреждане са накапвани по 5 µl върху твърда среда, съдържаща съответния токсичен агент. Петритата са инкубирани в термостат при температура 28°C за 48h, след което са отчитани резултатите.

7.2. Определяне клетъчната жизнеспособност на дрождеви пролифериращи, Q и NQ клетки след въздействие с токсични агенти

За определяне токсичният ефект на избраните ксенобиотици (H_2O_2 , менадион, зеоцин и ибупрофен) върху жизнеспособността на клетки в логаритмична, Q и NQ фаза на растеж, биомаса с $\text{OD}_{540}=1.0$ (10^5 - 10^6 кл/мл) е третирана със съответните разтвори на токсичния агент отговарящи на определената LD_{50} доза: H_2O_2 (5 mM), менадион (100 μM), зеоцин (50 $\mu\text{g/ml}$) и ибупрофен (1.1 mg/ml). След инкубация за 1 час на стайна температура, клетките са промити със стерилна дестилирана вода и са приготвени десетократни падащи разреждания, които са посяти на АСД. Процентът на преживели клетки е определен въз основа на формираните единични колонии (CFU/ml). Като контрола са използвани нетретирани клетки от логаритмична, Q и NQ фаза, посяти на АСД и инкубирани паралелно с третираните клетки.

8. Влияние на физични фактори върху преживяемостта на пролифериращи, Q и NQ клетки

8.1. Оценка влиянието на температурен стрес

За определяне ефекта, който оказват екстремните стойности на температурата върху жизнеспособността на клетки в логаритмична, Q и NQ фаза, клетъчна суспензия с $\text{OD}_{540}=1.0$ е инкубирана за 20 мин. при различни температури: -5°C , 4°C , 30°C , 50°C и 70°C . След изтичане на инкубацията, пробите са охлаждени на лед и са изготвените десетократни падащи разреждания, които са посявани на АСД. Процентът на преживели клетки е определен въз основа на формираните единични колонии (CFU/ml). Като контрола са използвани нетретирани клетки от трите клетъчни популации, посяти на АСД и инкубирани едновременно с третираните клетки.

8.2. Оценка влиянието на алкален и киселинен стрес

Жизнеспособността на трите вида клетки е оценена след прилагане на алкален и киселинен стрес с продължителност 30 и 60 мин. За целта са получени клетъчни суспензии с $\text{OD}_{540}=1.0$ в 0,2M глицин (pH 2.0) и в 0,1M TRIS (pH 10). Проведена е последваща инкубация за 30 и 60 min на стайна температура, след което клетките са промити със стерилна вода и са приготвени десетократни падащи разреждания, които са

посяти на АСД. Процентът на преживели клетки е определен въз основа на формираните единични колонии (CFU/ml). Като контрола са използвани нетретираните клетки от логаритмична, Q и NQ фаза, посяти на АСД и култивирани успоредно с третираните клетки.

8.3. Оценка въздействието на хиперосмотичен стрес

Жизнеспособността на клетки в логаритмична фаза, Q и NQ състояние е оценена след прилагане на осмотичен стрес с времетраене 20 минути. За целта трите вида клетки са суспендирани до $OD_{540}=1.0$ в 0.4 М и 0.7 М разтвор на натриев хлорид, след което са инкубирани за 20 мин. на стайна температура. Другият вид хиперосмотичен стрес, приложен върху трите клетъчни популации с $OD_{540}=1.0$, е третиране с 30 %, 50 % и 70 % захароза и 40 %, 60 % и 87 % глицерол, съответно за 1, 2, 3, 4 часа. След инкубацията клетките са промити със стерилна вода и са приготвени десетократни падащи разреждания, които са посяти на АСД. Процентът на преживели клетки е определен въз основа на формираните единични колонии (CFU/ml). Като контрола са използвани нетретираните логаритмични, Q и NQ клетки, посяти на АСД и инкубирани паралелно с третираните клетки.

8.4. Оценка въздействието на хипоосмотичен стрес

Жизнеспособността на клетки в логаритмична, Q и NQ фаза е оценена след прилагане на хипоосмотичен шок с времетраене 1, 2, 3, 4, 24 и 48 часа. За целта трите клетъчни суспензии с $OD_{540}=1.0$ са ресуспендирани в стерилна вода и инкубирани за съответното време, след което са приготвени десетократни падащи разреждания, от които е посято на АСД. Процентът преживели клетки е определен спрямо формираните единични колонии (CFU/ml). Като контрола са използвани трите клетъчни популации, които не са подложени на хипоосмотичен стрес.

8.5. Оценка въздействието на УВ-лъчение

Преживяемостта на клетки в пролифериращо, Q и NQ състояние е оценена след въздействие с UV_{254} . За целта, трите клетъчни популации с $OD_{540}=1.0$ са облъчвани за 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60 минути, след което са приготвени десетократни падащи разреждания е направена повърхностна посевка на АСД. Определен е процентът на преживелите, спрямо контролните, необлъчени клетъчни суспензии (CFU/ml).

8.6. Оценка въздействието на гравитационната сила

Жизнеността на клетки в логаритмична, Q и NQ фаза е определена след прилагане на гравитационна сила върху трите клетъчни популации с $OD_{540} = 1.0$ с различна големина: 3000g, 30000g и 50000g. Клетките са центрофугирани за 1, 2, 3, 4 часа, след което са приготвени десетократни падащи разреждания, които са посяти на АСД с последващо отчитане на процента преживели клетки спрямо успоредно посята контрола (CFU/ml).

8.7. Оценка въздействието на механична сила

Преживяемостта на клетки в логаритмично, Q и NQ състояние е определена след прилагане на механична сила с помощта на хомогенизатор Bullet Blender, като клетките са третирани със стъклени перли ($425 \div 600 \mu m$) в съотношение 1 : 2 : 1 (0,3 g биомаса + 0,6 ml буфер + 0,3 g перли) за определено време – 1, 2, 3, 4, 5, 6 минути. След изтичане на времето за дезинтеграция са приготвени десетократни падащи разреждания, които успоредно с контролните (нетретирани) клетки, са посяти на АСД с последващо отчитане на процента преживели клетки.

8.8. Оценка въздействието на ултразвук

Жизнеността на клетки в пролифериращо, Q и NQ състояние е определена след прилагане на ултразвук с апарат Sonifier® Cell Disruptor (Branson, САЩ), модел SLPe, оборудван с накрайник с диаметър 0,125 инча (3,175mm). Трите клетъчни популации с $OD_{540} = 1.0$ са озвучавани за определено време (1, 3, 5, 10, 15 минути), при амплитуда 40% и честота 40 kHz. След изтичане на времето за инкубиране са приготвени десетократни падащи разреждания, които заедно с контролните клетки, са посяти на АСД с последващо отчитане на процента преживяемост.

9. Биохимични анализи

9.1. Определяне на концентрацията на белтък по метода на Lowry et al., (1951).

Методът се основава на взаимодействието на Cu^{2+} йони с ароматните аминокиселини – тирозин и триптофан. Полученото комплексно съединение дава синьо оцветяване с реактив на Фолин. За целта бяха използвани следните реактиви:

Реактив „А“ – 2% разтвор на Na_2CO_3 в 0,1 N NaOH

Реактив „Б“ – 1% разтвор на $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

Реактив „В“ – 2% разтвор на калиево-натриев тартарат

Реактив на Фолин - добавя се след предварителното му разреждане в отношение 1:1 с дестилирана вода, непосредствено преди работа.

Реактив „С“ – приготвя се непосредствено преди работа със следния състав: 100 ml Реактив „А“, 1 ml Реактив „Б“ и 1 ml Реактив „В“.

Ход на определяне: в епендорф епруветки се отпипетират подходящо разреден 0,2 ml безклетъчен екстракт и към него се прибавя 1 ml Реактив „С“. Следва инкубиране 10 мин. на стайна температура, след което се добавя 0,1 ml реактив на Фолин. Пробите престояват 30 мин. на стайна температура, след което се измерват спектрофотометрично при 750 nm в 0,5 cm³ кювети, срещу паралелно обработена контрола.

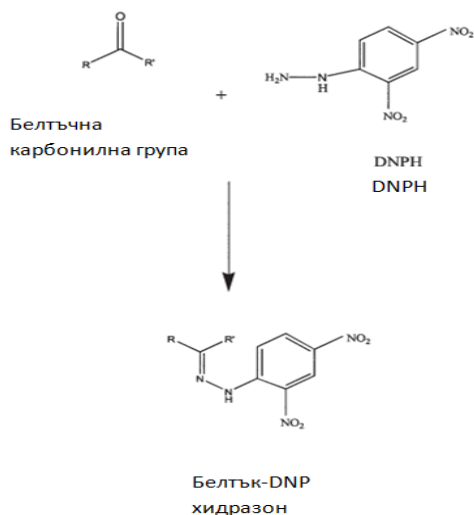
Концентрацията на вътреклетъчния белтък беше отчитана по стандартна крива, построена с говежди албумин.

Изчисления:

$$\text{mg/ml} = \frac{E \times \text{разреждане}}{\text{tg } \alpha \times 1000}$$

9.2. Определяне на карбонилни групи в белтъците по метод на Mesquita et al., (2014)

Окислителните модификации в белтъчните молекули се детектират посредством количествено определяне на образуваните в тях карбонилни групи, вследствие индуциран окислителен стрес в клетката. Съединението 2,4 – динитрофенилхидразин (DNPH) взаимодейства с карбонилните групи, в резултат на което се образуват белтъчни-DNP хидразони. Те могат да бъдат детектирани спектрофотометрично при 450 nm.



Фигура 14: Схематично представяне на принципа на действие на метода при определяне на карбонилни групи в белтъците (Mesquita et al., 2014)

Приготвят се следните реактиви:

10 mM DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine)

6 M NaOH

Ход на определяне: Към 400 μl проба беше добавян 10 mM DNPH (400 μl) и реакционната смес беше инкубирана за 10 мин. на стайна температура. Следваше добавяне на 200 μl 6 M NaOH и отново инкубация за 10 мин. Екстинкцията на пробата беше измервана при 450 nm в кювети от 0.5 cm^3 срещу паралелно обработена контрола.

Изчисления:

$$\text{mol/mg} = \frac{E \times V}{M_{\text{DNPH}} \times V_1 \times \text{белтък}} \times \text{разреждане},$$

където:

V- обем на реакционната смес (1 ml)

V_1 - обем на пробата (0,4 ml)

M_{DNPH} – 22 300 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, моларен екстинкционен коефициент на DNPH

9.3. Определяне концентрацията на ROS в клетката чрез NBT метод

Методът се основава на взаимодействието на супероксидни радикали с нитроблутетразолиев хлорид (NBT). Генерираните супероксидни радикали редуцират NBT, при което се получава синьо оцветено съединение – формазан. Концентрацията му беше определяна спектрофотометрично при 560 nm, след инкубация на реакционната смес при 25°C за 30 мин.

Реактиви:

1. 1 mM разтвор на NBT (нитроблутетразолиев хлорид)
2. PBS буфер, pH-7,8

Ход на определяне:

Проба	Контрола
0.1 ml NBT	0.1 ml NBT
1.8 ml PBS	1.8 ml PBS
0.1 ml проба	0.1 ml дестилирана вода

Изчисления:

$$\text{ROS, mol/ml} = \frac{E \times V}{M_{\text{NBT}} \times V_1}$$

където:

V- обем на реакционната смес (2 ml)

V₁ - обем на пробата (0,1 ml)

M_{NBT} – 15 000 M⁻¹cm⁻¹, моларен екстинкционен коефициент на NBT

9.4. Определяне концентрацията на вътреклетъчен редуциран и окислен глутатион по метода на Tietze (1969) и модифициран от Zhang (2000).

Редуцираният глутатион GSH се окислява от 5,5'-дитиобис-(2-нитробеноена киселина) (DTNB), в резултат на което преминава в окислено състояние GSSG и се образува 5-тио-2-нитробензоена киселина (TNB). GSSG се редуцира отново до GSH под действие на ензима глутатион редуктаза, в присъствие на НАДФН, като източник на редуциращи еквиваленти. Количеството образуван TNB е пропорционално на количеството глутатион, присъстващ в пробата, поради което спектрофотометрично се измерва концентрацията на TNB.

Реактиви:

1. Калиево-фосфатен буфер (КФБ) – 1 М, рН 7,5
2. Глутатион редуктаза (0,024 ml глут. редук. + 0,976 ml дестилирана вода)
3. НАДФН (2,4 mg + 1 ml дестилирана вода)
4. 10 mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) в метанол

Ход на определяне:

Проба

0,1 мл КФБ
0,1 мл проба
0,05 мл глутатион редуктаза
0,1 мл НАДФН
0,550 мл дестилирана вода

Контрола

0,1 мл КФБ
0,1 ml проба
0,05 глутатион редуктаза
0,1 мл НАДФН
0,550 мл дестилирана вода

Реакционните смеси бяха инкубирани на стайна температура за 30 мин., след което бяха добавяни:

- 0,1 мл DTNB към пробата
- 0,1 мл дестилирана вода към контролата

След прибавяне на последните реактиви, пробата и контролата бяха инкубирани 2 мин. на стайна температура. Абсорбцията на пробите беше измервана при 412 nm срещу съответната контрола.

Количеството общ глутатион mol / mg в пробата беше изчислявано по следната формулата:

Изчисления:

$$\text{GSH, mol/mg} = \frac{E \times V}{M_{\text{ETNB}} \times V_1 \times \text{белтък}} \times \text{разреждането},$$

където:

V- обем на реакционната смес

V₁ - обем на пробата

M_{ETNB} – 14 150 M⁻¹cm⁻¹, моларен екстинкционен коефициент на TNB

9.5. Прекисно окисление на липиди по метода на Hodges et al., (1999).

Взаимодействието на ROS с липидния бислой в мембраната води до окислението на полиненаситените липидни молекули и образуването на малоналдеhid (MDA), който се натрупва в клетката и служи като маркер за отчитане нивата на оксидативен стрес. MDA е силно реактивоспособно токсично съединение, което формира ковалентно свързани продукти с различни протеини. Методът на Hodges et al., (1999) се базира на измерване на концентрацията на комплекса малоналдеhid – TBA₂, който се получава при взаимодействието между тиобарбитуровата киселина (TBA) и получения малоналдеhid.

Реактиви:

Реактив А (– TBA):

ТХО 20%

Бутилхидротолуен 0,01%

Реактив Б (+TBA):

ТХО 20%

Бутилхидротолуен 0,01%

0,65% TBA

Ход на определяне:

В стъклени епруветки се отпипетират :

Проба 1

0,7 ml проба

0,7 ml Реактив А (– TBA)

Контрол 1

0,7 ml д H₂O

0,7 ml Реактив А (– TBA)

Проба 2

0,7 ml проба

0,7 ml Реактив Б (+ТВА)

Контрол 2

0,7 ml д H₂O

0,7 ml Реактив Б (+ТВА)

Пробите са хомогенизирани добре и инкубирани на 95°C за 25 мин. След охлаждане са центрофугирани на 3000 об/мин за 10 мин. Екстинкцията на отделената супернатанта е измервана на спектрофотометър при 440 nm, 532 nm, 600 nm, в кювети от 1 cm³

Изчисления:

Еквивалентите малоналдеhid (МДА) се изчисляват по формулата:

$$1) (Abs_{532} + TBA - Abs_{600} + TBA) - (Abs_{532} - TBA - Abs_{600} - TBA) = A$$

$$2) (Abs_{440} + TBA - Abs_{600} + TBA) \times 0,0571 = B$$

$$3) \text{ еквив. МДА (nmol mol}^{-1}) = (\{ A - B \} / 157000) \times 10^6$$

157000 – моларен екстинкционен коефициент на МДА

0,0571 – моларна абсорбция на 1⁻¹⁰ mM захароза изчислена за 440 nm и 532 nm.

10. Определяне генотоксичен ефект на зеоцин и менадион

Изследването на получените двойно верижни разриви в ДНК на трите клетъчни популации (Log, Q и NQ) на щам *S. cerevisiae* BY4741 е осъществено с помощта на електрофореза в постоянно електрическо поле (CFGE) съгласно процедурата на Todorova et al., (2015) и Todorova et al., (2019). Логаритмични, Q и NQ клетъчни суспензии са третирани с различни концентрации на менадион (100 µM) и зеоцин (100, 200 and 300 µg/ml) за 1 минута върху лед. Клетките са центрофугирани и се включват в агарозни блокчета с концентрация 1×10⁶ клетки/ml. След това агарозните блокчета са поставени в 1 ml лизиращ разтвор (pH = 8), съдържащ протеиназа К при крайна концентрация 1 mg/ml. След протичане на клетъчен лизис, блокчетата са промити с Tris-EDTA (pH = 7.5) и са поставени в серия от ямки в агарозен гел. Условията на електрофорезата са: 40 часа при постоянно поле от 0,6 V/cm (20 V). Нивата на индуцирани двойноверижни скъсвания (DSBs), представени като фракция от освободена ДНК (FDR) от ямките, са количествено определени чрез детекция на флуоресценцията на етидиев бромид с помощта на Gene Tool Analyzer G : Box Syngene. За да се оцени капацитетът за възстановяване на клетъчните популации, е дадено време за възстановяване от 30 и 60 минути след третиране със съответните токсични агенти. Капацитетът за репарация се изразява като

отношението на индуцираните от токсичния агент DBS към тези, които са измерени след 30 и 60 минути възстановително време.

11. Флуоресцентна микроскопия

Флуоресцентната микроскопия предоставя прост метод за количествено определяне на клетките и изследване на тяхната морфология. Техниката разчита на феномена, че флуоресцентните молекули абсорбират светлина с една дължина на вълната и я излъчват при друга, по-дълга дължина на вълната (Rost., 1995). Обектът е наблюдаван през филтър, който абсорбира късовълновата светлина, която се използва за осветяване и предава флуоресценцията, която впоследствие се вижда ярка на тъмен фон. Тези флуоресцентни съставки на пробата могат да се видят дори в изключително малки концентрации. Във връзка с цялостното характеризиране на токсичния ефект на зеоцина е проследена фрагментацията на митохондриална ДНК и натрупването на ROS в клетъчните митохондрии посредством използването на специфични флуоресцентни багрила с последваща микроскопия.

11.1. Анализ на степента на фрагментация на митохондриална ДНК

Изолираната митохондриална ДНК е оцветена с флуоресцентното багрило DAPI. Към 1 ml клетъчна суспензия е добавен разтвор на DAPI с крайна концентрация 1 µg/ml. Следва инкубация за 10 минути на стайна температура. Флуоресценцията е отчетена с помощта на флуоресцентен микроскоп Leica, модел DM6 B с подходящ оптичен филтър.

11.2. Анализ на нивото на ROS в дрождевите митохондрии

Оцветяването на митохондриалните структури с Rhodamine 123 е осъществявано по следната процедура: към 1 ml клетъчна суспензия е добавен етанолов разтвор на Rhodamine 123 с крайна концентрация 5 µg/ml. Следва инкубация за 2 часа на тъмно на стайна температура, след което оцветените клетки са наблюдавани с родамин оптичен филтър.

12. Биоинформатични методи

12.1. Секвенционен подбор

Секвенциите на изследваните дрождеви гени и белтъци бяха взети от Saccharomyces Genome Database (SGD: <http://www.yeastgenome.org>).

Секвенциите на изследваните човешки гени и белтъци бяха взети от базата данни Human Genome Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>).

12.2. Сравняване на множество секвенции чрез ClustalW

Сравняването на изследваните секвенции се осъществява посредством програмата за прогресивно сравняване на множество секвенции - ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Тази програма се базира на филогенетичен анализ. Първоначално се генерира матрица, която изчислява разстоянията между всички двойки секвенции, които ще бъдат сравнявани и се създава помощно филогенетично дърво. След това всяка една от двойките секвенции с най-висока степен на сходство от най-отдалечените клонове на филогенетичното дърво се сравняват една спрямо друга. Всяко ново сравняване се анализира с цел да се изгради секвенционен профил. Накрая различните профили се сравняват един с друг, докато се получи крайното подравняване. Във всяко подравняване на сравняваните секвенции те са подредени една над друга, така че аминокиселинните остатъци, които съвпадат са подравнени. Напълно идентичните резултати се отбелязват с „*“, подобните с „:“, близките с „.“, а там където има пропуски в аминокиселинната подредба на единия белтък спрямо другия се отбелязва с „-“.

12.3. Вътреклетъчна локализация на изследваните ензими при щам *S. cerevisiae* BY4741.

Вътреклетъчната компартиментализация на изучените гени беше анализирана с PSORT II Prediction software (<https://psort.hgc.jp/form2.html>). Използвани са и данните за субклетъчното разпределение на изследваните белтъци при *S. cerevisiae*,. налични в Saccharomyces Genome Database (SGD: <http://www.yeastgenome.org>).

12.3.1. Разпознаване на митохондриални белтъци

Белтъците, транспортирани до митохондриите, притежават митохондриален насочващ сигнал в N- края на своята молекула. Някои протеини разполагат с вътрешни сигнали, които се разпознават от цитозолни фактори (MSF). Разпознаването на митохондриалните насочващи сигнали от PSORT II се осъществява посредством метода за разпознаване на митохондриални белтъци чрез Гавел-консенсусните последователности, разположени в близост до областта на срязване (Gavel and von Heijne., 1990).

12.3.2. Разпознаване на ядрени белтъци

Установено е, че белтъци без сигнали за ядрена локализация (nuclear localization signal - NLS), могат да навлязат в ядрото посредством котранспорт с протеини, в които тези сигнали са представени. Сигналите за ядрена локализация се класифицират в три категории (Hicks and Raikhel., 1995). Класическият сигнал от първи тип се детектира посредством моделна последователност, съставена от четири основни К или R остатъка (pat4) или три основни К или R остатъка (Н или Р). Друга моделна последователност е започващата с Р и последвана от три основни остатъка, съдържащи 3 К/Р (pat7). Ядреният сигнал от втори тип е бипартид, доказан от Robbins et al., (1991) в клетки от *Xenopus*. Бипартидът се състои от два основни аминокиселинни остатъка: спейсърен участък от 10 аминокиселинни остатъка, последван от основен регион от 3 и не повече от пет основни аминокиселинни остатъка. Последната разновидност на сигналите за ядрена локализация е откритият в N- терминалния участък Mat alpha2 сигнал, който все още не е добра изучен.

PSORT II отчита, че при наличие на повече от 20% на аминокиселинни остатъци с основен характер (К и/или R), вероятността анализираният белтък да се насочи в ядрото е по – голяма, отколкото той да е локализиран в цитоплазмата. Посредством методът NNCN се калкулира вероятността за ядрена локализация на протеините (Reinhardt and Hubbard., 1998).

12.3.3. Разпознаване на пероксизомални белтъци

Открити са редица сигнали, спомагащи за насочването на белтъците към пероксизомите (McNew and Goodman., 1996). Добре изучени са два сигнала. насочващи протеините към пероксизомалния матрикс (peroxisomal-matrix targeting sequences - PTSs). Пероксизомалният насочващ сигнал от първи тип - PTS1 представлява трипептид (S/A/C)(K/R/H)L в С–края или т. нар. SKL–мотив. Пероксизомалният насочващ сигнал от втори тип – PTS2, е локализиран в N- терминалния участък и представлява консенсусна последователност (R/K)(L/I)xxxxx(H/Q).

12.3.4. Разпознаване на белтъци, локализирани в ендоплазматичния ретикулум (ЕПР)

Сигналът за локализация на белтъците в ЕПР е локализираната в С–края KDEL последователност. В допълнение към него може да е наличен и сигнал за срязване в N-

терминалния участък. Друг сигнал, използван от PSORT II за предвиждане на локализация в ендоплазматичния ретикулум, е дилизинов KKXX мотив, разположен в близост до C – края, както и на XXRR мотив в близост до N- терминалния участък.

12.3.5. Разпознаване на белтъци, локализиращи се в лизозомите и вакуолите

Локализацията на белтъци в лизозомите при бозайници се обуславя от посттранслационна модификация, добавяща манозо-6-фосфат. Известно е, че съществува и манозо-независим път за лизозомално насочване. Локализацията на белтъци в дрождевите вакуоли не изисква посттранслационна модификация, добавяща манозо-6-фосфат. Анализи на дрождеви протеини установяват наличие на сигнални про-пептиди в N-терминалния участък, получени след изрязване на пресигнали. Търсеният мотив от PSORT II е (T/I/K)LP(L/K/I).

13. Статистически анализ на данните

Използваните данни представляват средните стойности със стандартна грешка ($\pm$ SEM) от три независими експеримента. Статистическият анализ е извършен с помощта на софтуера MICROSOFT OFFICE 365 EXCEL 2020. Разликите в средните стойности са анализирани с помощта на t теста на Стюdent с независими измервания. Разликите се считат за статистически значими при ниво $p < 0,05$.

V. Резултати и обсъждане

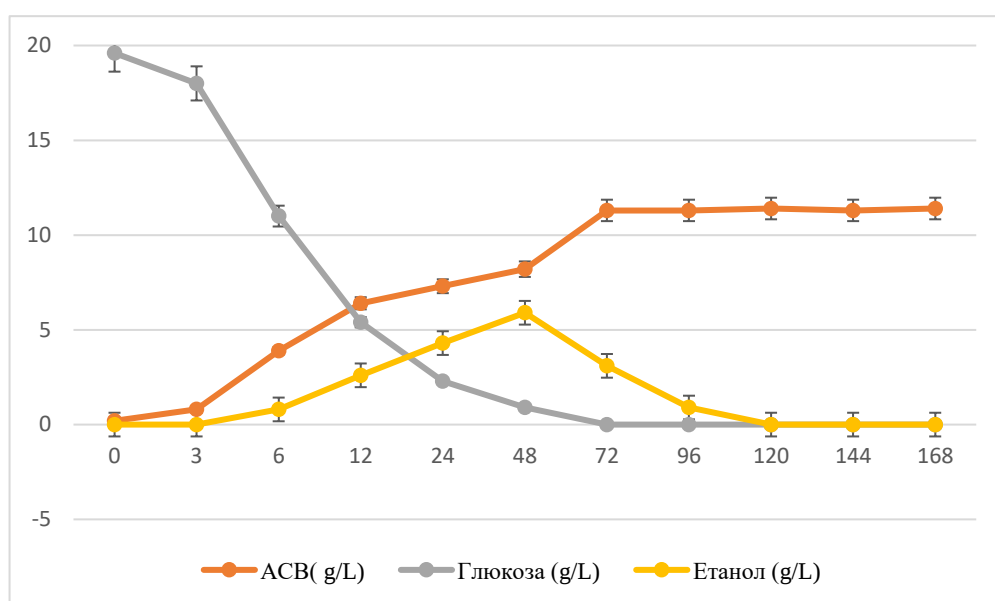
Ежегодното замърсяване на околната среда със синтетични химикали и изпитването на нови лекарства налага необходимостта от създаване на удобна моделна система, която да служи за оценка на екологичната и лекарствена токсичност след експозиция с екзогенни химични съединения. Клетъчният покой блокира процеса на клетъчна диференциация и корелира с устойчивостта към химиотерапевтични противоракови средства и ксенобиотици при възрастни стволови клетки и вероятно туморни стволови клетки. Тъй като много от процесите при човешките и дрождеви организми са еволюционно запазени, характеризирането на генните и метаболитни пътища, които са в основата на клетъчния отговор към токсични съединения при дрождеви клетки в покой, би допринесло за по-доброто разбиране на тези механизми при висшите еукариоти.

В природата дивите щамове дрожди *S. cerevisiae* съществуват по-скоро в диплоидно, отколкото в хаплоидно или полиплоидно състояние. За разлика от това, в лабораторни условия те лесно пролиферират като хаплоиди, диплоиди или полиплоиди. Подобно на диплоидните щамове, хаплоидите претърпяват същите диференциращи промени в жизнения си цикъл като например превключване от пъпкуване към хифиален растеж, или излизане от G1 клетъчен цикъл и навлизане в състояние на покой. Предимството от използването им е, че могат да бъдат по-лесни за работа, имайки предвид, че делецията само по един алел, води до елиминиране на даден генен продукт. Във връзка с това, в нашите експерименти възможностите за получаване на популация от G₀ клетки, беше изследвано при хаплоиден *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 от колекцията на EUROSCARF Frankfurt. Този дрождеви щам е обект на множество изследвания на различни автори и неговото изучаване предоставя допълнителна възможност за значимо сравняване на получените данни с тези, налични в научната литература.

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 въглероден източник от средата. Проведеният експеримент се основаваше на предположението, че лимитацията по

основни хранителни вещества може да провокира отключването на специализирана диференцираща програма, която да доведе до натрупването на непролифериращи клетки, известни като G_0 клетки или Q клетки, както и до появата на смесена популация от пролиферативни компетентни, апоптозни и „остаряващи“ клетки (NQ клетки) (Palkova et al., 2014; Sagot and Laporte, 2019). В процеса на култивиране бе осъществен и аналитичен контрол чрез проследяване концентрациите на основните въглеродни източници в средата (Фиг. 15).

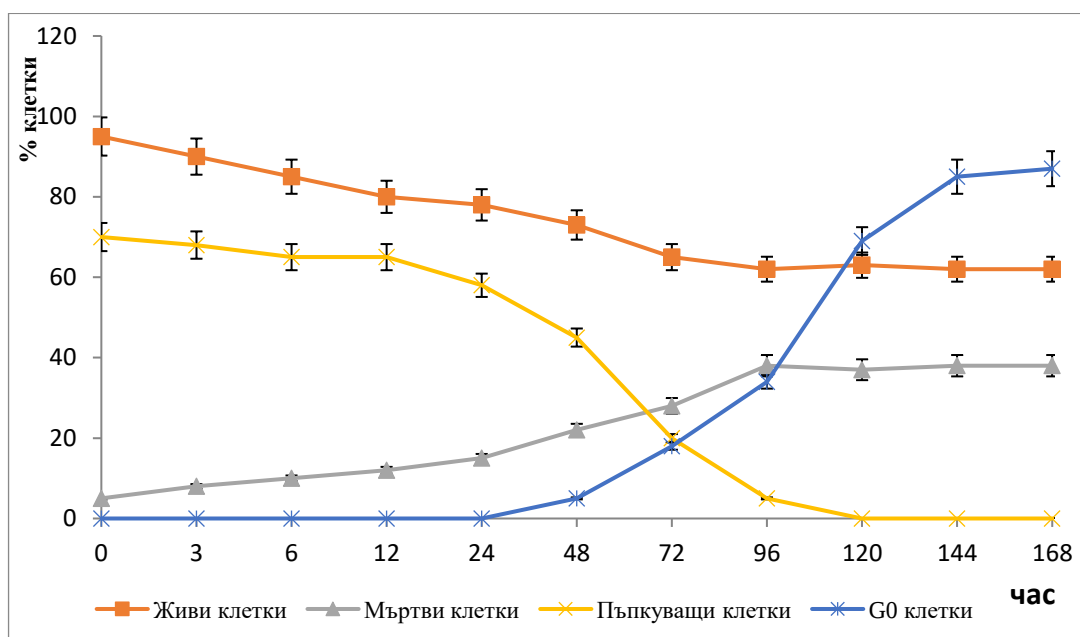


Фигура 15: Динамика на растеж и усвояване на въглероден източник при периодично култивиране на хаплоиден щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

Получените резултати показаха усилено метаболизиране на глюкозата в експоненциална фаза на растеж, в периода между 3^{тия} и 24^{тия} час (Фиг 15.). Удължената логаритмична фаза вероятно се дължи на мутантния фенотип на изследвания щам и неговата ауксотрофност по отношение на редица растежни фактори (раздел Материали и методи). След изчерпване на глюкозата в средата в периода между 24^{ия} и 48^{ия} 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 те навлизат в стационарна фаза или т.нар. „състояние на покой“ (Gray et al., 2004). При клетките в стационарна фаза се наблюдава спиране на клетъчния цикъл и възникване на

физиологични, биохимични и морфологични промени, които от своя страна са свързани с акумулиране на резервни карбохидрати и придобиване на термоустойчивост (Werner-Washburne et al., 1993).

Клетъчното стареене се свързва със засиленото понижаване на клетъчната и организмовата функция с течение на времето и представлява основен рисков фактор за податливостта към заболявания при човек. Наблюдава се голямо съответствие между клетъчните пътища, които влияят на стареенето и тези, свързани с рак, невродегенерация и сърдечно-съдови заболявания, както и метаболитен синдром (de Cabo et al., 2014). Ето защо, при избора на експериментален модел за идентифициране на препарати против стареене, високата степен на еволюционно сходство, е от решаващо значение. При дрождите много метаболитни пътища, които са от значение за стареенето и възникване на заболявания при хората, са добре запазени, включително сигнали за наличие на хранителни вещества, регулиране на клетъчния цикъл, механизми за репарация на ДНК, митохондриална хомеостаза, липостаза, нагъване и секреция на протеини, протеостаза, реакция на стрес и регулирана клетъчна смърт (Fabrizio and Longo., 2003; Tenreiro and Outeiro., 2010; Eisenberg and Büttner., 2014; Lasserre et al., 2015; Janssens and Veenhoff., 2016; Knorre et al., 2016; Bilinski et al., 2017; Postnikoff et al., 2017; Carmona- Gutierrez et al., 2018). Около 90 % от близо 6000 гена на дрождите вече са характеризирани и приблизително 30 % от генома на дрождите има сходни последователности с този на човека (Stefanini et al., 2013). Във връзка с това, следваща стъпка в проведените изследвания бе проследяване на клетъчната диференциация и стареене при хаплоидния 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. 16).



Фигура 16: 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. Наблюдава се леко повишаване на процента мъртви клетки след 48^{мия} час и значително повишаване на процента клетки, навлезли в G₀ състояние, като концентрацията им експоненциално се увеличава след навлизане в същинска стационарна фаза (120^{тия} час от проведеното култивиране).

В резултат на проведените изследвания може да се заключи, че при този дрождеви щам в периода между 48^{ия} и 120^{ия} час на култивиране, след пълното изчерпване на въглеродния източник в средата, 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) (Palkova et al., 2013; 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 въздействия 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

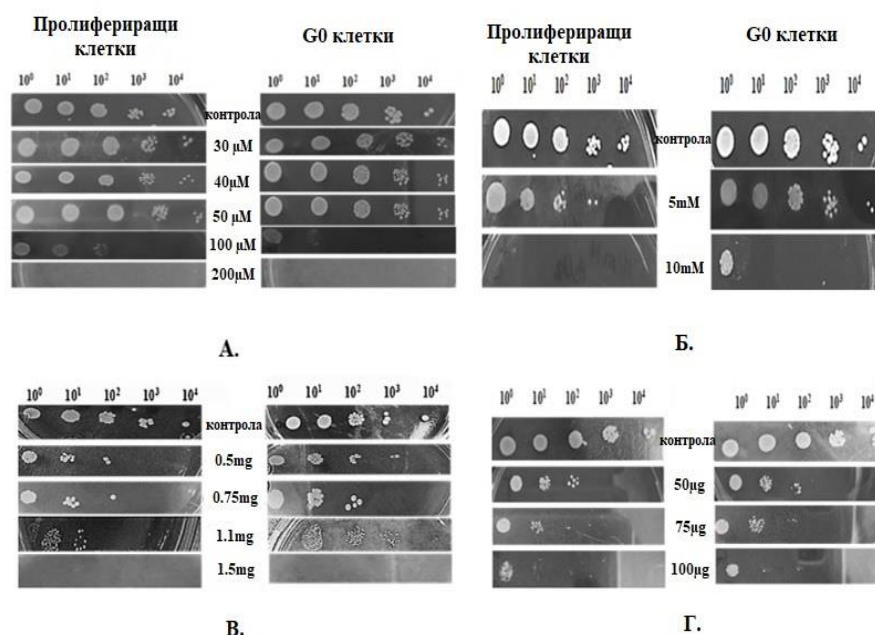
2.1. Оценка на токсикологичното въздействие на химични агенти

Приложимостта на дрождите *S. cerevisiae* в изследванията на токсикологичното действие на различни химични агенти е оценена чрез използването на набор от моделни съединения, намиращи широко приложение в медицинската и научноизследователската практика - водороден пероксид, менадион, ибупрофен и зеонин. Ефектът на тези съединения върху клетъчната преживяемост бе проследен върху три типа дрождеви култури - пролифериращи, Q и NQ. Токсикологичното въздействие на тези агенти бе оценено на базата на три ключови показателя: клетъчна преживяемост, цитотоксичност и генотоксичност.

2.1.1. Преживяемост

Определянето на клетъчната преживяемост е един от най-често използваните методи при анализ на цито- или генотоксичност след въздействие с различни видове химични, физични или екзогенни фактори на околната среда. Анализът на този параметър е много важен и за промишлени процеси, при които се използват микроорганизми (Nikolova et al., 2000–2002). Количествената оценка на този показател при дадени условия е сред най-широко използваните техники в микробиологията (Xu et al., 2014).

Във връзка с това, 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 доза, при която се наблюдава частично инхибиране на растежа (LD_{50}) (Фиг. 17). За реализиране на тази цел бе проведен колониен анализ на хранителна среда с добавени съответно менадион, водороден пероксид, ибупрофен и зеонин в различни концентрации.



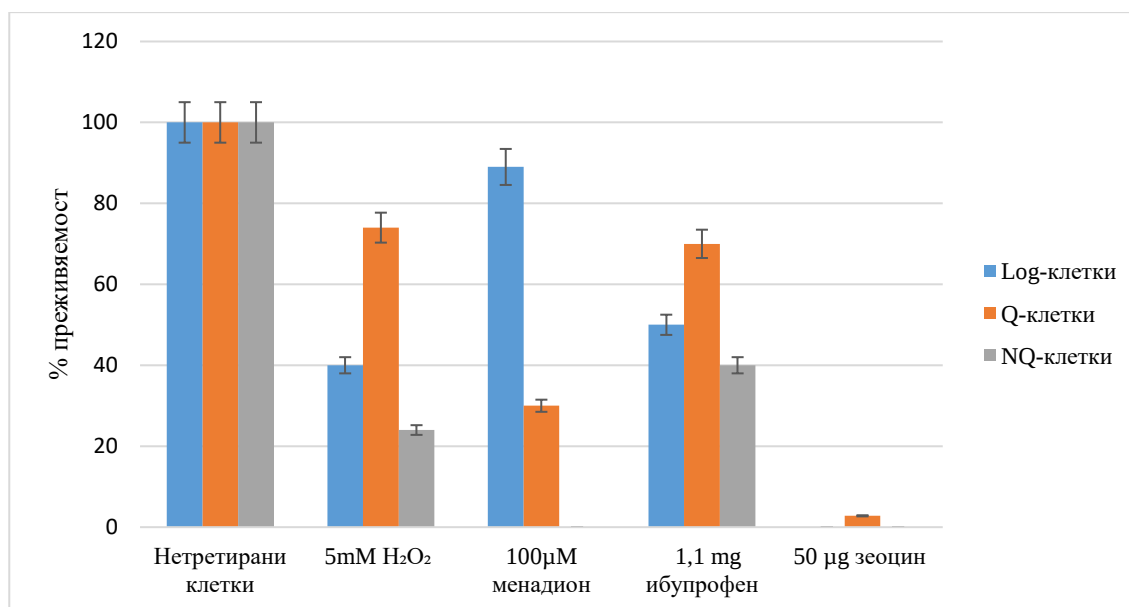
Фигура 17: Колониен анализ за оценка на устойчивост на дрождеви клетки към екзогенни токсични агенти – менадион (А.) H_2O_2 (Б.); ибупрофен (В.) и зеоцин (Г.). Контрола – среда без добавен токсичен агент

В резултат на третирането на клетките с различни концентрации на H_2O_2 , менадион, ибупрофен и зеоцин, бяха определени LD_{50} за четирите съединения, както следва: 100 μM менадион, 5 mM за водороден пероксид, 1.1 mg/ml за ибупрофен и 50 $\mu g/ml$ за зеоцин. В тези концентрации изпитваните лекарствени съединения инхибираха клетъчния растеж между 40 и 60% и бяха приети като пределни концентрации, при които клетките запазват все още способността си да растат.

Беше установено, че добавен към средата в концентрация 100 μM , менадионът оказва по-силен токсичен ефект върху клетките в G_0 състояние, като бе отчетено 60 % инхибиране на растежа. За разлика от тях, при пролифериращите клетки беше наблюдавано само 40 % инхибиране на растежа. Проведеният анализ с екзогенен водороден пероксид показва, че обратно на резултатите, наблюдавани при третиране с менадион, G_0 клетките на щам *S. cerevisiae* BY4741 се характеризират с по-висока устойчивост към водороден пероксид и при 5 mM беше наблюдавано незначително инхибиране на растежа им. При логаритмично растящите клетки обаче, беше отчетено 40 % инхибиране на клетъчния растеж при тази изпитвана концентрация. Ибупрофен, добавен към средата в концентрация 1,1 mg/ml, оказваше по-силен токсичен ефект върху пролифериращите клетки, което е видно от по-слабия растеж (60 % инхибиране

на растежа). Видимо по-голяма устойчивост показаха G_0 клетките, като при тях беше отчетено 40 % инхибиране на клетъчния растеж. При анализа със зеоцин и двата типа дрождеви клетки показаха сравнително еднаква устойчивост към токсичното му влияние и при трите приложени концентрации.

Следваща стъпка в проведените изследвания беше да се определи процента на преживели клетки след прилагане на определените LD_{50} дози от 4-те тествани токсични препарата след проведено третиране за 1 час на стайна температура (Фиг. 18).



Фигура 18: Преживяемост на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с химични агенти

От данните, представени на графиката става ясно, че от трите клетъчни популации, най-висок процент преживяемост след третиране с менадион, е наблюдаван при клетките в експоненциална фаза на растеж (89 %). Установено е, че клетъчният отговор към менадион е свързан с индуцирана синтеза на голям брой белтъци, част от които са специфични и се синтезират само при въздействие с този токсичен агент (Flattery-O'Brie et al., 1993). По-високата устойчивост на логаритмично растящите клетки, вероятно е свързана с повишената им метаболитна активност и по-висока скорост на белтъчна синтеза, което от своя страна осигурява по-добра адаптация към действието на менадион. Притивоположно, при екзогенно добавяне на водороден пероксид бе отчетена най-висока преживяемост при Q клетките (74%), докато при тези в логаритмична фаза жизнеспособността спада до 2 пъти след третиране с този токсичен агент (40%). Същевременно, G_0 клетките показват по-ниска устойчивост към менадион, което корелира с по-ниския процент преживели клетки (30 %). В тази връзка

Rodrigues et al., (2004), изследват токсичността на хиноновите производни към *S. cerevisiae* и установяват, че някои от тях, включително менадионът, упражняват своя токсичен ефект при наличие на кислород в средата. По-силната токсичност в кислородна среда, вероятно отразява способността им да действат като катализатори при генерирането на ROS, което е следствие от редокс-циклизиращата им активност. При клетки в покой е установена по-ниска консумация на енергия и съдържание на АДФ за реакции на фосфорилиране, което може да доведе до увеличаване на вътреклетъчните нива на кислород и едноелектронни кислородни редуктори. Такива условия могат да се появят и при хронологичното стареене на дрождевите клетки, когато те се развиват до късна стационарна фаза. Във връзка с това цитотоксичният механизъм на действие на менадион при G_0 клетките е по-силен и вероятно се дължи на по-слабата метаболитна активност и по-високите нива на кислород в клетките. При NQ клетките се наблюдава 100% потискане на жизнеността след третиране с менадион, докато след излагане на действието на водороден пероксид се наблюдава 24% преживяемост, близо два и три пъти по-ниска от тази, наблюдавана съответно при Log и Q клетките. Така наблюдаваните ефекти от една страна вероятно са в следствие от токсичния механизъм на действие на менадиона и водородния пероксид, а от друга страна съгласно Aragon et al., (2008), след определен период на култивиране, една част от NQ клетките губят способността си да се възпроизвеждат, а друга част претърпяват апоптоза и стават значително по-чувствителни на действието на различни токсични агенти.

Добре известен факт е, че както менадиона, така и H_2O_2 упражняват своето токсично действие посредством генерирането в клетката на оксидативен стрес. Това е процес, който води до появата на повреди в клетъчните мембрани, белтъците, както и в ДНК, което от своя страна може да доведе до индуциране на апоптоза и загуба на жизнеспособност (Costa and Moradas-Ferreira., 2001). Цитотоксичният механизъм на действие на менадиона е свързан с широкото генериране на ROS, като супероксидни радикали, синглетен кислород и водороден пероксид., което обяснява и високо отчетената загуба на жизнеспособност при G_0 клетки, които се характеризират с висока вътреклетъчна концентрация на ROS (Adusumilli et al., 2021). H_2O_2 от друга страна се очертава като основния редокс метаболит, който участва в сигнализирането и редокс регулацията, като е основният и най-разпространен първичен реактивен кислороден вид, образуван в еукариотните клетки като страничен продукт или дори целенасочено, от различни ензимни реакции (Korovila et al., 2017). Този факт обяснява и по-слабият ефект

упражняван от този агент върху клетъчната жизнеспособност на изследвания щам *S. cerevisiae* BY4741.

Допълнително, скорошни проучвания относно ефекта на оксидативния стрес в дрождите *S. cerevisiae* показват, че когато растат аеробно те са чувствителни към милимоларни концентрации на менадион, както и че дрождите могат да придобият резистентност към този медикамент, ако са предварително третирани с ниски концентрации. Адаптацията към менадион се различава от тази към H_2O_2 и се блокира от циклохексимид (Buffinton et al., 1989; Flattery-O'Brien., 1993). Установено е, че предварителното третиране на дрождевите клетки с водороден пероксид може да ги направи чувствителни към действието на менадион. Предполага се, че тази чувствителност се дължи на намаляване нивата на вътреклетъчния глутатион (Jamieson., 1992). Антиоксидантната роля на глутатиона и ролята му за резистентността на *S. cerevisiae* към менадион чрез индукция на *GSH1* гена, кодиращ ензима гама-глутамил-цистеин синтетаза, е доказана в дрожди след третиране с менадион (Stephen et al., 1995).

Последващите анализи бяха насочени върху изучаването на клетъчната жизнеспособност на *S. cerevisiae* BY4741 при третиране с LD_{50} концентрация на ибупрофен и зеоцин. Изборът на ибупрофен бе направен поради няколко причини: това е относително безопасно лекарство, приложимо без рецепта. Второ, ибупрофенът крие малък риск от някои свързани с възрастта патологии. Трето, няма данни, че ибупрофенът участва в процесите на стареене (напр. пътищата TOR), което от своя страна дава предпоставка и възможност за нови открития, касаещи специфичните му механизми на действие. Например, сред изследваните нестероидни противовъзпалителни средства (NSAIDs), ибупрофенът води до намаляване риска от Алцхаймер (40 %), докато други лекарствени препарати от същата група като целекоксиб, нямат такъв ефект (Vlad et al., 2008). По подобен начин само ибупрофенът намалява риска от болестта на Паркинсон (Gao et al., 2011).

В същото време прекомерната употреба на антибиотици в днешно време и все по-широко разпространяващите се туморни образувания сред населението, насочи нашето внимание към антибиотика зеоцин, чийто молекулен механизъм се основава на свързване с ДНК на раковите клетки, което води до невъзможност за делене и растеж. Освен това предизвиква образуването на свободни радикали в човешкото тяло, които допълнително увреждат ДНК (виж Механизъм на действие на зеоцин в раздел: „Литературен обзор“).

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 отново Q клетките се характеризират с много по-висока устойчивост както към вредното действие на ибупрофен (70 % преживяемост), така и на зеоцин (5 % преживяемост) (Фиг. 18). 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 (de Sousa-Lopes et al., 2004; Srivastava et al., 2016).

При пролифериращите клетки процентът преживяемост след третиране с ибупрофен е 50 %, близо 1,5 пъти по-нисък от този, наблюдавана при G₀ клетките. Това е в пряка зависимост с литературните данни, в които е установено, че NSAIDs, към които спада и ибупрофенът, могат да медиат апоптоза в клетките на пъпкуващите дрожди чрез генериране на ROS и чрез индуциране на оксидативен стрес (Farrugia and Balzan., 2013).

Наистина се твърди, че генерирането на ROS може да представлява централен обединяващ механизъм, чрез който се медиат антинеопластичните ефекти на NSAIDs, като се има предвид, че оксидативният стрес е съчетан с много проапоптотични сигнали и активиране на MAP киназа (Adachi et al., 2007; Rigas., 2007).

Зеоцинът от своя страна притежава радиомиметични свойства, като има способността да индуцира единични (Miné-Hattab and Rothstein., 2013) и двойноверижни разриви (Chankova et al, 2007; Kopaskova et al., 2012; Todorova et al., 2015a) в молекулата на ДНК (Guénolé et al., 2013). Освен това е доказано, че има прооксидативни, мутагенни и канцерогенни ефекти в *S. cerevisiae* (Todorova et al., 2015b), което най-вероятно е причината за 100 % инхибиране растежа на Log и NQ клетките, и едва 5% преживяемост при G₀ клетките след третиране с 50 µg/ml зеоцин. Въпреки наличието на дебела клетъчна стена при клетките в стационарна фаза, ниската скорост на транскрипция и трансляция, по-слабото действие на репарационните механизми, най-вероятно е основната причина за този пагубен ефект на антибиотика зеоцин върху Q клетките.

Микроорганизмите като дрождите имат стратегии за оцеляване при промяна на условията на околната среда. Получените резултати ясно показват, че дрождевите клетки притежават различна устойчивост към токсични съединения, в зависимост от фазата на клетъчния цикъл (Bayliak et al., 2006). Дори и неочаквано въздействие може да доведе до промяна в клетъчната функция, както и до спиране на растежа (O'Brien et al., 1998; Cabiscol et al., 2000; Gasch and Washburne., 2002;), като дрождите притежават

способността да отговарят бързо на промени в условията на средата и да предотвратяват клетъчната апоптоза (Ruis., 1997; Jamieson., 1998; Lushchak., 2001; Lushchak., 2002; Zheng et al., 2001).

След като бе установен процентът преживяемост на трите субклетъчни популации на щам *S. cerevisiae* BY4741, след прилагане на четири широко употребявани медикамента, следваща стъпка в проведените изследвания бе да се проследят нивата на индуцираните вътреклетъчни повреди (нива на ROS, окислени белтъци, липиди и количество на общ глутатион), предизвикани от използваните токсични агенти.

2.1.2. Цитотоксичност

2.1.2.1. Водороден пероксид (H_2O_2)

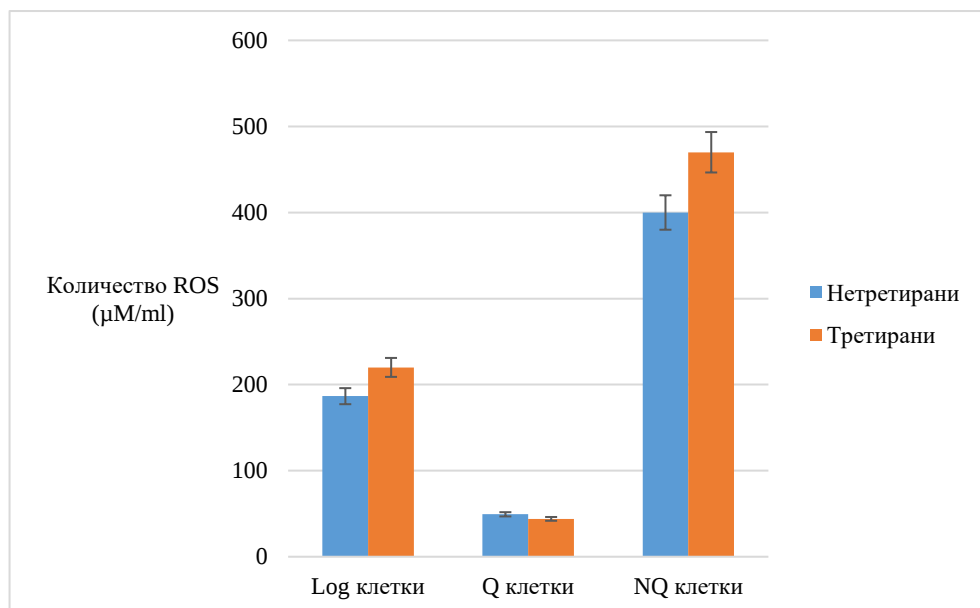
Количество ROS

Всички еукариотни организми имат кислород-зависим метаболизъм, като тази молекула се съхранява през еволюцията като краен електронен акцептор в процеса на дишане (Davies., 1995). По време на този процес се продуцират цитотоксични компоненти, реактивни кислородни видове (ROS), някои от които представляват нестабилни молекули, съдържащи несдвоени електрони или свободни радикали. ROS основно се формира *in vivo* в процес на окислителното фосфорилиране по време на митохондриалното дишане. Когато нивата на ROS се увеличат драстично, оксидативният стрес причинява сериозни повреди на повечето макромолекули (липиди, белтъци и ДНК).

От друга страна, въз основа на интензивността на приложения стрес, той може да се разглежда като полезен или вреден (Martins et al., 2011; Calabrese., 2011; Calabrese et al., 2011; Lushchak., 2014). Лекият стрес може да стимулира биологичните функции на организмите и да доведе до придобиване на устойчивост към високи дози от същия стресов агент (Martins et al., 2011; Ludovico and Burhans., 2014; Semchyshyn., 2014; Semchyshyn et al., 2011; Calabrese., 2015). Това явление, известно още като хормезис, се наблюдава при различни организми, реагиращи на широк спектър от химични, физични и биологични стресови фактори.

С цел да се проследи ефектът на силен оксидативен стрес върху трите субклетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741, клетъчни суспензии с $OD_{540}=1.0$, бяха третираны с 5mM H_2O_2 за 1 час на стайна температура. След отстраняване на стресовия агент, клетките бяха подложени на механично разрушаване и получените безклетъчни

екстракти бяха използване за установяване на нивата на индуцирани вътреклетъчни повреди, вследствие упражненото стресово въздействие.



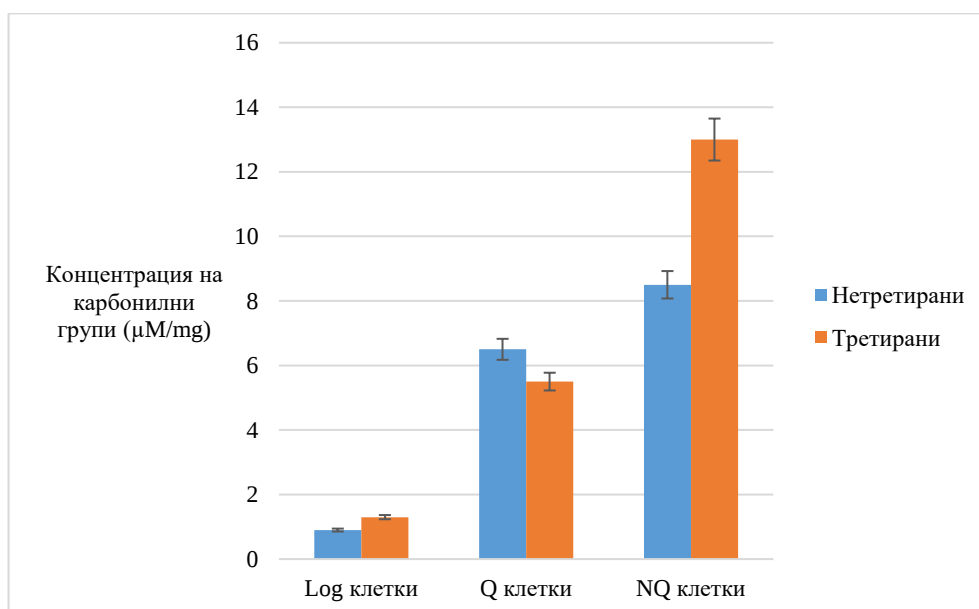
Фигура 19. Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H₂O₂

Получените резултати показаха повече от 2 пъти по-висока концентрация на генерираните ROS в апоптозните (NQ) клетки (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 нетретиращи клетки, което кореспондира с литературните данни, в които се докладва, че Q клетките са по-устойчиви на стрес и в резултат могат да останат репродуктивно компетентни за по-дълъг период от време (Фиг. 19). 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 дрождева клетъчна популация. Сходно увеличение на нивата на ROS се наблюдава и при активно делящите се клетки на *S. cerevisiae* BY4741. Причината за покачване концентрацията на ROS в пролифериращите клетки, най-вероятно се дължи на същността им: висока скорост на метаболизъм и невъзможност на антиоксидантната система да се справи с голямото количество генерираните реактивни кислородни видове, под въздействие на токсичния агент.

Окислението на протеини обикновено се случва на ниво специфични аминокиселинни остатъци. Например, H_2O_2 окислява тиоловата група (-SH) на цистеинов (Cys) остатък, за да образува сулфени (-SOH), което може да доведе до образуване на дисулфидна връзка (-S-S-). Излишъкът от H_2O_2 може да генерира форми на цистеин сулфинова (-SO₂H) и сулфонова (-SO₃H) киселина. ROS могат също да окислят серния остатък на метионина, което води до превръщането му в метионин сулфоксид или метионин сулфон (Schieber and Chandel., 2014). Допълнително основното въздействие на H_2O_2 върху редокс регулацията се осъществява чрез тиол пероксидази и включва обратимо окисление на цистеина до сулфенилирани или дисулфидни форми. Средният процент на окисление на цистеиновите остатъци в протеома е между 5–12 % и може да се увеличи до 40 % след действие на оксиданти (Go and Jones., 2013). Въпреки това, поради тяхната нестабилност и относителната липса на методи за тяхното изследване, обхватът на редокс регулацията чрез цистеиново сулфенилиране все още е слабо разбран.

Във връзка с този засилен интерес към влиянието на водородния пероксид върху еукариотните клетки, в експерименталната работа бяха проследени и нивата на окислени белтъци в *S. cerevisiae* BY4741, след въздействие с 5mM H_2O_2 . 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. 20 се вижда, че NQ клетките се характеризират с 1,5 пъти по-висока концентрация на окислени белтъци след третиране с водороден пероксид (13μM/mg), в сравнение с контролните такива (8,5μM/mg). При Q клетките отново е наблюдавана устойчивост към токсичното действие на водородния пероксид, като това ясно се визуализира на фигурата (нивото на карбонилирани белтъци не само, че не се увеличава, но дори се наблюдава относителен спад в тяхната концентрация) и е в абсолютно съответствие с получените резултати, касаещи преживяемостта на трите клетъчни популации след третиране с водороден пероксид (Фиг. 18), където именно G₀ клетките показват най-висок процент жизненост – 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 20: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741, след третиране с 5mM H₂O₂

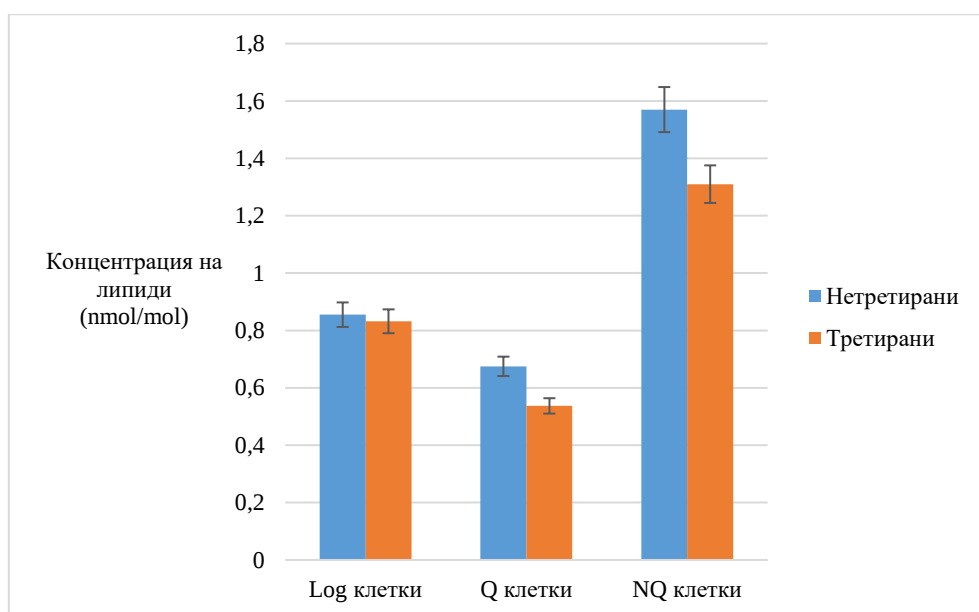
Известно е, че навлизането на дрождевите клетки в началото на стационарна фаза води до повишаване на устойчивостта им към оксиданти, като H₂O₂ (Jamieson., 1992; Izawa et al., 1996). Точните механизми на резистентност към окислителни не са разбрани, но се предполага, че тази повишена толерантност към стрес може да се обясни, поне отчасти, с дерепресия на отрицателния регулаторен ефект, упражняван от RAS-cAMP-РКА пътя върху експресията на гените, отговорни за стрес (Rolland et al., 2002), а също и чрез повишена експресия на гени, кодиращи антиоксидантни ензими, включително тези, отговорни за отстраняването на H₂O₂ от клетката (Jamieson., 1998).

Получените резултати корелират и с тези, установени за количеството на ROS, измерени в различните клетъчни популации (Фиг. 19). Когато има високи нива на ROS, логично и концентрацията на окислени белтъци в клетките нараства.

Нива на окислени липиди

Оксидативният стрес е терминът, даден за условия, при които се наблюдава нарушаване на антиоксидантния - прооксидантния баланс в полза на втория. В такива условия е известно, че някои ROS имат способността да реагират с макромолекулите в клетката, причинявайки освен протеиново окисление и липидна пероксидация (Esterbauer et al., 1991; Pryor., 1996). Ненаситените мастни ацилни групи в мембраните са основна мишена за хидроксилния радикал и супероксидния анион и тази атака инициира автокаталитична липидна пероксидация, водеща до образуване на реактивни липиди

радикали и липидни хидропероксиди (Gunstone., 1996; Wiseman et al., 1996). Разграждането от своя страна на липидните хидропероксиди води до генериране на голямо разнообразие от силно реактивни алдехиди (Levine., 2002).



Фигура 21: Нива на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H₂O₂

Във връзка с горе изложеното бе проследено и токсичното действие на H₂O₂ върху дрождевите липиди, като беше оценена промяната във вътреклетъчните нива на техните окислени форми (Фиг. 21). Установено бе, че не се наблюдава повишаване на техните нива в нито една от трите клетъчни популации спрямо контролните такива. Противоположно в клетките, изолирани от стационарна фаза на растеж (Q и NQ), се наблюдават съответно 1,3 и 1,2 пъти по-ниска стойност на прекисно окислени липиди (0,573 nmol/mol и 1,31 nmol/mol), спрямо контролните, нетретирани клетки (0,675 nmol/mol и 1,57 nmol/mol). Наблюдаваните промени най-вероятно са вследствие от повишените нива на трехалоза в стационарните клетки, която ги предпазва от вредното влияние на H₂O₂. Доказано е, че дизахаридът трехалоза е способен да понижава *in vitro* скоростта на окисление на ненаситените мастни киселини и да предпазва липидите от оксидативно увреждане, причинено от излагане на клетките на H₂O₂ (Benaroudj et al., 2001; Oku et al., 2003). Тя се открива в много организми, като растения, насекоми и безгръбначни, както и еукариотни микроорганизми и бактерии, в които се натрупва значително при неблагоприятни условия (Richards et al., 2002). Навлизането в стационарна фаза на растеж и в последствие в G₀ състояние на покой при дрожди се характеризира именно с

повишаване нивата точно на този дизахарид, което е неразривно свързано и с резултатите, наблюдавани на Фиг. 21.

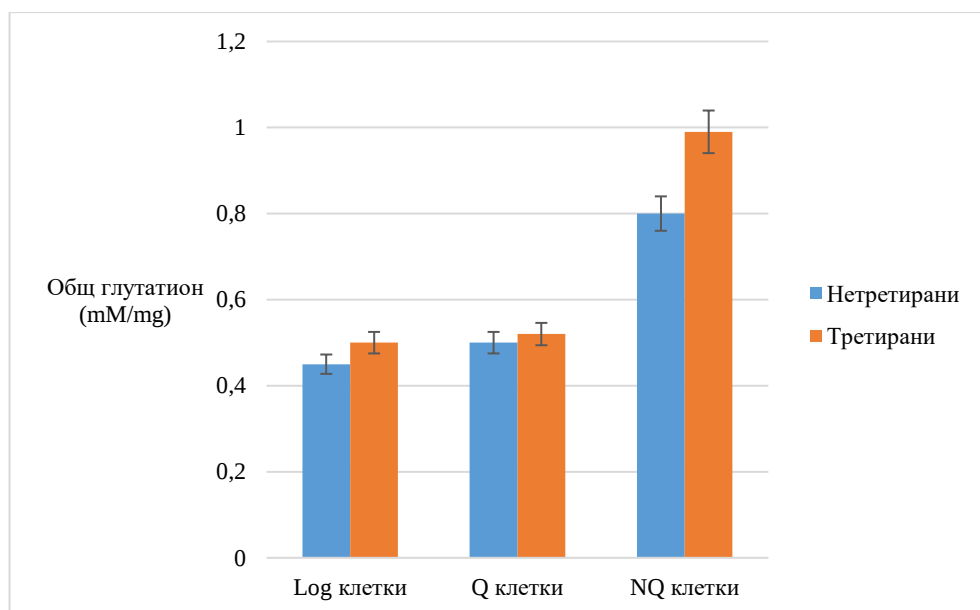
Подобно на стационарните дрождеви клетки и при клетките, намиращи се в експоненциална фаза на растеж не се наблюдава съществена разлика в нивото на окислени липиди при третираните и нетретираните с H_2O_2 дрождеви микроорганизми. Отчетените стойности са съизмерими и варират между 0,855 nmol/mol за контролата и 0,832 nmol/mol за третирани клетки. Това най-вероятно се дължи на факта, че при клетки, които са в експоненциална фаза на растеж се наблюдава активно действие на антиоксидантната защитна система, която успява да запази клетъчните мембрани и транспортните процеси през нея в нативно състояние. Всъщност устойчивостта към оксидативен стрес предизвиква сложен физиологичен отговор, който обхваща ензими като каталаза и супероксид дисмутаза, както и синтеза на редица защитни молекули (Moradas-Ferreira et al., 1996; Finkel and Holbrook., 2000). Редица изследвания показват, че активно делящите се клетки на бозайници и дрожди, внезапно подложени на промяна в околната среда, като температурни колебания и повишени нива на ROS, активират бързо широка гама от реакции, включващи няколко защитни механизма, например адаптивен отговор, необходими за бързото им приспособяване към неблагоприятните условия на средата (Wiese et al., 1995; Estruch., 2000).

Нива на 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). Глутатионът (GSH) е повсеместно разпространен тиол, участващ в множество клетъчни процеси, включително транспорт на аминокиселини, синтез на протеини и нуклеинови киселини, модулиране на ензимната активност и метаболизъм на ксенобиотици, обезвреждане на канцерогени и реактивни кислородни видове.

Ето защо в настоящите изследвания бе обърнато специфично внимание на промяната в нивата на тотален вътреклетъчен глутатион (GSH), след въздействието с екзогенно добавен 5mM H_2O_2 . Получените данни показаха, че най-високи нива на този антиоксидант се наблюдават в апоптозните NQ клетки (0,99 mM/mg), което вероятно представлява компенсаторен механизъм с цел преодоляване на силно нарушената хомеостаза (Фиг. 22). В останалите две клетъчни популации – Q и Log клетки, отчетените стойности са по-ниски (0,52 mM/mg и 0,5 mM/mg, съответно), като не се различават от

тези, измерени при контролните дрождеви култури. Получените резултати корелират и с отчетената най-висока устойчивост при G₀ клетките, което предполага и липса на необходимост за по-висока експресия на този трипептид. Същевременно токсичната концентрация от 5mM H₂O₂ действа по-силно върху NQ клетките, в резултат на което при тях се отчита и най-висока концентрации на генерирани ROS, окислени белтъци и липиди. Това най-вероятно е вследствие от факта, че при тези клетки, излагането на високи дози на H₂O₂ може да доведе до некротичен фенотип и индукция на апоптоза (Carmona-Gutierrez et al., 2010).



Фигура 22: Количество общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 5mM H₂O₂

По литературни данни, значителни нива на окислително увреждане на протеини могат да бъдат открити в клетките, след излагане на ниски концентрации H₂O₂, както и в мутанти, дефицитни по GSH метаболизъм в отсъствието на екзогенни оксиданти (Poljak et al., 2003).

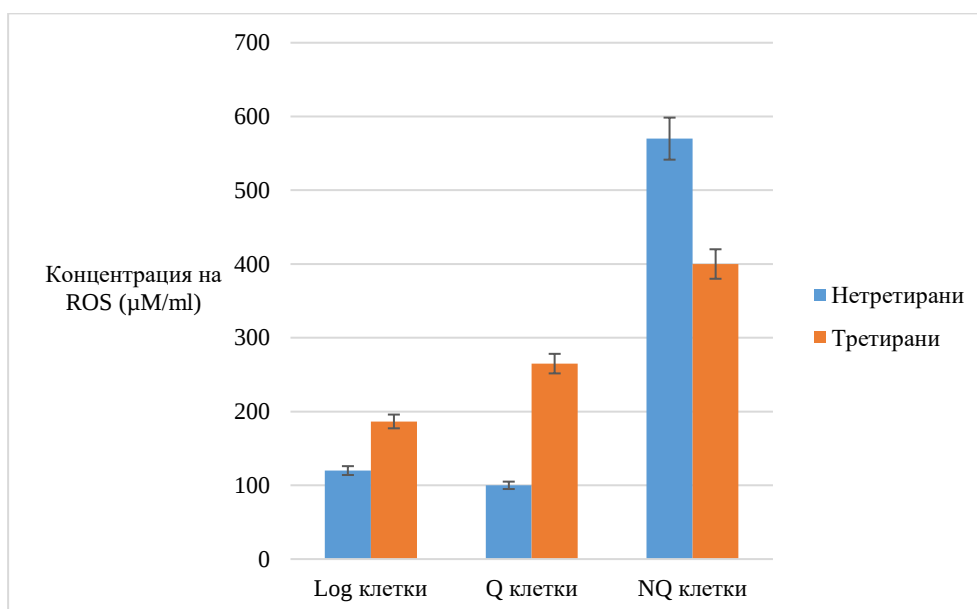
2.1.2.2. Менадион

Количество ROS

Увреждащите ефекти, упражнявани от ксенобиотиците (канцерогени, токсини, замърсители на околната среда и лекарства) се дължат както на физиологични фактори и взаимодействия с околната среда, така и се повлияват от специфичните генетични характеристики на организмите. В много случаи токсичността зависи не само от

концентрацията на медикамента, но и от процесите, протичащи в клетката (Cascorbi., 2006).

Менадионът например 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 ефекта на менадиона върху различните клетъчни популации на *S. cerevisiae* BY4741, те бяха третирани с установената в предходните експерименти $LD_{50} = 100\mu M$ менадион. След инкубация за 1 час на $25^{\circ}C$ бяха измерените нива 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 G_0 клетките е по-силен ($265\mu M/ml$), в сравнение с този, наблюдаван при логаритмичните клетки ($186,6\mu M/ml$), който факт вероятно е свързан с процеса на генериране на енергия в Q клетките посредством митохондриално дишане и свързаните с това по-високите нива на кислород в клетките (Bonawitz et al., 2007). Получените данни са в съответствие и с твърдението на Fabrizio and Longo., (2008), че клетките в покой се характеризират с по-ниска консумация на енергия и съдържание на АДФ, което може да доведе до повишени нива на вътреклетъчен кислород и едноелектронни кислородни редуктори. И при двата типа изследвани клетъчни популации (Log и Q) след третирането с менадион се наблюдава от 40 % до 60 % повишаване на нивата на токсични кислородни форми в клетката (Фиг. 23). От друга страна, в NQ дрождевата популация се установява точно противоположния ефект на намаляване концентрацията на ROS. Този феномен вероятно се дължи на високия процент умиращи клетки в тази популация, за които добавянето на токсичен агент като менадиона води до смърт на клетките (Davidson et al., 2011).



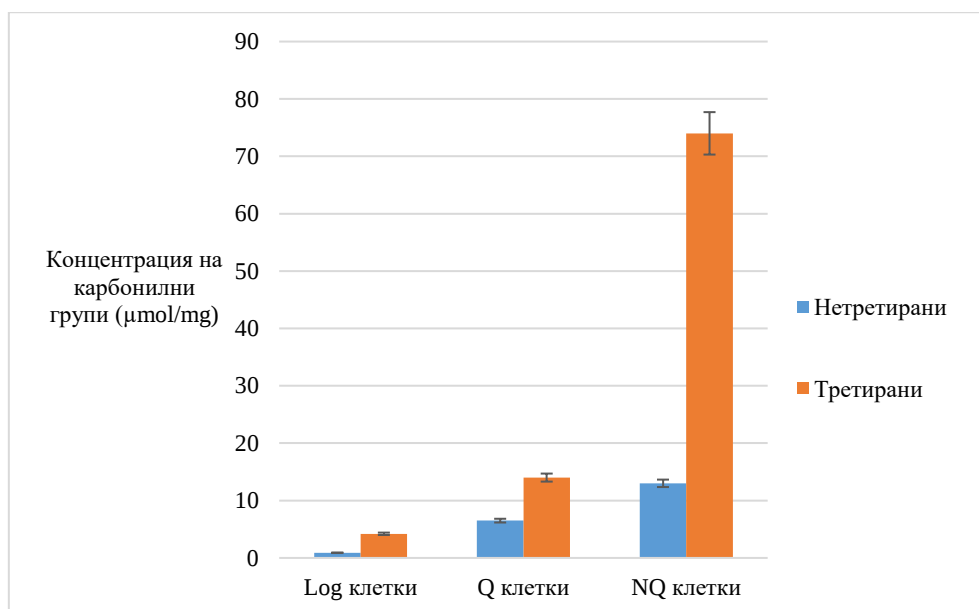
Фигура 23: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100µM менадион

Нива на окислени белтъци

Оксидативният стрес обикновено се разглежда като състояние, при което генерирането на реактивни кислородни видове (ROS) в клетъчната система надвишава буферния капацитет на ендогенната антиоксидантна защита (Sies and Cadenas., 1985), което води до оксидативно увреждане на липиди, ДНК и протеини (Stadtman., 1992). Сред многобройните методи за оценка на увреждане в клетъчните биомолекули, карбонилирането на протеини е най-широко използваният метод, служещ като маркер за оксидативен стрес (Shacter., 2000; Stadtman., 2001; Sorolla et al., 2008) отчасти въз основа на факта, че карбонилните модификации могат да бъдат вследствие от голямо разнообразие ROS, както и от продукти на липидното окисление. Освен в използването им като биомаркери за оксидативен стрес карбонилираните белтъци могат да функционират и като биологични сигнали (Wong et al., 2008; Wong et al., 2010) или да доведат до необратима загуба на протеинова функция (Shacter., 2000; Stadtman., 2001; Sorolla et al., 2008; Sultana et al., 2010).

За разлика от H_2O_2 , който е директен оксидант, менадионът (2-метил-1,4-нафтохинон, витамин K3) е прооксидантен медикамент. Цитотоксичността му е резултат от генериране на реактивни кислородни видове (ROS) при редокс циклизиране на семихинонови радикали, генерирани от ензимна едноелектронна редукция на менадион и от неговата електрофилна способност да реагира с тиоловите групи на протеините и GSH (Castro et al., 2008). Във връзка с това, сравнителният анализ на нивата на

формирани карбонилни групи в протеините на контролните дрождеви култури, показва около 7 пъти по-високи стойности в Q клетки в сравнение с логаритмичните такива (Фиг. 24). Този феномен вероятно е свързан с гладуването на клетките по време на стационарна фаза и дължащото се на този процес натрупване на карбонилирани протеини (Coliva et al., 2019). Най-високото количество окислени протеини – 74 $\mu\text{M}/\text{mg}$, бе измерено в NQ клетките, вероятната причина за което е тяхната апоптозна природа. След третиране на моделните култури с LD_{50} доза на менадион - 100 μM - при Q клетките стойността на карбонилираните белтъци с увеличава двукратно и достига до 14 $\mu\text{M}/\text{mg}$, чиято стойност е 3 пъти по-висока от тази, измерена в пролифериращите клетки (4,2 $\mu\text{M}/\text{mg}$) (Фиг. 24). Получените резултати са в абсолютно съответствие с проведените експерименти по-горе, където става ясно, че клетките в експоненциална фаза имат по-висока устойчивост към вредното действие на менадион, в сравнение с тези в стационарна фаза – Q и NQ.



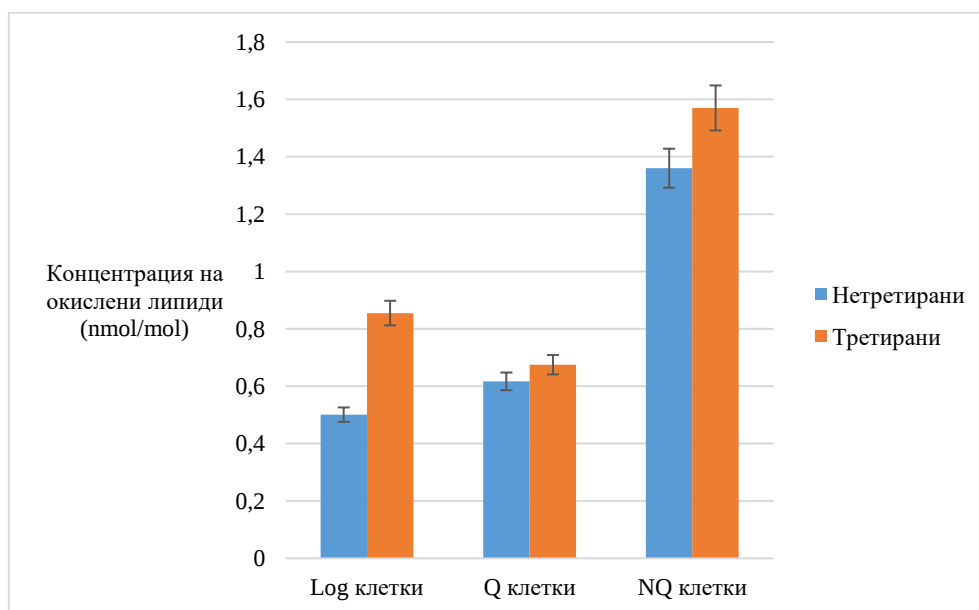
Фигура 24: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100 μM менадион

Нива на окислени липиди

Един от молекулните механизми, който води до увреждане и клетъчна смърт по време на оксидативен стрес, е атакуването на фосфолипидите в мембраните, което води до липидна пероксидация (Finkel and Holbrook., 2000; Scandalios., 2005). Методът, използван за определяне нивата на окислени липиди се базира на количеството MDA (малоналдеhid), който е краен продукт от окислението на липидите. Измерването на концентрацията на това химично съединение в изследваните дрождеви култури показва,

че наблюдаваните нива при Q и Log клетките са приблизително сходни (Фиг. 25). NQ клетките показват обаче значително по-високи концентрации на MDA. В резултат на третирането с менадион най-значимата индукция на липидно окисление (около 2 пъти) е отчетена в пролифериращите клетки (Marinovska et al., 2022). 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. 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).

Сравнително високите нива на малоналдеhid, измерени в NQ клетките най-вероятно са следствие от факта, че в голям процент от тях са активирани процесите за програмирана клетъчна смърт и съответните антиоксидантни защитни системи не са функционални.



Фигура 25: Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100μM менадион

Нива на тотален глутатион

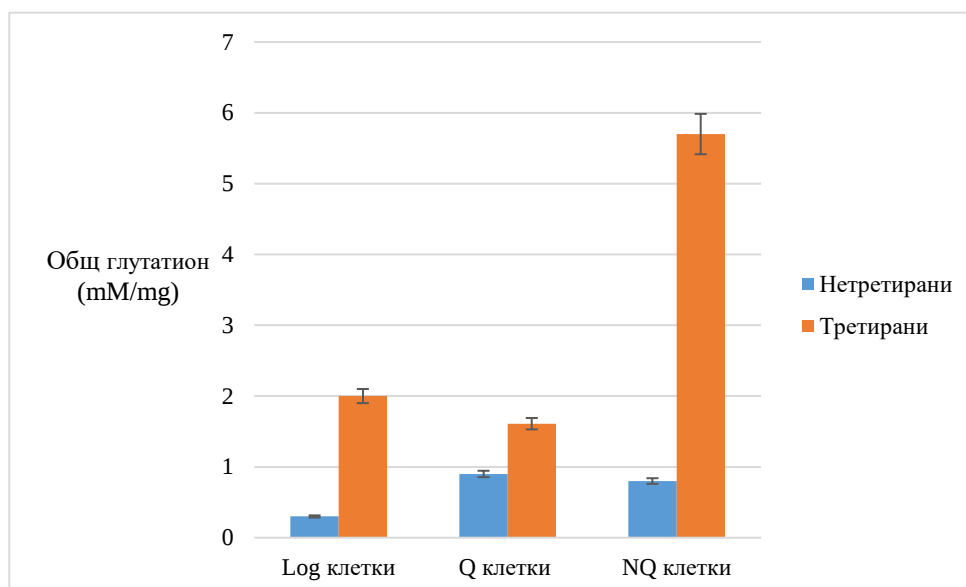
Излагането на еукариотните организми на високи дози менадион обикновено води до генерирането на значителни вътреклетъчни увреждания. Именно поради това той се подлага на детоксикация в клетката, която обикновено протича на три етапа. В етап I менадиона и подобните ксенобиотици се активират чрез реакции на окисление, редукция

или хидроксилране, включващи цитохром P450 ензими, които са отговорни за излагане на реактивни места и/или въвеждане на функционална група. При етап II, функционалната група е конюгирана с глутатион (GSH), глюкуронова киселина или глюкоза, ензимно или неензимно. По-специално, S-конюгатите на GSH се образуват от цитозолни ензими, наречени глутатион трансферази (GST). На етап III, GSH-конюгатите напускат цитозола с помощта на специфични ефлуксни помпи, принадлежащи към MRP (протеини, свързани с множествена лекарствена резистентност) подсемейство на ABC транспортери (Ishikawa., 1992; Sharma et al., 2002). В дрождите е описано подобно семейство от протеини, наречено Ycf1.

Хиноните, към които спада и менадионът, са потенциални електрофили, които имат способността да реагират с тиоловите групи на белтъци и глутатиона (GSH). Всъщност генерирането на GS-конюгати, катализирано от изоформи на глутатион трансфераза (GST) с изчерпване на GSH, е свързано с индуцираната от менадиона цитотоксичност и оксидативен стрес (Monks and Lau., 1998; Chung et al., 1999; Monks and Jones., 2002; Rodriguez et al., 2004).

Във връзка с това, в настоящия дисертационен труд беше проведен експеримент, целящ измерването нивата на тоталния глутатион в трите клетъчни субпопулации на щам *S. cerevisiae* BY4741, след третиране с токсичната концентрация от 100µM/ml менадион (Фиг.26).

Получените резултати показаха, че концентрацията на GSH в нетретирани Q клетки е 3 пъти по-висока от тази в Log клетките. Интересно е, че третирането с менадион на дрождите в G₀ състояние не води до значително повишаване на 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 µM менадион се наблюдават близо 7 пъти по-високи нива на GSH (2 mM/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 mM/mg). Получените резултати вероятно се дължат на факта, че Log и част от NQ клетките, които притежават способността да се размножават, успяват успешно да индуцират повишена експресия на ензимите, отговорни за биосинтеза на глутатион (Gsh1 и Gsh2). Противоположно на тях, за метаболитно неактивните G₀ клетки, ефективността на биосинтеза на глутатион е значително по-слаба.



Фигура 26: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране със 100 μ M менадион

2.1.2.3. Ибупрофен

Изследването на влиянието на ибупрофена върху дрождевите клетъчни популации е интересно поради няколко причини: първо, това е относително безопасно лекарство, за което не е необходима рецепта. Второ, ибупрофенът може да бъде свързан с намален риск от някои, свързани с възрастта патологии. Трето, независимо от наблюдавания ефект върху репликативния цикъл, до момента няма данни, че ибупрофенът е насочен към някой от известните пътища на стареене (напр. TOR или Sirtuin пътища). Подобно на другите представители от този род, ибупрофенът има аналгетично и антипиретично действие. Въпреки това, тези показания произтичат от добре установената роля на ибупрофена като инхибитор на циклооксигеназата, който пречи на биосинтезата на простагландин (Rome and Lands., 1975). Дългосрочната употреба на ибупрофен намалява риска от болести като Алцхаймер (Vlad et al., 2008) и Паркинсон (Gao et al., 2011; McSharry., 2011), с повече от 30%. Малко вероятно е обаче тези благоприятни резултати да се дължат единствено на противовъзпалителната роля на ибупрофена, тъй като те не са наблюдавани при други NSAIDs. До момента няма точни и достатъчно експериментални данни, показващи продължителността на живот при организмите след употреба на ибупрофен.

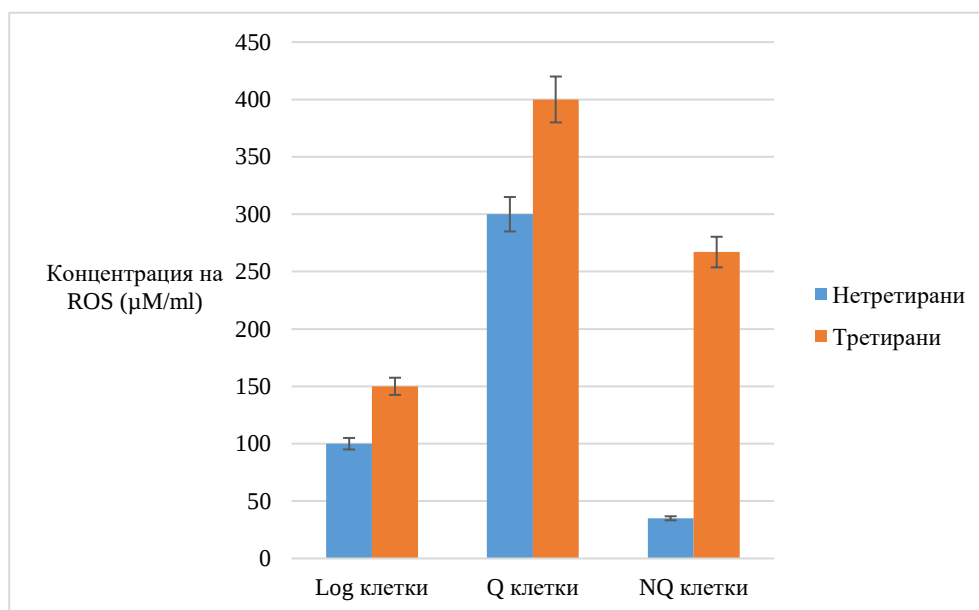
В сравнение с бозайниците, в дрождите няма циклооксигеназни ензими (Simmons et al., 2004), следователно ибупрофенът повлиява клетките им чрез неизвестни нецелелеви механизми. Сред възможните такива е и дестабилизацията на триптофановия

транспортър, което възпрепятства усвояването на ароматни аминокиселини. Третираните с ибупрофен дрожди се характеризират с по-малък размер, ниска скорост на процесите на клетъчно делене и респективно удължаване на репликативния жизнен цикъл (He et al., 2014).

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.

Както вече се видя от данните за преживяемостта в присъствие на ибупрофен (Фиг.18), в концентрация 1.1 mg/ml този лекарствен препарат инхибира клетъчния растеж между 30 - 60 % при трите типа дрождеви популации. Вероятно това се дължи на нарушения в метаболизма на клетките, вследствие инхибиране действието на специфична триптофан пермеаза (Tat2) и невъзможност за пълноценно усвояване на хранителни вещества (He et al., 2014). Метаболитният дисбаланс, който възниква при гладуване на клетките, се отразява и в повишаване количеството на реактивни кислородни видове. Анализът на дрождеви клетки в експоненциална фаза на растеж показва само 1.5 пъти по-високи нива на ROS, след третиране с ибупрофен ($150\mu\text{M/ml}$) спрямо контролните такива ($100\mu\text{M/ml}$). Тъй като NQ клетките се характеризират с бърза загуба на жизнеспособност, не е изненадващо наблюдаваното драстичното повишаване на ROS след третиране със съответния токсичен агент (ибупрофен) – близо 8 пъти по-високи стойности ($267\mu\text{M/ml}$) спрямо контролните клетки ($35\mu\text{M/ml}$) (Фиг. 27).



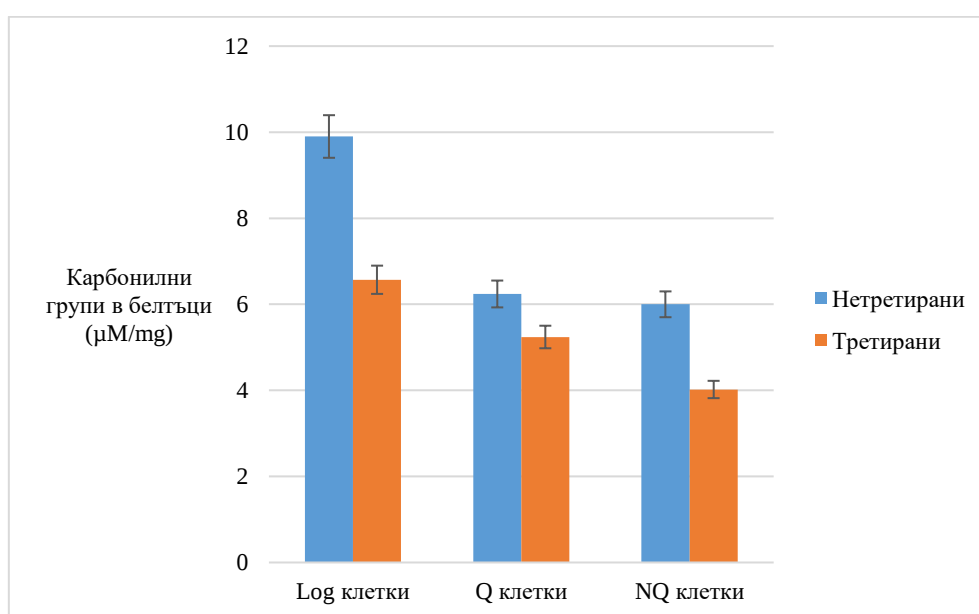
Фигура 27: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен

Подобно на получените експериментални резултати, изследването на ефектите на NSAIDs при бозайници показва, че тези агенти могат да индуцират повишаване на вътреклетъчните нива на ROS и в техните клетки (Klaunig and Kamendulis., 2004). Същевременно при дрожди информацията е оскъдна, но е потвърдено, че ибупрофенът инхибира приема на ароматни аминокиселини с последващо понижаване на нивата им в клетката (Chong et al., 2014). Van Leeuwen et al., (2011) наблюдават редуциране на клетъчния растеж и жизненост на *S. cerevisiae* след третиране с диклофенак и последваща митохондриална дисфункция, свързана с инхибиране на електрон-транспортните вериги, по-точно на протеини Rip1p от комплекс III и Cox9p от комплекс IV. Това води до инхибиране на клетъчното дишане и последващо генериране на ROS и клетъчна смърт. Наблюдавано е и инхибиране на клетъчното дишане, индуцирано от аспирин, в MnSOD – дефицитни дрождеви клетки, култивирани на среда с етанол (Sapienza et al., 2008) и е установено, че аспирин води до проапоптичното генериране на митохондриални супероксид радикали в тези клетки.

Окислени белтъци

Друг показател, който беше изследван след третиране с ибупрофен, бе натрупването в клетката на окислени протеини. 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 след прилагането му върху клетката (Фиг. 28). По литературни данни, употребата на противовъзпалителното лекарство ибупрофен се характеризира с понижен риск от възникване на клетъчна патология (Chong et al., 2014), който факт се потвърждава и от получените при *S. cerevisiae* BY4741 данни. Пример за това са не само получените резултати, касаещи окислените белтъци, а и проведените експерименти, свързани с преживяемостта на трите клетъчни популации след третиране с 1,1mg/ml ибупрофен (Фиг. 18). Това е съединението, което има най-слаб токсичен ефект върху дрождевите клетки.

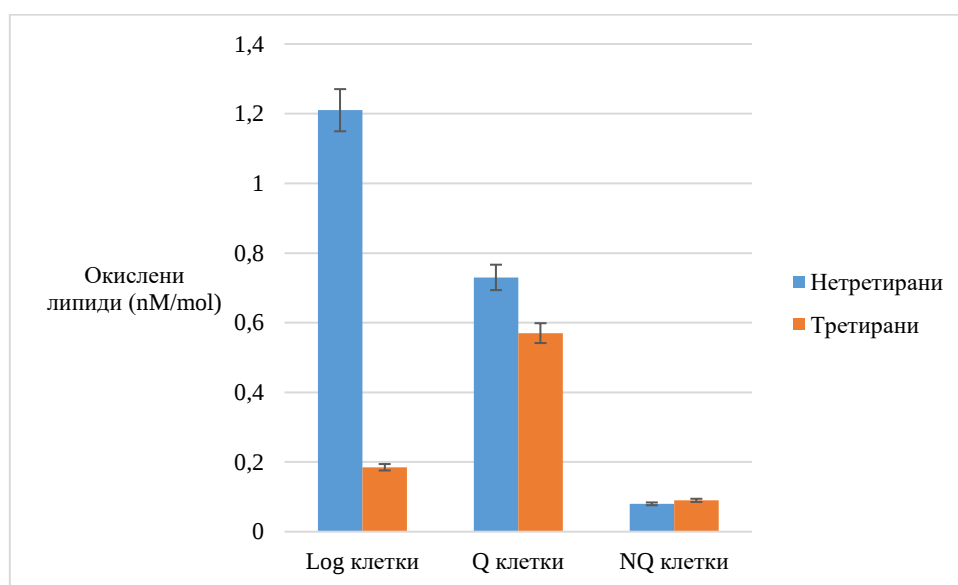


Фигура 28: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен

Протеиновото окисление може да доведе до конформационни промени, свързани с намаляване на активността когато целевите аминокиселини са в близост до активните центрове. Към аминокиселините, имащи способност да се окисляват, влизат триптофан, тирозин, лизин, аргинин и пролин. Хистидинът, цистеинът и метионинът също са силно податливи на окисление (Levine et al., 2000; Mirzaei and Regnier., 2006). Ето защо, изучаването на дрождите на белтъчно ниво има важно значение относно идентификацията на специфично окислени белтъци, което предоставя нови насоки в изследването на редокс-регулираните физиологични процеси и механизмите на цитотоксичност на различни лекарствени препарати (Costa et al., 2007).

Окислени липиди

Излагането на трите клетъчни типа на LD₅₀ концентрация на ибупрофен отново показва липса на увреждащ ефект върху клетъчните мембрани и даже наличие на протектиращ такъв. При клетките в експоненциална фаза на развитие се наблюдава близо 7 пъти по-ниска концентрация на окислени липиди спрямо контролните клетки. От друга страна, при клетките в G₀ състояние се наблюдава 1,3 по-ниска стойност на третираните клетки спрямо контролните (Фиг. 29).

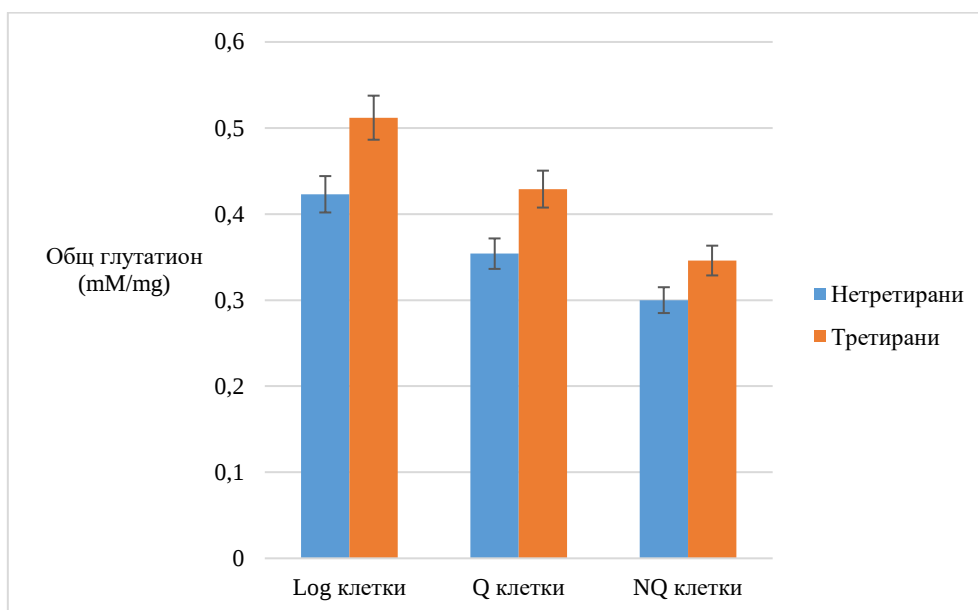


Фигура 29: Количество окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен

По литературни данни е установено, че добавянето на 0,2 mM ибупрофен води до значително удължаване на репликативната продължителност на живота при щам *S. cerevisiae* BY4742, което още веднъж потвърждава до определена степен благоприятния ефект на това нестероидно противовъзпалително средство върху дрождевите клетъчни мембрани (Chong et al., 2014).

Тотален глутатион

По литературни данни, третирането на клетки на бозайници с NSAIDs води до повишаване нивата на глутатион-S-трансферазата, която е важен компонент от глутатионовия метаболизъм в клетката и играе ключова роля в детоксикацията на различни ксенобиотици (Beckett and Hayes., 1993; Hayes and Pulford., 1995).



Фигура 30: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 1,1 mg/ml ибупрофен

От представените експериментални резултати се вижда (Фиг. 30), че след третиране с 1,1mg/ml ибупрофен нивата на общия глутатион и при трите клетъчни типа 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. 27). 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.

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 (Механизъм на действие, описан в глава Литературен обзор) (Todorova et al., 2019).

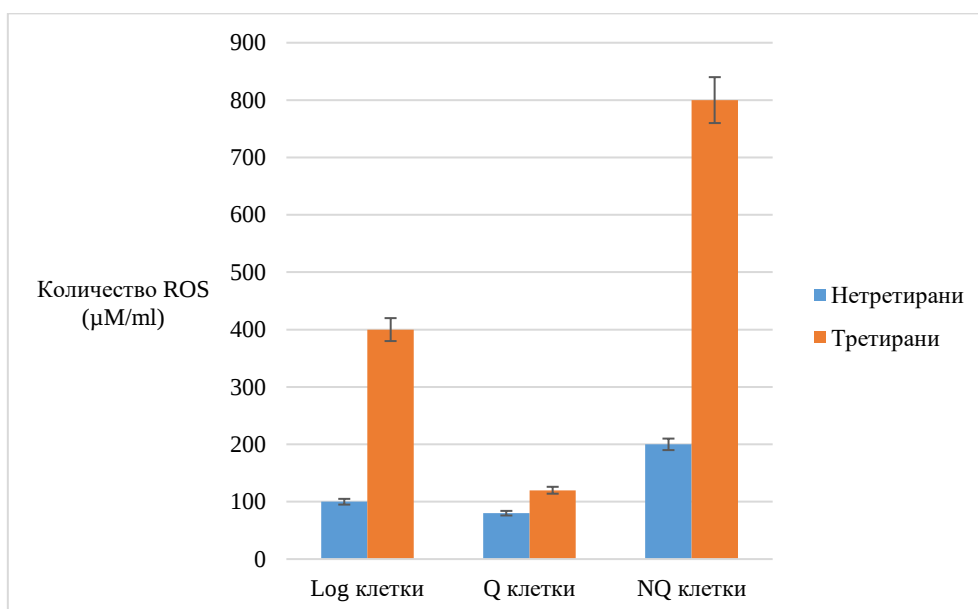
Делецията на една база и заместването на Т с G при 5'-GT-3' мотива представят най-ясна картина за индуцирани от зеоцин мутации. Това е главно резултат от транслезионен синтез на ДНК, включващ Rev1 и полимераза ζ. Излагането на дрождеви

клетки на действието на зеоцин води до честа загуба на хетерозиготност и хромозомни пренареждания в диплоидните щамове (Zheng et al., 2022).

Широката употреба на зеоцина както в медицинската практика, така и в редица научни изследвания беше важна предпоставка за провеждането на по-задълбочено изследване на механизмите на неговото токсично действие. Използвайки дрождите *S. cerevisiae* като моделна система беше проучено влиянието на този токсичен агент върху нивото на вътреклетъчни повреди в зависимост от фазата на клетъчния цикъл.

Количество ROS

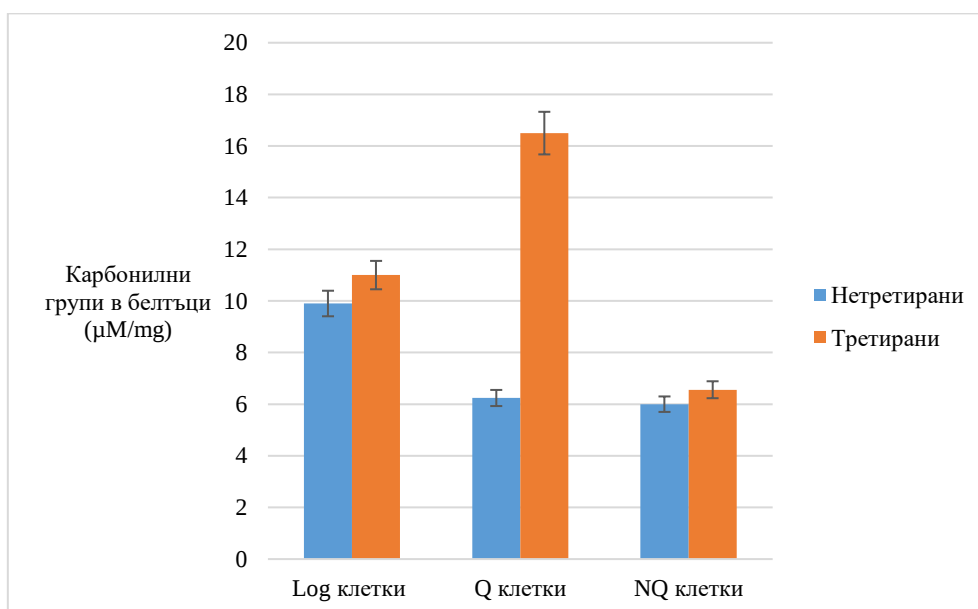
Проследяването на нивата на натрупани ROS в клетките, след въздействието с 50 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин в Log, Q и NQ клетъчни дрождеви популации, показва пълно съответствие с данните получени за преживяемостта на дрождевите микроорганизми (Фиг. 18). При клетките, намиращи се в експоненциална фаза на растеж бе наблюдавано 4кратно по-високи нива на ROS (400 $\mu\text{M/ml}$), в сравнение с контролните култури (100 $\mu\text{M/ml}$) (Фиг. 31). Причината за този скок в нивата на окисление най-вероятно е в следствие от високата скорост на транскрипция и транслация при активно делящите се клетки, което води до по-често генериране на мутации и невъзможност на репарационните системи да се справят с възникналите повреди. В изследвания на други автори със *S. cerevisiae* и *S. pombe* е показано, че ДНК повредите или индукцията на мутации, генерирани по време на репликация могат да доведат до ускорена апоптоза (Burhans et al., 2003; Marchetti et al., 2006), което от своя страна е свързано с натрупване на ROS. Окислителните изменения, които възникват в клетките, в резултат на тези процеси, водят до генериране на повреди в основни клетъчни биомолекули като белтъци и липиди (Perrone et al., 2008). Тази тенденция се запазва и при Q клетките, но там нивата на генерирани кислородни радикали е едва 1,5 пъти по-високи (120 $\mu\text{M/ml}$) спрямо контролата (80 $\mu\text{M/ml}$). Апоптозните NQ клетки показват най-слаба преживяемост и съответно излагането на действието на зеоцин води до формиране на 4 пъти по-висока концентрация на ROS (800 $\mu\text{M/ml}$) в сравнение с контролата (200 $\mu\text{M/ml}$).



Фигура 31: Количество ROS при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50 µg/ml зеоцин

Окислени белтъци

Директен показател за настъпване на промени в редокс баланса в резултат от излагането на зеоцин е появата на карбонилни групи в белтъците. Окислителното им увреждане засяга процесите, поддържащи клетъчната хомеостаза, което компрометираща клетъчната жизнеспособност (Farrugia and Balzan., 2012). Окислителното увреждане на протеините, под действието на блеомицините, води до множество продукти, произтичащи от модификация на широка гама аминокиселини. Те включват увреждане на сяра - съдържащи, ароматни и алифатни аминокиселини (Fu et al., 1995; Dean and Fu., 1997; Morin et al., 1998; Pietzsch., 2000). Протеиновите карбонилати представляват необратима форма на протеинова модификация и е доказано, че са относително стабилни за разлика от продуктите на липидната пероксидация, които се отстраняват в рамките на минути (Grune et al., 1995; Grune et al., 1996).



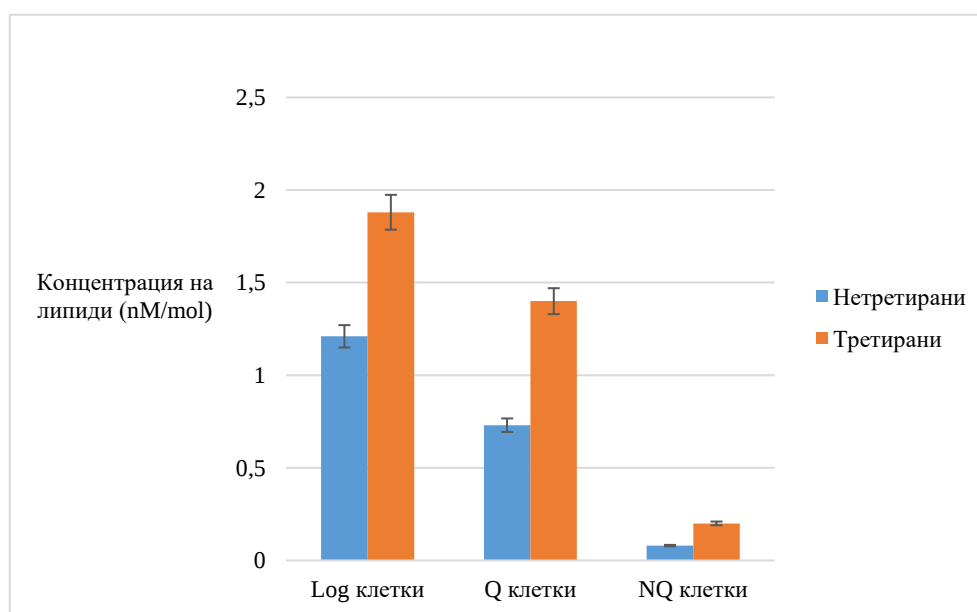
Фигура 32: Нива на окислени белтъци при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50 µg/ml зеоцин

В това отношение, тъй като Q-клетките се характеризират с много ниски метаболитни нива и по-ниска способност да поправят увредени молекули, наблюдаваните повишени окислителни модификации в белтъците, не са изненадващи. 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 карбонилираните протеини след третиране със зеоцин е сравнимо с това в контролните клетки - съответно 6.56 и 6.06 µM/mg (Фиг. 32). 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). При активно делящите се дрождеви микроорганизми, повишаването на нивото на окислени протеини е пренебрежимо малко, вероятно дължащо се на активно функциониращата убиквитинова система и бързото отстраняване на увредените молекули от клетката (Zhou et al., 2020).

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 потвърждава, че един от цитотоксичните ефекти на този антибиотик е свързан с индуцирането на оксидативен стрес в клетката. Това води до увреждане на мембранната

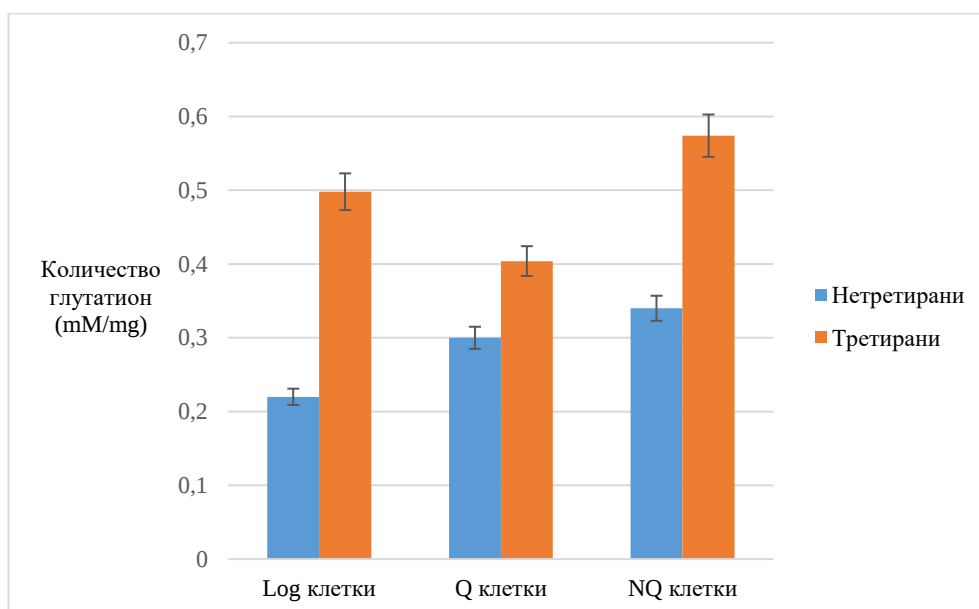
функционалност и пропускливост, вероятно причинявайки освобождаване на вътреклетъчното съдържание (Hodges et al., 1999). Очевидно, когато метаболитната активност на клетката е по-висока и транспортът през мембраната – динамичен, клетките на дрождите са по-уязвими към действието на ксенобиотиците, включително 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. 33).



Фигура 33: Концентрация на окислени липиди при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50 µg/ml зеоцин

Количество глутатион

Както вече стана ясно, глутатионът е най-разпространената неензимна защитна система в живите организми. Много изследователи са показали, че GSH играе важна роля в отговора на дрождите към оксидативен стрес и по-специално в обезвреждането на ROOH като ендогенни липидни хидропероксиди (LOOH), генерирани в биологични мембрани от ненаситени мастни киселини (Bourbouloux et al., 2000; Park et al., 2000; OIV., 2015).

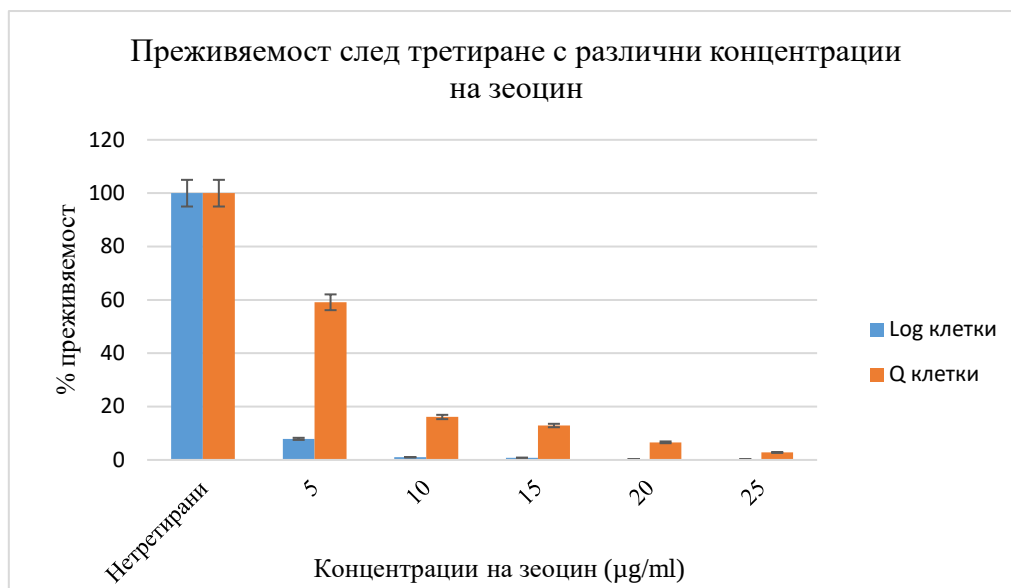


Фигура 34: Нива на общ глутатион при Log, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50 µg/ml зеоцин

За да се предотврати небалансираното натрупване на ROS и последователни клетъчни увреждания, клетките на дрождите реагират със специфична индукция както на неензимни, така и на ензимни антиоксидантни защитни механизми (Marinovska et al., 2022). Основната молекула, действаща срещу окислителни повреди, е глутатионът и общото вътреклетъчно количество на този трипептид е важен параметър за измерване на нивата на оксидативно увреждане. Ето защо не е изненадващо, че след излагането на LD₅₀ доза на зеоцин и при трите вида дрождеви популации се наблюдават повишени вътреклетъчни нива на глутатион, като най-високи стойности бяха установени при логаритмично растящи клетки (2,5кратно увеличение), където и нивото на нарушени липиди е най-високо (Фиг. 34). При клетките в G₀ състояние също се отчита индукция на биосинтезата на глутатион, но тя е само с около 30 % по-висока, което вероятно се дължи на по-слабия токсичен ефект на този токсичен агент върху тези дрождеви популации. Тези открития корелират и с наблюдаваната тенденция за вътреклетъчните ROS нива на изследваните дрожди. При апоптозните NQ клетки 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. 35).

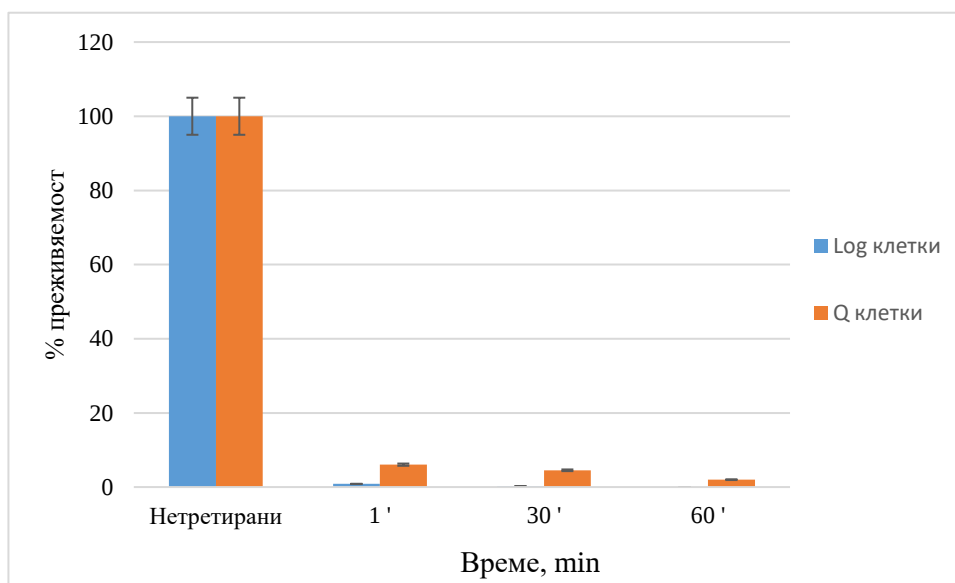


Фигура 35: Преживяемост при Log и Q клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с различни концентрации зеоцин

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. Едно логично обяснение на този факт е свързано със един от специфичните механизми на действие на този ксенобиотик – нарушаване структурата на клетъчната ДНК. G₀ клетките от своя страна се характеризират с наличието на кондензирани хромозоми (Pinon., 1978), които правят молекулата на ДНК по-добре защитена от токсичното влияние на редица екзогенно добавени стресови агенти, включително и на зеоцин.

Устойчивостта на двете дрождеви клетъчни популации към зеоцин бе проследена и след прилагане на LD₅₀ = 50 µg/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. 36). Независимо обаче от този наблюдаван ефект отново Q дрождевите клетки показват значително по-висока устойчивост на действието на този ксенобиотик, което представлява важна информация от медико-биологична гледна точка – метаболитно неактивните еукариотни клетки, намиращи се в G₀ клетъчен цикъл, са много по-слабо податливи на действието на

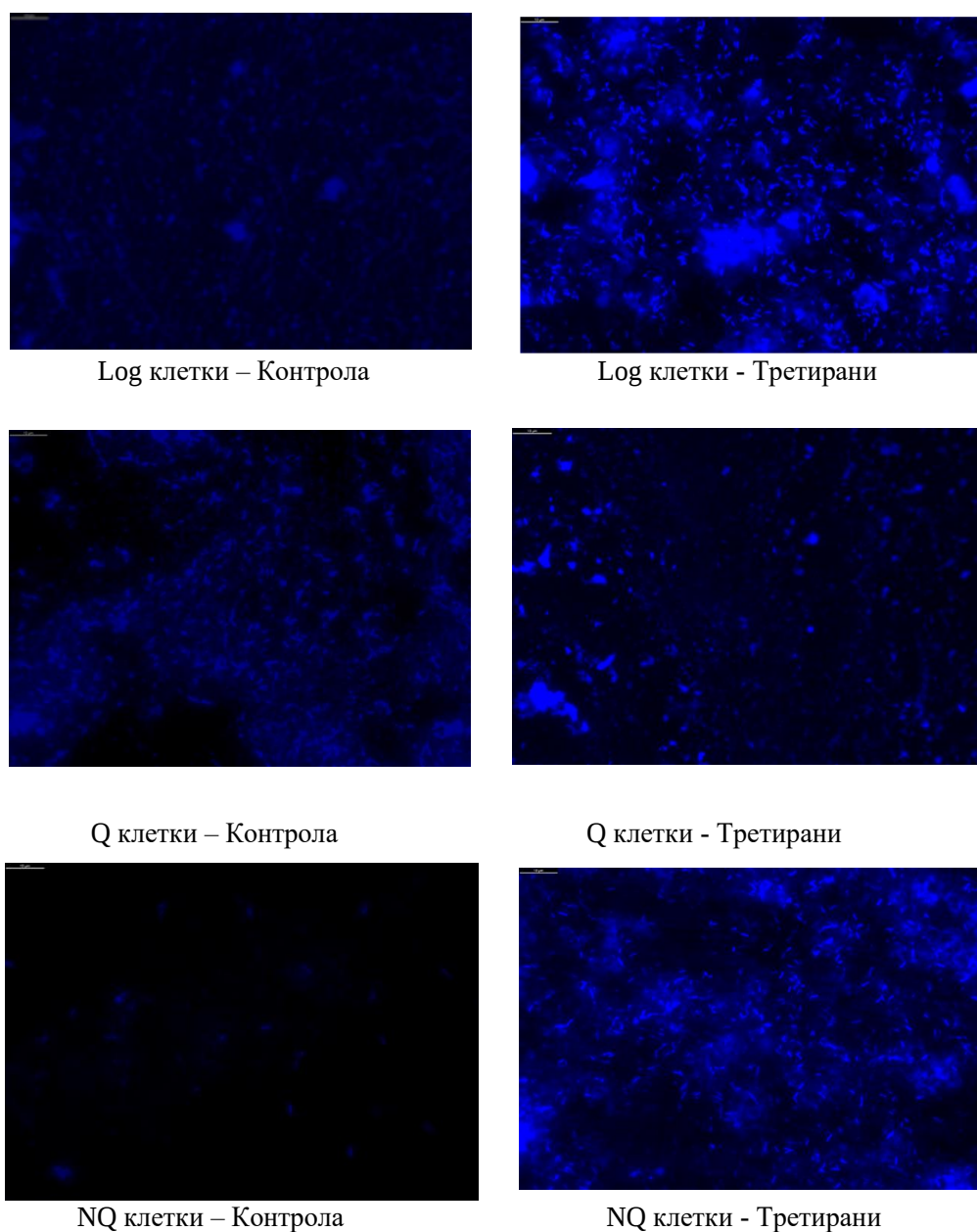
гликопептидните антибиотици, които имат способността да причинява едно- или двойноверижни разриви в молекулата на ДНК и в клиничната практика се използват като антитуморни агенти.



Фигура 36: Преживяемост при Log и Q клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 след третиране с 50µg/ml зеоцин за различно време

Следваща стъпка в изучаването на токсичния ефект на зеоцин бе отчитането на индуцираните повреди от LD₅₀ доза на зеоцина в дрождеви митохондрии, изолирани от експоненциална и стационарна фаза на растеж. Измененията в структурата на митохондриалната ДНК и концентрацията на ROS бе проследена посредством специфичното оцветяване с флуоресцентните багрила DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол) и Rhodamine 123, съответно.

DAPI е ДНК-чувствителен флуорохром и чрез отчитане промяната в интензитета на флуоресценция може успешно да бъде използван за характеризиране на степента на ДНК повреди (Saadat et al., 2015) (Фиг. 37).



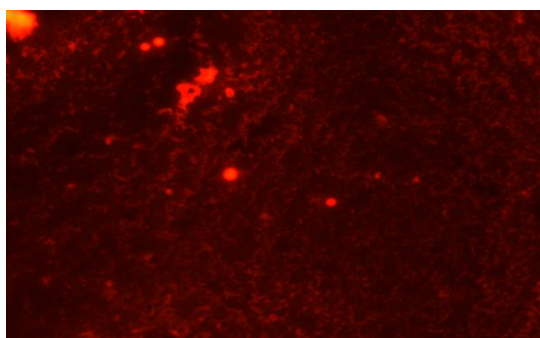
Фигура 37: DAPI флуоресцентен анализ на митохондриална ДНК при Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741, третиращи с 50 µg/ml зеоцин

От представените резултати се вижда, че зеоцинът упражнява силен токсичен ефект и в митохондриите на трите клетъчни популации на *S. cerevisiae*. Най-високият интензитет на флуоресценция на DAPI е отчетен 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 по-високи нива

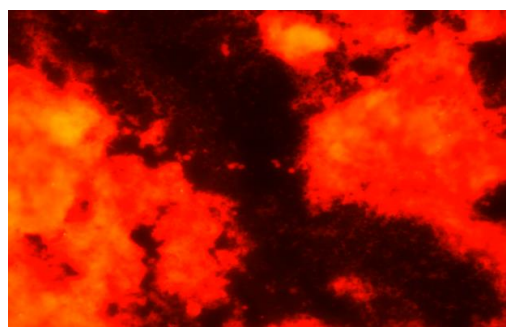
на едно- и двуверижни разриви в митохондриалната ДНК, след въздействие с този токсичен агент, като резултатите са сравнени с тези, наблюдавани при контролните култури.

Следващата стъпка бе провеждането на флуоресцентен анализ след оцветяване на дрождевите митохондрии с родамин 123. Родамин 123 е катионен флуоресцентен маркер за натрупване на ROS, като багрилото се разпределя в зависимост от отрицателния мембранен потенциал на вътрешната митохондриална мембрана (Ludovico et al., 2001). Загубата на потенциал води до загуба на багрило и следователно до намаляване на интензитета на флуоресценцията. В много изследвания това багрило успешно се използва за наблюдение на митохондриалната функция и генерираните на ROS в живите клетки.

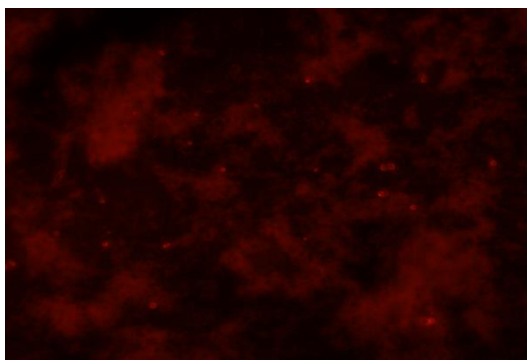
Третирането на митохондриите на трите дрождеви популации със зеоцин и последващото им оцветяване с родамин 123 показва отново, че най-ниска концентрация на генерирани ROS се наблюдава при Q клетките (Фиг. 38), който факт вероятно е свързан с по-високата обща устойчивост на тези клетъчни популации към различни видове стрес. Получените данни са в тясна корелация с литературните такива, според които G₀ клетките са устойчиви на редица вредни въздействия (Gray et al., 2004). При NQ клетките картината е съвсем различна, при тях интензитетът на флуоресценция е в пъти по-силен от този, наблюдаван при контролните, нетретираните клетки, което още веднъж потвърждава тяхната слаба устойчивост и бърза загуба на преживяемост. В активно делящите се логаритмични клетки също се наблюдава значително покачване на интензитета на флуоресценция, което допълнително потвърждава ролята на зеоцина не само в нарушаването структурата на ДНК, но и в индуцирането на оксидативен стрес в клетката и нарушаването на редокс хомеостазата.



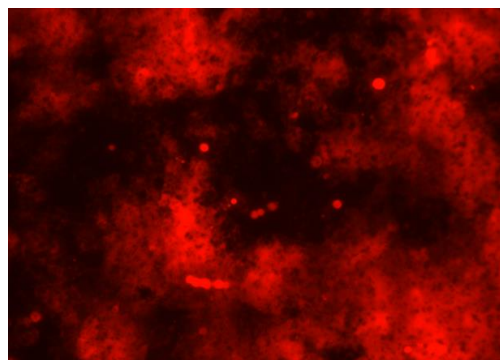
Log клетки – Контрола



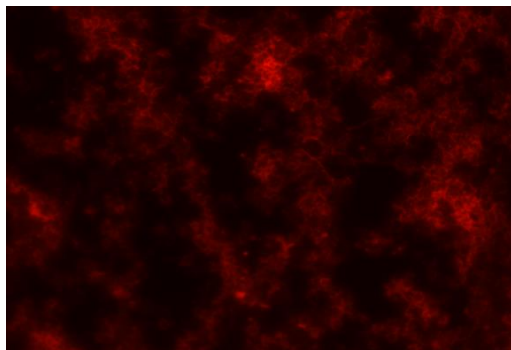
Log клетки - Третирани



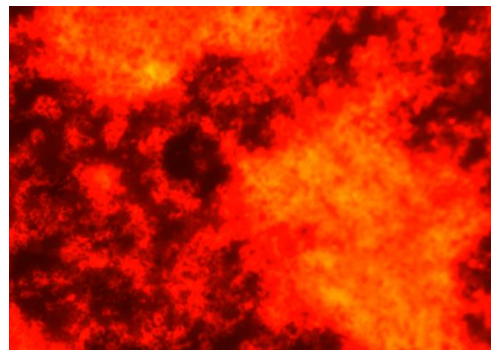
Q клетки – Контрола



Q клетки - Третирани



NQ клетки – Контрола



NQ клетки - Третирани

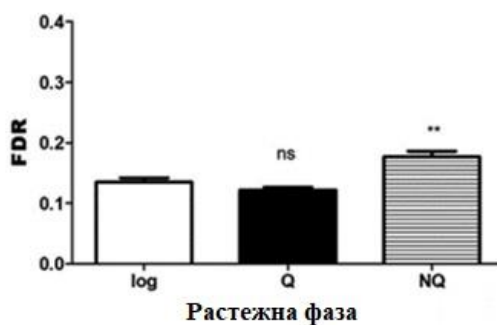
Фигура 38: Определяне нивата на генерирани ROS след третиране на митохондриални фракции на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741 с 50 $\mu\text{g/ml}$ зеоцин спрямо интензитета на флуоресценция след оцветяване с Rhodamine 123

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 (constant field gel electrophoresis).

2.1.3.1. Двойноверижни разриви в ДНК след третиране със зеоцин

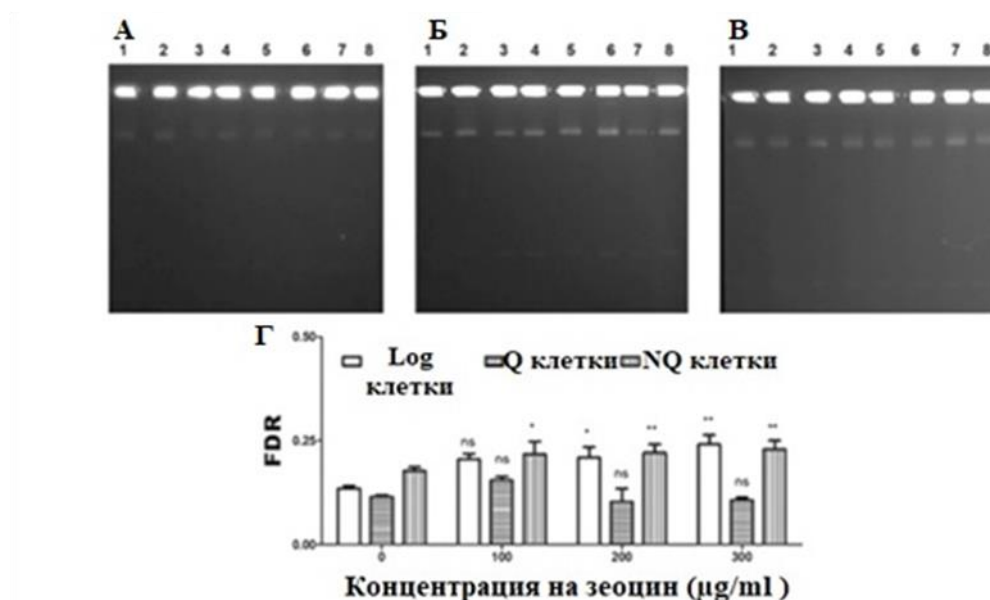
Изследвани бяха нивата на спонтанни двойноверижни разриви при трите дрождеви популации на щам *S. cerevisiae* BY4741. Около 1,5 пъти по-високи нива на DSBs бяха измерени в NQ клетките в сравнение с тези, установени при експоненциално растящи дрожди или намиращи се в G₀ състояние. Не беше установена значителна разлика между нивата на DSBs в логаритмични и Q клетки (Фиг. 39).



Фигура 39: Спонтанни нива на DSBs в зависимост от растежната фаза при щам *S. cerevisiae* BY4741

Беше установено, също така, че фазата на растеж е много важен фактор за чувствителността на ДНК на *S. cerevisiae* към зеоцин. След третиране на трите дрождеви популации с този токсичен агент бяха установени приблизително сходни нива на

индуцирани DSBs както в логаритмични (Фиг. 40 А, Г), така и в NQ клетки (Фиг. 40 В, Г). Не беше наблюдаван значителен ефект на този радиомиметик при клетки в покой, независимо от приложената концентрация (Фиг. 40 Б, Г). Измерените нива на DSB при G₀ клетъчните популации след излагане на действието на зеоцин бяха сравними със спонтанните нива, измерени при нетретираните клетки.



Фигура 40: Индуциране на DSBs в *S. cerevisiae* BY4741, в зависимост от растежната фаза след третиране със зеоцин в концентрации 100-300µg/ml. **А** - клетки в логаритмична фаза, **Б** - Q клетки, **В** – NQ клетки. 1, 2 – контроли; 3, 4 - третирани със 100 µg/ml зеоцин; 5, 6 - третирани с 200 µg/ml зеоцин; 7, 8 - третирани с 300 µg/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. Установено бе, че при логаритмично растящите клетки той е най-висок, тъй като са им необходими само 60 минути време за възстановяване.

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

Логичната причина за това най-вероятно се крие във факта, че при клетките, намиращи се в експоненциална фаза на растеж, поправящите механизми са по-силно изявиени. От друга страна, при NQ клетките се отчита загуба на способност за репарация на индуцирани от зеоцин DSB въпреки периода от време (1 час) (Таблица 1).

Като се има предвид тяхната природа (метаболитно 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.

Всъщност двуверижните скъсвания в ДНК (DSB) водят до силни увреждания, които могат да инициират пренареждане на генома. В своите изследвания Delacote and Lopez., (2008) установяват, че съществуват два основни пътя, които се конкурират за възстановяване на DSB: хомоложна рекомбинация (HR) и нехомоложно крайно свързване (NHEJ). В зависимост от фазата на клетъчния цикъл, изборът на един път за възстановяване на DSB пред другия, осигурява поддържане на стабилността на генома или съответно увеличава риска от генетична нестабилност. Това показва, че двата пътя за възстановяване на DSB могат да се конкурират през различните фази на клетъчния цикъл и подчертава важността на връзката между контролната точка и изборът на подходящ път за възстановяване на ДНК и поддържане на стабилността на генома.

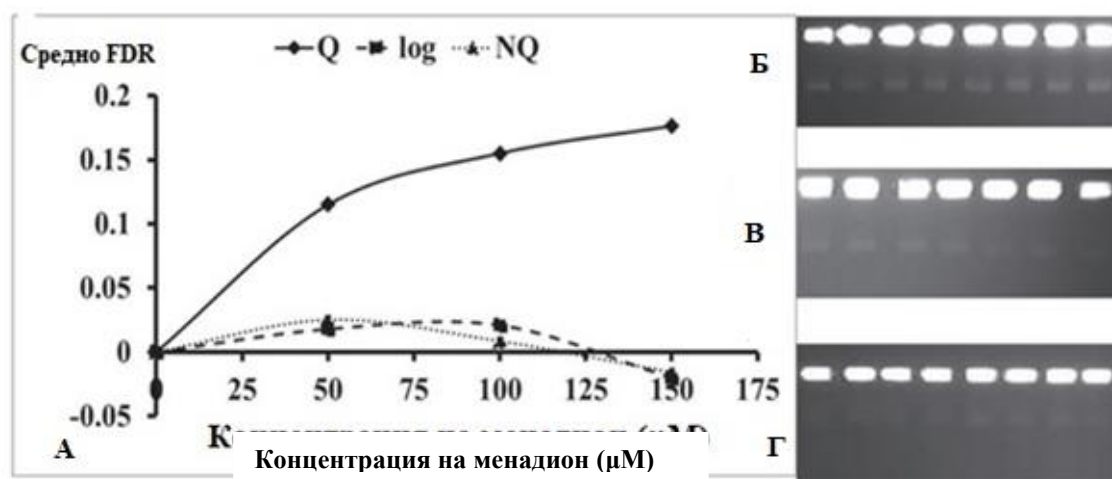
В резултат на проведените изследвания беше установена специфичната способност на зеоцина да индуцира двойноверижни разкъсвания в ДНК (DSB) на дрожди и беше определена зависимостта на този ефект от специфичната фаза на растеж, в която се намират дрождевите клетки. Най-високите нива на спонтанни DSB бяха наблюдавани в NQ клетките. Такива резултати не са изненадващи, като се има предвид фактът, че те представляват фракцията от стационарни клетки с много ниска способност за възпроизвеждане и склонност към навлизане в апоптоза (Marinovska et al., 2022). Сходни разлики в спонтанните нива на DSB, зависещи от фазата на растеж, също са наблюдавани и в други щамове на *S. cerevisiae* (Todorova et al., 2015b, 2019). Наблюдаваната статистически значима индукция на DSB в логаритмични клетки след третиране с концентрации, равни или по-високи от 200 µg/ml зеоцин е в добро съответствие с полученото от други автори върху щам *S. cerevisiae* D7ts1 (Todorova et al., 2019). В NQ клетки бяха открити значително по-високи нива на DSB в сравнение с Q и Log клетките. Въпреки това, навлизането в G₀ клетъчният цикъл значително влияе върху нивата на DSB, като ги прави по-устойчиви. При използването на зеоцин като индуциращ агент за образуване на DSB тенденцията се запазва. Най-устойчиви на неговото действие

са клетките, навлезли в G₀ състояние. Наблюдаваната устойчивост на клетките в покой най-вероятно се дължи на техните специфични морфологични и метаболитни характеристики. Те притежават удебелени клетъчни стени, силно кондензирани хромозоми и в резултат на това ограничена способност на зеоцин да прониква в клетката с последващо свързване на целевата ДНК молекула (Gray et al., 2004; Allen et al., 2006).

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).

Получените данни показаха, че повишаването на нивата на ROS в Q клетките, в резултат от действието на менадиона (Фиг. 23), съответства с понижаването на клетъчната преживяемост (Фиг. 18) и води до добре изявената индукция на DSB в ДНК. Противоположно на зеоцина генотоксичния ефект на менадиона в Q клетките (Фиг.41 А, Б) 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 и следователно допринася за по-ефективното нарушаване на ДНК (Allen et al., 2008). Допълнително, много ниската метаболитна активност в тях обуславя и намаления им репарационен капацитет. При другите две дрождеви клетъчни популации (Log – Фиг.41 А, В и NQ – Фиг. 41, А, Г) не беше установено значително повишаване на нивата на DSB, който факт корелира и с ниските отчетени нива на ROS при тях след третиране с менадион.



Фигура 41: 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 резултати са и в съответствие с изследванията на Nutter et al., (1992), които показват, че менадионът може да индуцира единичен (s)- и двойно (ds)-верижни разкъсвания на ДНК в човешки MCF-7 клетка, като това увреждане на ДНК е медирано чрез формирането на хидроксилен радикал.

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

Организми, с опростена клетъчна организация като бактериите или толкова сложни като бозайниците, са изложени непрекъснато на безброй биохимични или физически сигнали, произхождащи от клетката или околната среда. С цел да се активират подходящи клетъчни реакции, всички организми са развили специфични рецептори, които да усещат различни сигнали и да предават информацията чрез взаимосвързани сигнални мрежи към ефекторни протеини. Докато биохимичното сигнализиране е изследвано отдавна, широко разпространеното значение на механичните сили в клетъчната биология беше оценено едва наскоро. Наистина, клетъчният отговор на физически стимули в различните микросреди е в основата на разнообразни физиологични процеси от развитието и размножаването на организмите до настъпването на различни патологични изменения. Физичните фактори определят формата, функциите и подвижността на клетките и управляват програмите за развитие като ембриогенезата. Когато са нарушени, абнормалните механизми за обратна връзка са свързани и с няколко патологични състояния при човек, включително мускулна дистрофия, нарушение на

слуха, поликистоза на бъбреците и прогресия на рака. Ето защо използването на дрождевите микроорганизми като моделна система на еукариотната клетка, за изучаване ефекта на различни физични фактори върху клетъчната преживяемост и нормалното функциониране, е от ключово значение. Още повече, дрождевите клетки в покой се характеризират с по-голяма устойчивост към действието на различни видове стрес. В неблагоприятна среда те трябва да останат не само жизнеспособни, но и при подходящи условия да съумеят да навлязат отново в пролиферативния клетъчен цикъл по строго регулиран начин.

Във връзка с това, следваща стъпка в изследванията беше да се проучи ефекта на екстремални стойности на няколко физични фактора върху жизнеспособността на G_0 клетки от щам *S. cerevisiae* BY4741.

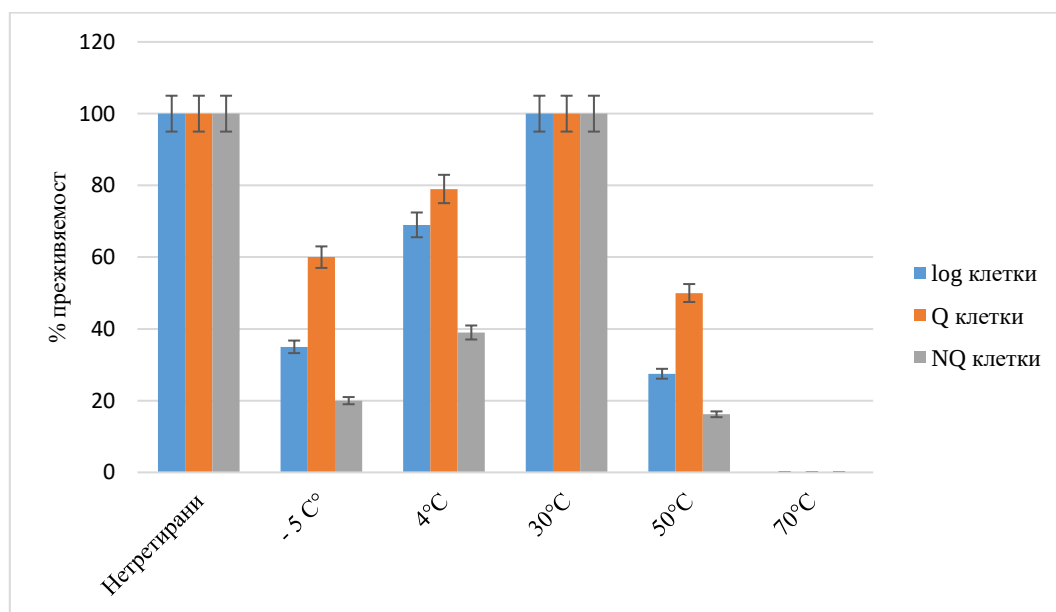
2.2.1. Ефект на температурата върху преживяемостта на дрождевите клетки *S. cerevisiae* BY4741

Температурата е параметър на околната среда, който значително влияе върху растежа на микроорганизмите, тъй като оказва влияние върху активността на всички ензими в метаболитната мрежа в клетката. Това е особено важно в местообитания, където има големи температурни промени, ежедневни или сезонни. Разбирането как организмите се адаптират към различните температури може да предостави и ценна информация за разработването и оптимизирането на щамове, използвани в промишлени процеси, където се изискват под или надоптимални температури. Независимо обаче, че съществуват множество изследвания относно влиянието на разнообразни температури върху дрожевия растеж, много малко или почти нищо не се знае за ролята на този фактор върху растежа в зависимост от фазата на клетъчния цикъл. За целта в настоящия дисертационен беше изследван ефекта на различни температури (-5°C , 4°C , 30°C , 50°C и 70°C) върху преживяемостта на три различни клетъчни популации на щам *S. cerevisiae* BY4741 – Log, Q и NQ. Получените резултати показаха, че G_0 клетките са най-устойчиви при всички изследвани температури (Фиг. 42). 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. Установен бе температурен оптимум при 30°C , което е в абсолютно съответствие с данните в литературата (Cheung et al., 2014). По-високата преживяемост на дрождите в G_0 състояние вероятно е свързана и с техните специфични характеристики – понижена метаболитна активност, което от своя страна ги прави по-стабилни на въздействие с

различни екзогенни стресови фактори. Освен това високото съдържание на трехалоза в G_0 клетките служи като енергиен резерв, но също така обуславя и тяхната устойчивост при екстремни температури. Доказано е, че този дизахарид се използва за предпазване от стрес, чрез действие като химичен шаперон или осмолит (Crowe et al., 1992; Singer and Lindquist., 1998b). Трехалозата се натрупва при различни стресови условия и повишаването на нивата ѝ са свързани с повишаване на способността за оцеляване след приложен термичен стрес и изсушаване (Singer and Lindquist., 1998a; Kandrор et al., 2004).

При всички изследвани температури NQ клетките се отличаваха с най-ниска преживяемост за разлика от тази при останалите две клетъчни популации, което най-вероятно се дължи на факта, че те притежават геномна нестабилност, лесно лизират и реално могат да осигуряват хранителни вещества за тези, навлезли в G_0 състояние (Aragon et al., 2008).

Преживяемостта на Log клетки беше най-висока в диапазона 4 – 40°C и рязко спаднаше при температури $\leq 4^\circ\text{C}$ или $\geq 50^\circ\text{C}$. Тези данни напълно съответстват с литературните данни, съгласно които оптималната температура на растеж на *S. cerevisiae* е около 30°C (Salvado., 2011). При ниски температури (1-10°C), клетките все още са жизнеспособни (Arthur and Watson., 1976). Темпът на растеж се увеличава при температури от 28°C до 37°C, докато в температурния диапазон от 39°C - 40°C растежът намалява, а клетките от своя страна започват да губят своята жизнеспособност (Miyazaki., 2005).



Фигура 42: Влияние на температурата върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae*

BY4741

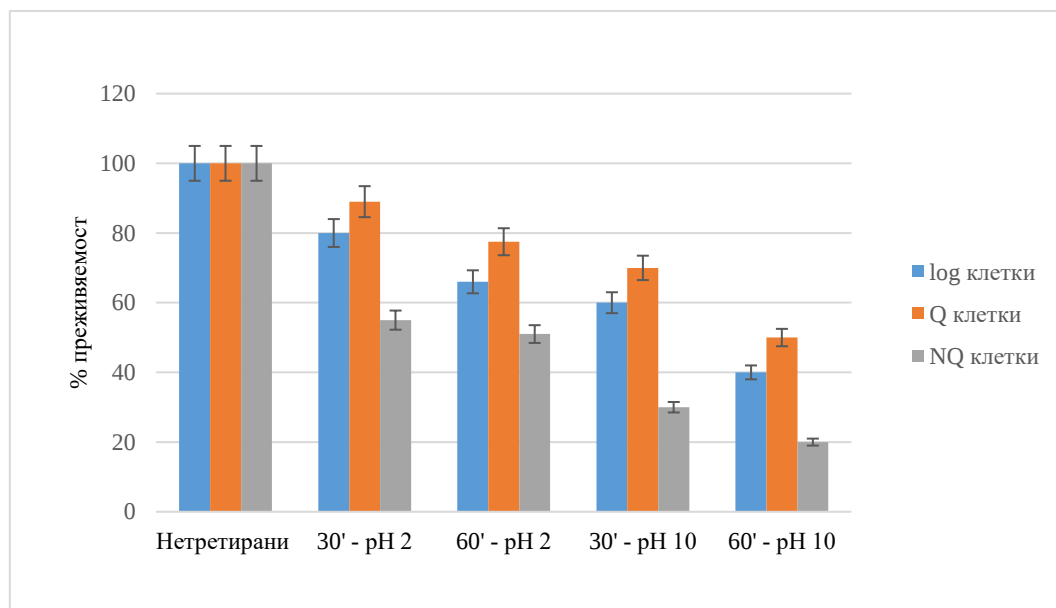
Факторите, които оказват влияние върху растежа на микроорганизмите при определени температури са различни и функционират в комплекс. Максималната температура на растеж на дрождите се контролира, поне от части, от термолабилността на техните ензими и ензимно-свързани системи (Evison and Rose., 1965; Hagen and Rose., 1962), както и от строежа и пропускливостта на клетъчните мембрани (Merritt., 1966; Kuiper et al., 1972; Lewis and Kuiper., 1972;). Ето защо и G₀ клетките се характеризират с по-висока устойчивост на действието на супраоптимални температури, тъй като те вече имат редица видоизменения, които допринасят и за оцеляването им в тези условия.

Установено е, че резките промени в околната среда и физикохимичните стимули, включително температура, рН, редокс състояние, токсични съединения и изчерпване на хранителните вещества, предизвикват верига от защитни реакции чрез активиране регулацията на гените, кодиращи протеините за топлинен шок (HSPs) в клетките (Sanchez and Lindquist., 1990; Virgilio et al., 1991; Verghese et al., 2012; Raina et al., 1995; Missiakas et al., 1997; Glover and Lindquist., 1998; Ishihama, 1999; Ades., 2004; Calamini and Morimoto., 2012). Същевременно обаче, една от метаболитните промени, които претърпяват дрождевите клетки, за да навлязат в състояние на покой, е именно активиране експресията на тези специфични протеини. Ето защо те са частично подготвени да противодействат на вредното въздействие на високата температура.

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

Изследването влиянието на извънклетъчното рН е важно условие, което определя много аспекти в биологията на еукариотната клетка. Изучаването на дрождите *S. cerevisiae* като моделен организъм, е ценен подход за оценка на ефекта на този фактор на средата и как той въздейства върху специфични аспекти на клетъчния жизнен цикъл. Norkrans., (1966) установява, че *S. cerevisiae* спира да расте при рН 8.0. Съвсем наскоро ефектът от високото рН (≥ 8.0) е изследван и по отношение на промените в генната експресия и синтеза на редица ензими (Vogel and Hinnen., 1990; Peñalva and Arst., 2002; Platara et al., 2006; Ariño., 2010). Независимо обаче, от натрупаните данни в тази област, ролята на различните физиологични и биохимични процеси за осигуряване на рН толеранс при дрожди не е напълно изяснена. Точно поради тази причина, в настоящия дисертационен труд беше изследвано влиянието на много ниски и много високи стойности на рН върху преживяемостта на трите клетъчни популации. Ефектът на киселинен стрес (рН - 2.0), приложен за различно време (30 и 60 min.), върху жизнеспособността на клетки в G₀ състояние беше оценен, чрез определяне процента на

преживели клетки въз основа на формирани единични колонии (CFU/ml). Като контрола бяха използвани нетретираните клетки.



Фигура 43: Влияние на рН върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

След инкубиране в кисела среда (рН 2.0) за 30 минути, беше отчетена приблизително 90 % преживяемост за G_0 клетките, за разлика от пролифериращите клетки, при които преживяемостта беше 80 % (Фиг. 43). Увеличаването на времето за третиране беше свързано с по-значителен спад в преживяемостта на пролифериращите клетки, като при 60 min инкубация само 60 % от клетките остават жизнеспособни. При същите условия G_0 клетките показват близо 80 % преживяемост. Този факт най-вероятно се дължи на комплексното влияние на клетъчните характеристики, които обуславят по-висока устойчивост в състояние на покой при неблагоприятни условия. И при трите клетъчни популации беше отчетен по-висок процент преживели клетки след инкубация при кисело рН, в сравнение с преживяемостта на клетките при силно алкално рН. По-високият процент жизнеспособни клетки при тези условия съвпада с литературните данни, в които ясно е описано, че повечето щамове на *S. cerevisiae* растат при рН между 2.5 и 8.5, но по своята същност те са ацидофилни микроорганизми, които растат по-добре в кисела среда (Carmelo et al., 1997). Както се вижда от Фиг. 43, при клетките в експоненциална фаза се наблюдава по-ниска преживяемост, което се предполага, че е свързано с по-високата им метаболитна активност. Rothstein and Demis., (1953) показват, че както добавянето на K^+ при ниско рН, така и повишаването на рН на средата до около

6,0 увеличават скоростта на ферментация при дрожди. Наличието на K^+ и високото рН по изключителен начин могат не само да стимулират ферментацията, но и дишането (Peña et al., 1969). Това се дължи на симулацията на H^+ -АТФазната активност на плазмената мембрана (Peña et al., 1972), която е основният механизъм за подкисляване на средата и транспорт на K^+ в дрождите. И когато нивата на H^+ в околната среда са абнормални, това директно повлиява метаболитните процеси в активно делящите се дрождеви микроорганизми. Известно е също така, че в експоненциална фаза на растеж дрождите *S. cerevisiae* показват големи промени и във вътреклетъчното си рН в зависимост от концентрацията на водородните йони в средата (Conway and Downey., 1950; Peña et al., 1972, 1995; Calahorra et al., 1998).

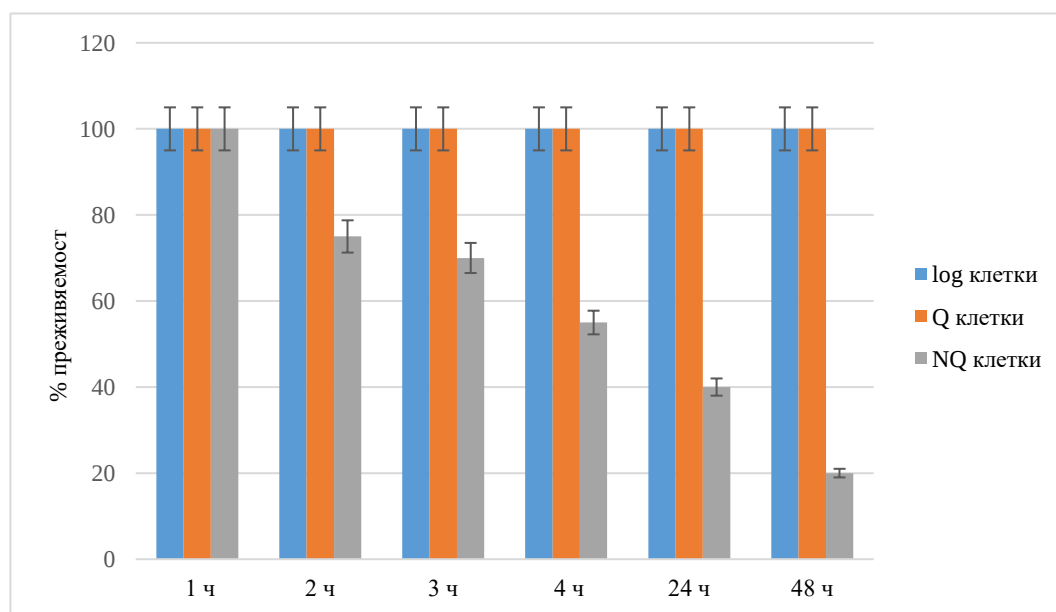
При апоптозните NQ клетки се наблюдава най-ниска преживяемост, най-вероятно поради намалената им способност за възпроизвеждане и формиране на дъщерно потомство, с което бързо губят възможност да се възпроизвеждат, тъй като ~50% от тези клетки са репродуктивно некомпетентни (Aragon et al., 2008).

Друг процес, който значително се повлиява в резултат на драстични изменения на рН на средата е клетъчната диференциация при дрожди *S. cerevisiae*. При тези еукариотни микроорганизми е възможно активирането на две различни програми за диференциация - хаплоиден растеж и спорулация, като и двете се инхибират при растеж в кисела среда (Hayashi et al., 1998; Li and Mitchell., 1997). Вегетативният растеж на *S. cerevisiae* протича при сравнително широк диапазон от стойности на външно рН, но определено е по-ефективен при кисело, отколкото при неутрално или алкално рН и всъщност повечето лабораторни щамове трудно могат да пролиферират в буферирана среда над рН 8.0–8.2. Поддържането на желана киселинна среда се основава предимно на активното изпомпване на протони, медирано от плазмената мембранна H^+ -АТФаза, кодирана от основния *PMA1* ген (Serrano et al., 1986). Pma1 е най-разпространеният протеин на плазмената мембрана и неговата електрогенна активност създава електрохимичния градиент на протоните през плазмената мембрана и е от решаващо значение за поддържането на цитозолната рН хомеостаза, заедно с вакуоларната H^+ -АТФаза, с която той изглежда е координирано регулиран (Munoz and Kane., 2008). Нарушаването на този процес най-вероятно е и основната причина за наблюдаваната много бърза загуба на жизнестойност в условия на високи извънклетъчни стойности на рН – 30 % загуба за 30 min и над 50 % след 60 min.

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

2.2.3.1. Влияние на хипоосмотичен стрес

Отговорът към осмотичен стрес най-често е свързан с вътреклетъчното натрупване на осмолити като глицерол, арабитол, манитол и еритритол (Brown and Simpson., 1972; Brown., 1974; Yancey et al., 1982; van Eck et al., 1993). Способността да се синтезират, съхраняват или изнасят тези осмолити е добре контролиран процес и изглежда е присъща характеристика на всички живи организми при справянето с осмотичния стрес (Kayingo et al., 2001). Ефектът на хипоосмотичен стрес върху преживяемостта на трите дрождеви клетъчни популации беше изследван, след суспендиране на клетките в дестилирана вода (Фиг. 44). Установено бе, че както активно растящите клетки, така и тези в състояние на покой, дори след 48 часово третиране, запазват 100 % жизнеспособност. За разлика от тях, апоптозните NQ клетки бързо губят своята жизнеспособност при създадените условия и след 48 часа само 20 % от тях запазват способност да се репродуцират.



Фигура 44: Влияние на хипоосмотичните условия на средата върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Еукариотните клетки реагират на хипоосмотичен шок чрез бързо освобождаване на осмолити. Доказано е, че пъпкуващите дрожди от род *Saccharomyces* екскретират вътреклетъчен глицерол под влияние на хипоосмотичен шок и това освобождаване се контролира от MIP семейство от канални мембранни белтъци и по-специално от белтък

Fps1p (Luyten et al., 1995). Fps1p се активира по време на хипоосмотичен стрес и се деактивира при настъпване на хиперосмотични условия като по този начин се контролира натрупването и освобождаването на глицерол по време на осморегулацията.

Проучвания, свързани със *S. cerevisiae* показват, че значителна загуба на жизнеспособност, след хипоосмотичен шок, възниква в клетки, които са дефектни по износа на осмолит (Luyten et al., 1995), което вероятно е и основната причина за бързата загуба на жизнеспособност при NQ клетките. От друга страна, основна предпоставка за противодействие на хипоосмотичния шок е наличието на ригидна клетъчна стена при тези микроорганизми, което обуславя и липсата на ефект при Log и Q клетките. В потвърждение на това може да се посочат изследвания на други автори, които показват че мутации, засягащи сигналния път на протеин киназа С (PKC), водещ до отслабване здравината на клетъчната стена, води и до по-висока чувствителност на осмотичен стрес (Lee and Levin., 1992). Допълнително, по литературни данни е доказано, че клетките, намиращи се в стационарна фаза притежават термо и осмотолерантност (Plesset et al., 1987), което потвърждава получените резултати.

2.2.3.2. Влияние на хиперосмотичен стрес

При прилагане на хиперосмотичен стрес, в клетките се активират редица физиологични промени, които включват: освобождаване на вътреклетъчното водно съдържимо, бърза редукция на тоталния клетъчен обем, включително и вакуоли (Albertin et al., 1994); преходно нарастване на получените продукти на гликолизата (Allison et al., 1999), усвояването на цитозолния глицерол и активиране на HOG (Hyper Osmotic Glycerol) сигнален път (Bellinger and Larher., 1987). Осмоадаптационните механизми в активно делящи се клетки на *S. cerevisiae* са добре проучени, но малко се знае относно реакцията на различните дрождеви популации, които вече са навлезли в стационарна фаза на растеж и съответно преминават в G₀ състояние или активират процесите на програмирана клетъчна смърт.

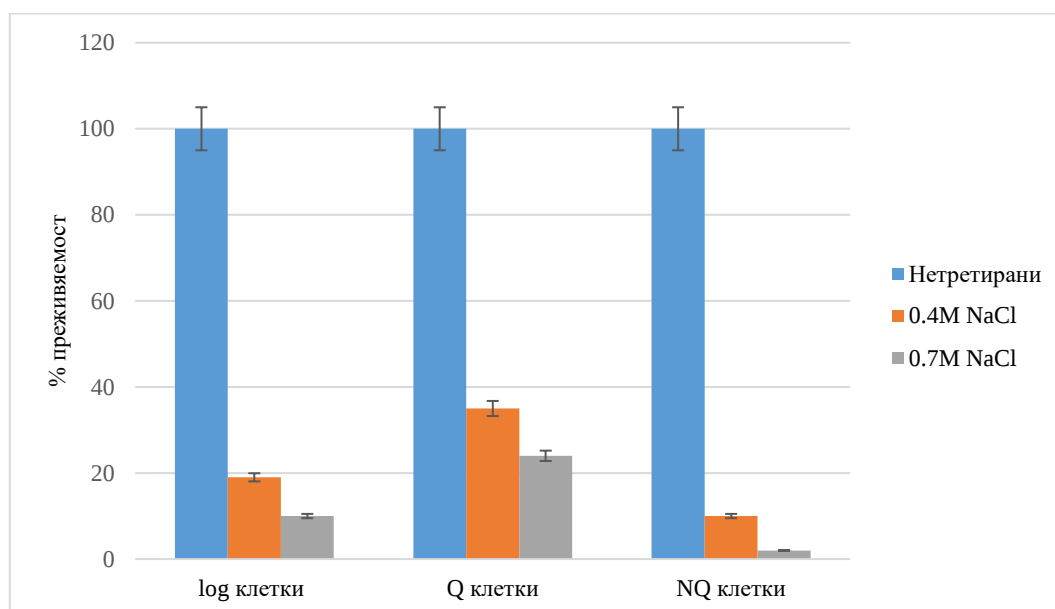
Натриев хлорид

Излагането на дрождевите клетки високи концентрации на NaCl води до бързо освобождаване на вода в средата, с което клетката се дехидратира. Дехидратацията е бърз процес, медиран единствено от освобождаването на водното съдържимо през липидния бислой. Вътреклетъчната вода се поддържа в определени граници от вакуолата в цитоплазмата, като по този начин частично се компенсира от внезапното

увеличаване на макромолекулната концентрация. Освен това цитоскелетът се разрушава, което води до деполяризация на актиновите нишки и в резултат се наблюдава спиране на клетъчния растеж. При тези условия клетъчното препрограмиране или „адаптация“ представлява основна защита, включително натрупване на съвместими разтворени вещества, за балансиране на вътреклетъчното осмотично налягане с външната среда. Съвместимите разтворени вещества могат да бъдат: глицерол, трехалоза, аминокиселини и мастни киселини в клетъчната мембрана.

Микроорганизмите, като дрождите *S. cerevisiae*, развиват системи за контролиране ефекта след приложен осмотичен стрес, като този с NaCl. Именно във връзка с това беше изследвана преживяемостта на популации от NQ, Q и логаритмично растящи клетки, след излагане на високи солеви концентрации. 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. 45). Получените данни показаха по-висока устойчивост на клетките в G₀ състояние, в условия на осмотичен стрес, от пролифериращите клетки и при двете изпитвани концентрации на натриев хлорид. След инкубирането им в среда с 0.4 M натриев хлорид беше отчетена 35 % преживяемост на клетките в покой, за разлика от пролифериращите клетки, при които преживяемостта е 19 %. Поставени в среда с по- висок осмотичен потенциал (0.7 M NaCl), процентът жизнеспособни клетки намалява и при G₀ клетките той е 24 %, а при пролифериращите - 10%.

При условия на дехидратация, апоптозните NQ клетки бързо губят своята жизнеспособност, което напълно отговаря на схващането, че те са най-неустойчиви към действие с редица вредни въздействия.



Фигура 45: Влияние на 0.4 и 0.7M NaCl върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

По-специално, предизвикания стрес, вследствие прилагането на висока солева концентрация, води до два различни феномена: йонна токсичност и осмотичен стрес. Защитните реакции към стрес, причинени от въздействие с NaCl, се основават на осмотични корекции, чрез синтеза на осмолити и активиране на системи за износ на натрий. Когато дрождевата клетка се намира в състояние на осмотичен стрес, основният осмолит, който се усвоява от клетките е глицеролът (Crowe et al., 1984; Blomerg and Adler., 1992; Blomerg., 2000;). Други продукти, които се синтезират по време на стресови условия са трехалоза и гликоген, които заедно представляват 25 % от сухата клетъчна маса, в зависимост от условията на околната среда. Дизахаридът трехалоза се усвоява от клетките не само по време на третиране с NaCl (Dmitrieva et al., 2004; Hamilton et al., 2002), но и в отговор на определени стресови условия, като всъщност тя предпазва клетките от действие с висока температура, чрез стабилизиране на протеини и направляване на мембранната пропускливост (Miller., 1959; Lans et al., 1991; Meikle et al., 1988). Вероятно това е и основната причина Q клетките да се характеризират с по-голяма устойчивост към високи концентрации на NaCl в средата, тъй като те натрупват трехалоза (за преживяване на неблагоприятни условия) в процеса на гладуване и преминаването в G₀ клетъчен цикъл (Lilie and Pringle., 1980). За разлика от тях, активно делящите се клетки нямат складирани запаси от този метаболит и следователно по-малка част от тях успяват ефективно да отговорят на индуцираният от високите концентрации на NaCl хиперосмотичен стрес.

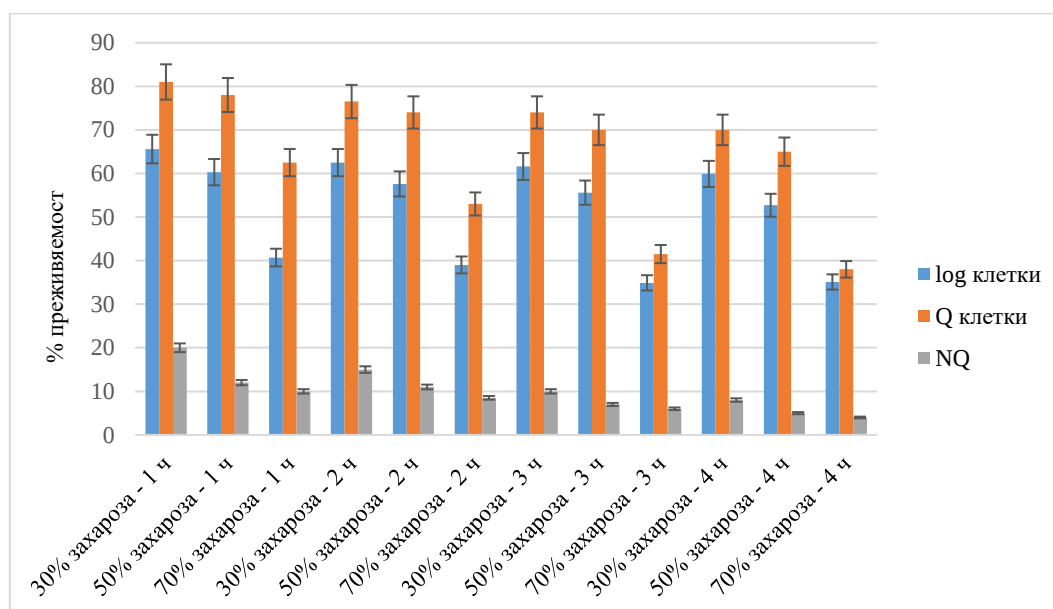
Захароза

Дрождите са едни от най-широко използваните продуценти на биотехнологични продукти и захарозата е често използван основен източник на въглерод за различни производства. Установено е, че тя се транспортира директно в клетките на *S. cerevisiae*, без да е необходимо да бъде предварително хидролизирана в околната среда (Mwesigye and Barford., 1994; Badotti et al., 2008;). Вътре в клетката, консумирането ѝ започва с хидролиза чрез инвертаза, разположена в периплазматичното пространство. Впоследствие, получените монозахариди (глюкоза и фруктоза) преминават в цитоплазмата на клетките чрез облекчена дифузия и стават достъпни след вътреклетъчно фосфорилиране чрез глюको- и хексокинази, които участват в първата стъпка в пътя на Ембден-Майерхоф-Парнас (Marques et al., 2017). Високите концентрации на захароза в състава на хранителните среди обаче, биха предизвикали хиперосмотичен стрес в клетките и биха затруднили или дори прекратили ферментационния процес. Например, сладкото тесто може да съдържа до 30 % добавена захароза, тъй като по-високи концентрации водят до осмотичен стрес (Reed and Nagodawithana., 1991). По литературни данни (Barnett et al., 2016) е установено, че концентрация на захароза между 3 - 4 % е най-оптимална за протичане на ферментационните процеси. Допълнително захарозата играе важна роля в процеси като осморегулация, толерантност към различни температури и изсушаване, клетъчно сигнализиране, транспорт и съхранение на въглерод (Lunn., 2008). Тъй като захарозата е нередуцираща захар, тя може да се натрупва във високи количества вътре в клетките, без да реагира с белтъци или други молекули. Ето защо, следваща стъпка в характеризирането на трите клетъчни популации на *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 бе да се проследи ефекта на високи концентрации на захароза (30 %, 50 %, 70 %), върху тяхната преживяемост (Фиг. 46). Пролифериращи, G₀ и NQ клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 бяха инкубирани в продължение на 4 часа в 30, 50 и 70 % разтвори на захароза при 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 % (Фиг. 46). При същите условия, 80 % от апоптозните NQ клетки губят жизнеността си, след третиране с 30 % захароза, докато в разтвор на 70 % захароза, близо 90 % от клетките умират. G₀ клетките запазват своята жизненост в рамките на 81% и 62,5% в разтвор на 30% и 70% разтвор на захароза, съответно. През следващите 3 часа тенденцията за намаляване жизнеността на трите типа клетъчни популации се запазва. 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 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

В процесите на биотехнологично производство на етанол се използват хранителни среди с висока концентрация на захари – от 16 % до 20 % съответно, като се целят по-високи добиви на крайния продукт – етанол. Повишаването в концентрацията на захароза над 20 % не води до увеличаване на икономическия коефициент на етанол, а води до генериране на хиперосмотичен стрес в дрождевата клетка (Ishmayana et al., 2011).

Отговорът на пъпкуващите дрожди към осмотични промени се оказва полезен инструмент за изследване на адаптационните механизми в този микроорганизъм (Acar et al., 2005; Muzzey et al., 2009). Когато *S. cerevisiae* се сблъскват с хиперосмотичен стрес, водата изтича от клетката, което води до клетъчно свиване (Petelenz-Kurdziel et al., 2011). Този дисбаланс се компенсира благодарение на HOG пътя, който води до фосфорилиране на цитоплазмения белтък Hog1 (Posas and Saito., 1997). HOG пътят позволява на дрождите да се адаптират към хиперосмотичен стрес в рамките на 15-30 минути (Miermont et al., 2011), което най-вероятно е причината за сравнително високата преживяемост на клетките, намиращи се в активна пролиферация, след прилагане на различни процентни концентрации захароза. За разлика от тях, при Q клетките се наблюдава най-висока преживяемост, което предполага, че това би могло да се дължи на специфичните характеристики на G₀ състоянието – клетките са с удебелена клетъчна стена и понижена скорост на метаболизма, което най-вероятно ги предпазва от вредното действие на високи концентрации от този дизахарид. При NQ клетките беше отчетена близо 90 % загуба на клетъчна жизненост, неоспорим факт, като се има предвид тяхната физиология, а именно факта, че много от тях са сценесцентни, апоптозни или навлезли в етап на програмирана клетъчна смърт.



Фигура 46: Влияние на различни концентрации на захароза върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

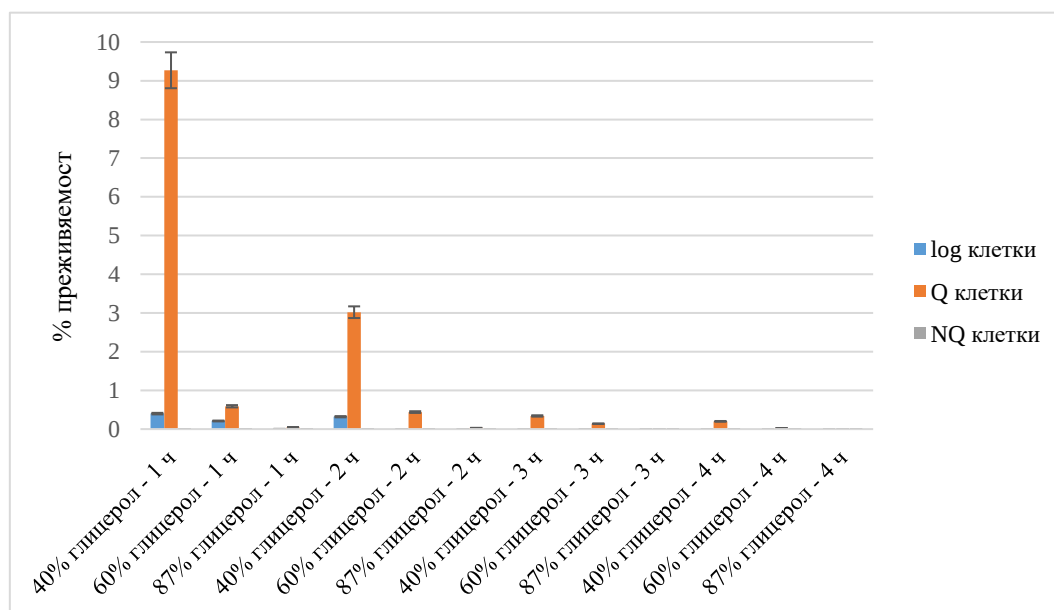
Глицерол

Друг важен метаболит, който оказва ключово въздействие върху дрождевия клетъчен растеж е глицеролът. Той е основният осмопротектор в повечето видове дрожди, включително *S. cerevisiae* (Hohmann., 2002). Може, също така, да служи като източник на въглерод, а цитозолното ниво на неговото разграждане/синтез е важен фактор за поддържането на клетъчния редокс баланс (Ansell et al., 1997; Valadi et al., 2004). Освен тези функции, глицеролът се използва и за синтеза на глицерофосфолипиди и триацилглицероли (Kohlwein et al., 1996; Mullner and Daum., 2004) и служи като защитен механизъм при оксидативен или топлинен стрес (Pahlman et al., 2001). Последните разработки в биофизичните техники дадоха представа за механизмите и реакциите на стрес, предизвикани от халотропната конкурентна способност и екологията на *S. cerevisiae* (Bhaganna et al., 2010; Cray et al., 2013a; 2013b; 2015; de Lima Alves et al., 2015). Високите извънклетъчните концентрации на глицерол могат да причинят преходна промяна в тургора на клетката на *S. cerevisiae*, тъй като той прониква в плазмената мембрана в рамките на 1-2 минути и не действа като стресов агент (Alemohammad and Knowles., 1974; Kiyosawa., 1991; Vilhelmsson and Miller., 2002; de Lima Alves et al., 2015). Следователно основният му начин на действие като стресор е понижаване на водната активност, или чрез инхибиране на нивата на халотропна активност (Williams and Hallsworth., 2009; Cray et al., 2013b; de Lima Alves et al., 2015).

Някои от ксеротолерантните щамове *S. cerevisiae* могат да растат при 3-4 М глицерол (Cray et al., 2013a); тези щамове могат да бъдат инхибирани както от ниската водна активност, така и от високата халотропност на стресовия агент (de Lima Alves et al., 2015).

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. 47 и отново показват по-висока устойчивост към 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, жизнеността 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.

С увеличаване времето на въздействие с глицерол върху клетките, тенденцията за загуба на жизненост се запазва, като на 2-ри час при логаритмични клетки, поставени в 60 % глицерол са установени едва 20 жизнеспособни клетки в 1 мл клетъчна суспензия (при първоначална концентрация на контролните клетки – $6,0 \times 10^6$ кл/мл), докато при прилагане на най-високата концентрация на глицерол – 87 % (търговски продукт), не бяха установени жизнеспособни клетки и в трите клетъчни популации, дори и на първия час от третирането. В същото време, при Q клетките се наблюдава спад в жизнеността с 2 и 3 порядъка за 60 % и 87 % глицерол, съответно. Логаритмичните клетки губят изцяло своята жизненост при 60% глицерол на 3^{ия} час от третирането, а на 4^{ия} час са установени едва 15 жизнеспособни клетки в 1 мл клетъчна суспензия. Клетките в покой запазват макар и минимална жизнеспособност до 4^{ия} час при концентрации от 40% и 60% глицерол, съответно 0,2% и 0,023% преживяемост. При третиране с търговски продукт на глицерола Q клетките загиват напълно след 4-часов хиперосмотичен стрес.



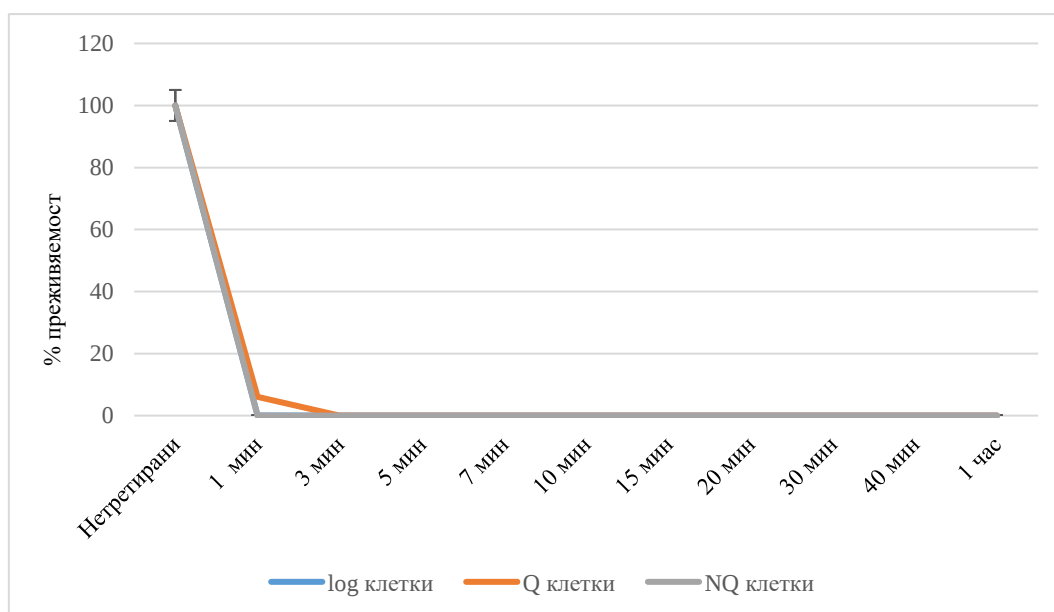
Фигура 47: Влияние на различни концентрации глицерол върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Най-вероятно причината за тази устойчивост на Q клетките към хиперосмотичен стрес е фактът, че *S. cerevisiae* натрупва трехалоза, която действа като антагонист и успява да поддържа високо вътреклетъчно налягане, така че да противодейства на токсичните за клетката концентрации на глицерол (Cray et al., 2013a; Cray et al., 2015; de Lima Alves et al., 2015). Глицеролът и трехалозата са основните осмолити, участващи в клетъчния адаптивен отговор в условия на хиперосмотичен стрес. Dushokova et al., (2015) съобщават, че при изследване на мутанти по HOG пътя на щам *S. cerevisiae* BY4741, най-висока преживяемост се наблюдава при дивия тип щам, след прилагане на хиперосмотичен стрес – третиране NaCl и сорбитол. От друга страна, глицеролът е широко използван и като криопротектор за съхранението на дрождеви микроорганизми при ниски и свръхниски температури (Cabrera et al., 2010). Неговото действие като криопротектор е свързано с разкъсване на връзките между водните молекули, като по този начин предотвратява образуването на големи водни кристали. Ето защо получените експериментални данни имат ключово значение не само от гледна точка на токсичното действие на този метаболит върху еукариотната клетка, но и като ценна информация за криобиологичните изследвания.

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

Ултравиолетовите лъчи (UV) представляват част от спектъра на слънчевите лъчения. По-специално, UV-C светлината обхваща бактерицидния диапазон в UV спектъра от 200 до 280 nm. Първичният механизъм на инактивиране на бактериалния растеж включва омрежването на съседни пиримидинови нуклеотидни бази в ДНК, което в крайна сметка води до клетъчна смърт (Gabriel et al., 2017).

За определяне на преживяемостта на популации от логаритмични, Q и NQ клетки на щам *S. cerevisiae* BY4741 бе проведен експеримент, при който клетъчни суспензии ($OD_{540} = 1.0$) от трите типа клетки бяха инокулирани върху твърда хранителна среда YPD и директно облъчвани с UV-C₂₅₄ лъчи за различен период от време (1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 60 минути). Получените резултати са представени на Фиг. 48.



Фигура 48: Ефект на UV - лъчи върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Директното излагане на дрождевите клетки под действие 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). При клетките в експоненциална фаза се наблюдава 10 пъти по-ниска жизнеспособност, което най-вероятно е вследствие от факта, че те са активно делящи се. При тях възможността за формиране на мутации в молекулата на ДНК е по-голяма, поради по-високата скорост в процесите на репликация и биосинтеза. За разлика от Log-клетките, Q клетките

притежават кондензирани хромозоми, което вероятно ги предпазва от фунгицидния ефект на UV лъчите, както и метаболитните процеси са сведени до минимум и излявата на евентуални мутации е силно ограничена. NQ клетките от своя страна губят напълно своя растеж след въздействие с UV-C₂₅₄, дори и след първата минута.

След третата минута не е отчетен дрождеви растеж в нито една от трите субклетъчни популации. Молекулата на ДНК абсорбира най-добре светлина с дължина на вълната от 250-260 nm (Ganske., 2014), което най-вероятно е и причина за този летален ефект върху клетъчните субпопулации след първата минута.

UV светлината води до образуване на тиминови димери. Въпреки че слънцето осигурява топлина и светлина, които са от съществено значение за живота на Земята, ултравиолетовите (UV) лъчи имат пагубен ефект за клетката. Natarajan., (2020) експериментира с дрождеви щам, който е чувствителен към UV светлина, за да установи нейния пагубен ефект върху клетката. За целта, той използва дрожди, които са мутантни по гените, отговарящи за репарация на ДНК. Установява се, че UV уврежда молекулата на ДНК, като инициира появата на тиминови димери. Тъй като клетките са мутантни, ако димерът не се възстанови по правилния начин, има два пътя: да се превърне в ракова клетка или директно да причини апоптоза на клетката. Това обяснява действителния бактерициден ефект на ултравиолетовата светлина върху преживяемостта на микроорганизмите.

Учени (Niu et al., 2021) докладват за пълна загуба на жизненост след облъчване с UV-C₂₅₄ на клетки в експоненциална фаза на *S. cerevisiae* след 9 минутно облъчване. При спорулиращи диплоидни щамове на род *Saccharomyces*, спорулирането се забавя или не настъпва поради наличието на множество увреждания (пиримидинови димери) в премейотичната ДНК след облъчване с UV-лъчи (Simchen et al., 1972).

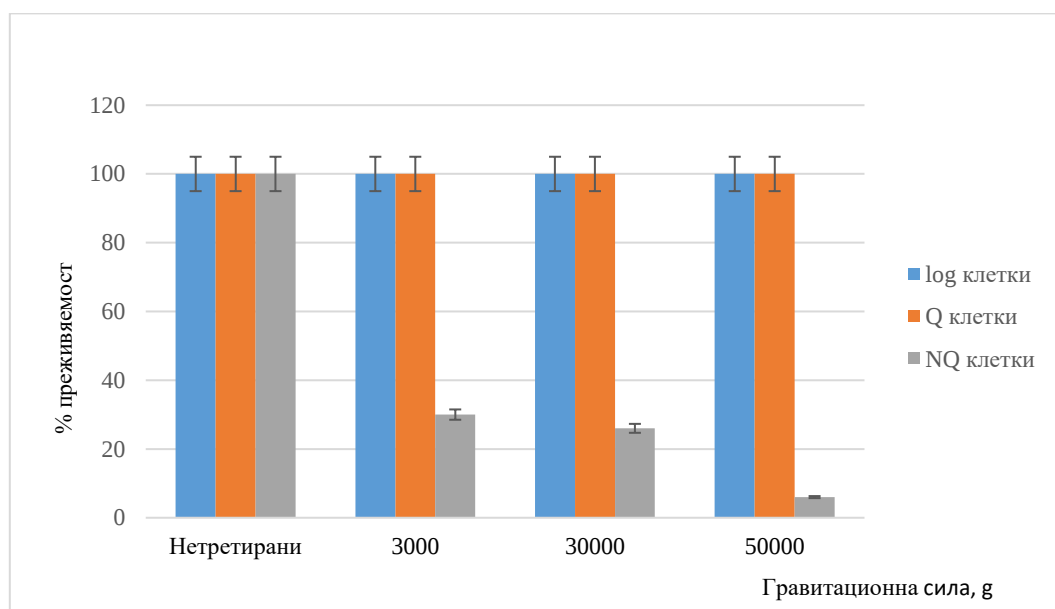
След провеждане на редица експерименти, Ozcelik., (2007) установява, че фунгицидният ефект на UV₂₅₄ е по-голям, в сравнение с този, наблюдаван след прилагане на UV₃₅₄, дори и за по-дълъг период от време. Това потвърждава нашите резултати – пълна загуба на жизненост при две от трите клетъчни популации (Log и NQ) и слаба преживяемост (6%) на клетките в G₀ състояние.

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

Животът на Земята протича при постоянна гравитационна сила. Микроорганизмите, в това число и дрождите, са чувствителни към изменения в силата на гравитационното поле. През последните години, с развитието на космическите програми, все по-голямо внимание се обръща на влиянието на микро- и хипергравитацията върху еукариотните клетки, като е установено, че в условия на лабораторно симулирана микрогравитация клетките скъсяват своята лаг-фаза, увеличават скоростта си на растеж, повишават устойчивостта си към антибиотици и променят генната си експресия (Sheehan et al., 2007). Все още обаче съществуват ограничен брой изследвания върху влиянието на хипергравитацията върху еукариотните микроорганизми.

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). На всеки час от центрофугирането бяха вземани проби и броят на преживелите клетки беше изчислен посредством броя на CFU на твърда АСД хранителна среда. Процентът преживяемост на трите вида клетки беше оценявана спрямо контролни, неподложени на хипергравитация проби. Получените резултати след 4 часово центрофугиране при различна сила на гравитационното поле са представени на Фиг. 49.

След приложено $3000g$, при двете клетъчни популации (Q и Log) не беше установено потискане на преживяемостта, 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 жизненост при NQ клетките, съответно 26% и 6%. Останалите две клетъчни популации отново запазват своята преживяемост (100%) при приложена хипергравитация.



Фигура 49: Влияние на гравитационната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

Получените резултати са пряко свързани с изследвания на други авторски колективи. Например, от проучвания относно влиянието на гравитацията върху микроорганизмите става ясно, че микрогравитацията стимулира растежа на някои бактериални видове (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), сравнени с контролни клетки, центрофугирани при 1 x g (Taylor., 1974; Mennigmann and Lange., 1986; Ciferri et al., 1986; Bouloc and D'Ari., 1991; Gasset et al., 1994; Klaus et al., 1997; Fang et al., 1999; Kacena et al., 1999; Brown et al., 2002; Wilson et al., 2002). При *E. coli* например, Lag фазата е по-къса, продължителността на експоненциален растеж е по-голяма, в резултат на което клетъчната плътност се удвоява по време на космически полет (Klaus et al., 1997). Микрогравитацията може да окаже ефект и върху вторичния метаболизъм на микроорганизмите. Например, продуцирането на бета-лактамни антибиотици от *Streptomyces clavuligerus* (Fang et al., 1997; Demain and Fang., 2001). Генната експресия на еукариотния микроорганизъм *S. cerevisiae* също се стимулира от приложена микрогравитация (Johanson et al., 2002; Purevdorj-Gage et al., 2006).

Провеждани са експерименти с приложена хипергравитация и върху *S. cerevisiae* и е установено, че този еукариотен микроорганизъм показва чувствителност към високи нива на гравитация. По литературни данни, след прилагане на 74 558 x g, растежът на дрождите е напълно потиснат (Deguchi et al., 2011), което корелира с получените от нас резултати, при които все още установяваме 100% преживяемост на клетки от щам *S. cerevisiae* BY4741 при 50 000 x g. NQ клетките се характеризират със загуба на

метаболитна активност и дори способност за апоптоза, което най-вероятно е причината за пълната загубата на тяхната жизнеспособност след прилагане на хипергравитационен стрес.

Тези резултати потвърждават възможността *S. cerevisiae* да се използва и като моделен организъм за изучаване реакцията на еукариотните клетки спрямо приложена хипергравитация. Значението на този тип изследвания може да намери широко приложение в различни космически изследвания.

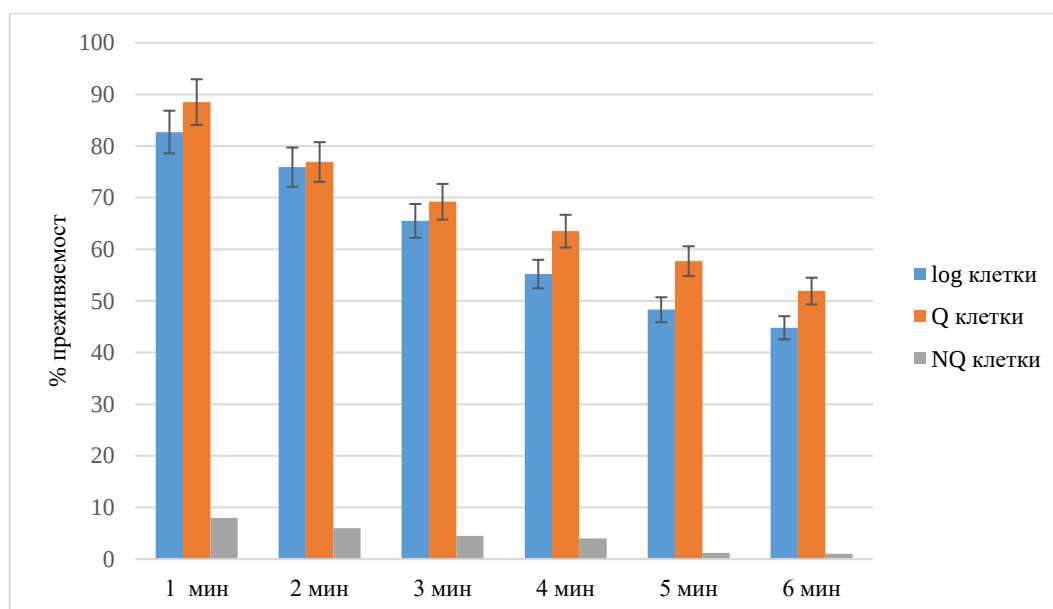
2.2.6. Влияние на механична сила върху преживяемостта на дрождеви клетки *S. cerevisiae* BY4741

При провеждане на генетични и молекулярно-биохимични експерименти е необходимо клетъчната стена на микроорганизмите да бъде частично или изцяло отстранена. В зависимост от целите на експеримента, такъв тип отстраняване се осъществява чрез третирането им с ензимни разтвори (ензимен лизис), чрез прилагане на висока температура и/или разтвори на алкохол и NaCl (автолизис) или чрез въздействие с механична сила в процес на механично дезинтегриране.

Икономически най-ефективният метод за получаване на безклетъчен екстракт от дрождеви клетки е чрез механично дезинтегриране. При този метод върху клетъчната стена се упражнява сила на удар от балистичен товар, което води до разрушаване на стената и мембраните, а това от своя страна до отделяне на клетъчното съдържимо в буфериращата система.

Ефективността на процеса на механична дезинтеграция зависи от редица фактори като едни от най-важните са вида на микроорганизма, структурата и химичния състав на клетъчната му стена, клетъчната концентрация, размерите на балистичния товар и режима на дезинтеграция.

В хода на експерименталната работа беше проведено изследване, касаещо степента на преживяемост на логаритмични, Q и NQ клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 при механично дезинтегриране с лабораторен дезинтегратор и стъклени перли. Степента на преживяемост (%) е определяна спрямо контроли, които не са дезинтегрирани. Резултатите са представени на Фиг. 50.



Фигура 50: Влияние на механичната сила върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

В хода на проведения експеримент бе приложен режим и условия на дезинтегриране препоръчани от търговския производител на апарата (Next Advance, USA) за дрождеви микроорганизми. Анализирайки получените резултати е видно, че клетките в покой (Q) на щам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 притежават по-висока устойчивост към въздействие на 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 минути, процентът на дезинтегрираните клетки се увеличава с около 7-10% за логаритмичните, 5-7% за G_0 клетките и 2-4% за NQ клетките. В края на експеримента (6 минути) процентът преживели клетки е 44,8%, 51,9 и 1% съответно за логаритмични, Q и NQ клетки.

Клетките на *Saccharomyces cerevisiae* притежават механосензори, които по своята същност са белтъчни молекули. Те са разположени основно в клетъчната стена, но техният C-край се свързва с клетъчната мембрана и предава сигнали при наличие на механичен стрес към други сигнални молекули, разположени във вътрешността на клетката. Това води до активиране на клетъчни регулаторни пътища за запазване интегритета на клетъчната стена и клетъчната жизнеспособност (CWI път) (Elhasi and Blomberg., 2019). Възможността за засилена експресия на протеините от тези метаболитни пътища в активно делящите се дрождеви клетки е и най-вероятната

причина голяма част от тях да запазват интегритета на клетката си дори и след продължително излагане на механичен стрес.

Получените от нас резултати са в съответствие и с тези на Kleining., (1997), според който дрождеви клетки, намиращи се в стационарна фаза притежават по-ниска устойчивост към въздействие с механична сила спрямо клетки от същия щам, но в късна стационарна фаза. Според авторите при преминаването от една фаза на развитие на дрождевата култура в друга, химичния състав на клетъчната стена не се променя съществено. Промени настъпват само в нейната дебелина, което определя и нейната по-голяма еластичност и наблюдаваната по-висока устойчивост на клетките в покой към механична сила на удара.

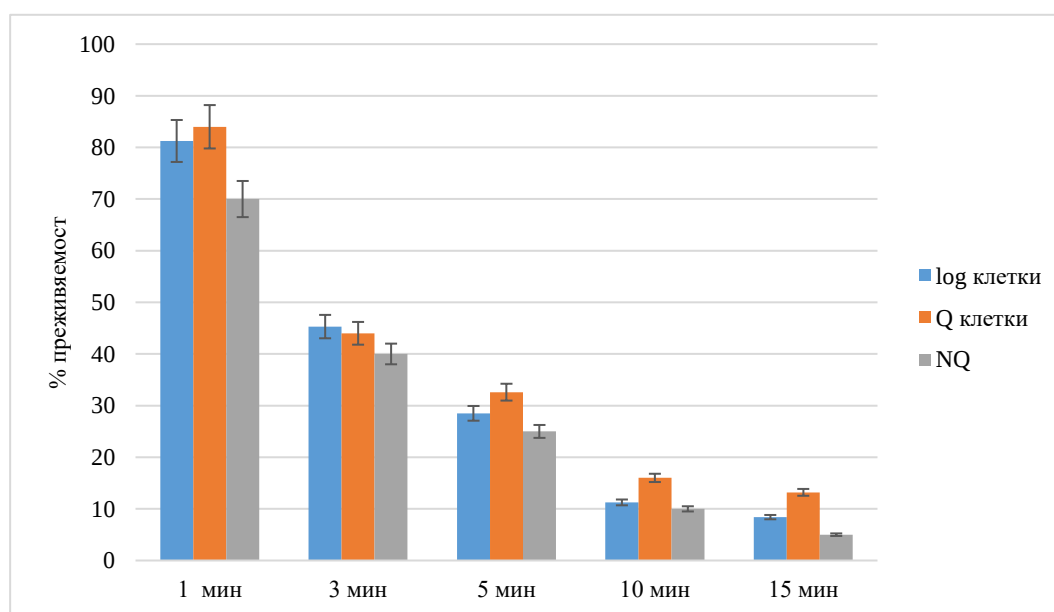
Така например при изследване с бактерии е установено, че те притежават по-висока устойчивост към въздействието с механичен стрес, като например *E. coli*, в която пептидоглюкана на клетъчната стена силно се омрежва по време на фазата на покой (Middelberg et al., 1992).

Доказаната от нас по-висока устойчивост на клетки в G_0 състояние след въздействие с механична сила вероятно се дължи както на по-дебелата клетъчна стена, така и на установените по-малки размери на техните клетки (Valcourt et al., 2012; Sun and Gresham., 2021). Учени установяват, че броят на ударите върху клетъчната повърхност зависи до голяма степен от нейните размери, което от своя страна определя до каква степен се е разрушила стената (Solecki et al., 2021).

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

В хранително-вкусовата промишленост са разработени алтернативи за нетермична стерилизация. Ултразвукът е един от методите за подобряване на такива процеси благодарение на кавитационните ефекти. Предимствата на ултразвука пред термичната пастьоризация включва по-слабата загуба на вкус и енергийно по-ефективен процес (Xu et al., 2009; Zhao et al., 2010; Chemat et al., 2011; Wang et al., 2011; Xu et al., 2016). По отношение инхибирането на микробната активност, ултразвукът е използван за потискане растежа на микроорганизми в морска вода, като е установен разрушителен ефект върху микробните клетки (Alliger., 1975; Xu et al., 2016). Счита се, че плесените са най-устойчиви, последвани от бактериалните ендоспори и вегетативните клетки по време на ултразвуково третиране (Alliger., 1975; Deng et al., 2015).

Установено е, че ултразвуковата кавитация и високите температури действат синергично, за да инактивират *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 шам *S. cerevisiae* BY4741. Получените експериментални данни са представени на Фиг. 51. 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, неподлагани на 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%). Тези резултати са в съответствие с изследванията на други автори, които провеждат редица експерименти с филаментозни гъби в късна експоненциална фаза на растеж и установяват, че след първата минута клетките остават жизнеспособни, като се наблюдава дори повишаване на общия им брой с близо 14%. Това се дължи на индуцираното от ултразвука разрушаване на филаментите, което води до повишаване на колония-формиращите се единици (CFU/ml) (Povey and Mason., 1998; Piyasena et al., 2003). (Povey and Mason., 1998; Piyasena et al., 2003), с разликата, че в нашия случай имаме приложен ултразвук с по-висока честота (40kHz), който най-вероятно има по-силен фунгициден ефект. След 3 минутно третиране се наблюдава драстичен спад в клетъчната жизненост и на трите клетъчни субпопулации, като се наблюдава близо 2 пъти по-ниска преживяемост. Тенденцията за намаляване на жизнеността и при трите вида клетки се запазва, като на 15 минута процентът преживяемост е 13,2%, 8,4% и 5% съответно за Q, Log и NQ (Фиг. 51).



Фигура 51: Влияние на ултразвука върху преживяемостта на Log, Q и NQ клетки на *S. cerevisiae* BY4741

В съответствие с получените от нас резултати е изследването на Yang et al., (2021), които тестват ефектът на ултразвуковите честоти при 0, 20, 23, 25, 28, 33 и 40 kHz върху натрупването на биомаса и добива на етанол при *S. cerevisiae*. Резултатите показват, че третирането с ултразвук е в състояние да увеличи активността на дрождите и да подобри способността им за синтез на етанол в зависимост от честотата, която се прилага. Получените от тях резултати предполагат, че ултразвукът позволява слабо и поправимо увреждане на клетъчната мембрана, което води до подобрената ѝ пропускливост, насърчаване на транспорта през нея и повишаване способността за клетъчен растеж. Освен това ултразвукът може да промени чувствителността на ензимите към техните субстрати (Huang et al., 2017; Mfma et al., 2021).

От друга страна, процесът на ултразвукова кавитация също е добре проучен. Съществуват два вида кавитация, а именно преходна и стабилна, отговорна за два ефекта: химичен и механичен (Povey and Mason., 1998; Piyasena et al., 2003; Leighton., 2007). Бактерицидните и бактериостатичните ефекти, които се наблюдават след третиране на различните дрожеви клетъчни популации с ултразвукова честота 40 kHz вероятно са свързани с промяна в кавитацията, вследствие от екзогенно генерирани механични сили на срязване в течна среда, които увреждат микроорганизмите в суспензията, както и приложената кавитация, възникваща в клетката (Hughes and Nyborg., 1962; Ciccolini et al., 1997).

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

Навлизането на дрождевите клетки в G_0 състояние е обратим процес, който най-често се индуцира при лимитация по въглероден източник. Липсата на хранителни вещества води до преход към диауксична и стационарна фаза, което е съпроводено с редица физиологични промени в клетките като загуба на способност за пъпкуване, ниска скорост на транскрипция, забавен метаболизъм, понижена биосинтеза на протеини, удубелени клетъчни стени. Дрождевите клетки също акумулират запасни молекули гликоген, триацилглицерол, полифосфати и трехалоза (Galdieri et al., 2010). Адаптивните фази, през които преминават клетките, преди да навлязат в състояние на покой, критично повлияват тяхното дълголетие и способност да издържат на външен стрес (Werner-Washburne et al., 1993; Herman., 2002). Основни регулаторни пътища, които осигуряват адекватен клетъчен отговор при лимитация по хранителни вещества са тези на сигналните протеинови кинази - PKA, TORC1, Snf1 и Pho85. Тяхното координирано

действие позволява клетките да преживяват десетилетия, дори векове в условия на гладуване (De Virgilio., 2012).

Една от основните цели в клетъчната биология и протеомика е да се идентифицира субклетъчната локализация и функция на протеините, с цел да се изучат пътищата, които регулират биологичните процеси на клетъчно ниво.

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. Познаването на пътищата, отговорни за преминаване в G₀ клетъчен цикъл от друга страна, биха допринесли и за по-доброто разбиране на стратегиите, които еукариотните клетки прилагат за поддържане на тяхната хомеостаза в условия на стрес. Ето защо, следваща стъпка в настоящата дипломна работа беше да се извърши биоинформатичен анализ с цел характеризиране на регулаторните механизми, отговорни за навлизане в G₀ състояние при дрожди *S. cerevisiae*. Консервативността на основните клетъчни процеси сред еукариотите и използването на моделни дрождеви клетки в покой, би могло да спомогне за изясняването на еквивалентни механизми и състояния в много, ако не във всички други еукариоти и евентуално прокариоти. В действителност, дори бозайниците притежават ортолози на регулаторни гени при дрожди, като TOR, протеин кинази A и C и Snf1p (Gray et al., 2004). Ето защо, получените биоинформатични данни за гените, участващи в сигнални пътища и за вътреклетъчно разпределение на съответните белтъци, ще бъдат разгледани в сравнителен аспект с тези при човека. Дрождите и клетките на бозайниците реагират по един и същи начин на рапамицин, имуносупресорно лекарство за хуманна употреба, което инхибира пролиферацията на двата типа клетки и води до навлизането им в състояние на покой (Schmelzle and Hall., 2000). Независимо от факта, че навлизането на клетките в и излизането от G₀ състояние в многоклетъчните организми, обикновено се регулира чрез позиционни белези и такива на развитието, клетките на бозайниците, заедно с дрождевите клетки споделят общата възможност да отговарят на гладуване с навлизане в състояние на покой. (Longo and Fabrizio., 2002).

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 синтеза на Tor1p, PIK-свързана протеин киназа, мишена за рапамицин.
- *TOR2* (YKL203C) – ген, кодиращ синтеза 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). Биологичната им роля в клетката е свързана с участието им в регулацията на много клетъчни процеси, включително: белтъчна синтеза, биогенеза на рибозомата, автофагия, транскрипционно активиране, мейоза, клетъчен цикъл, разпределяне и обмен на пермеази за пренос на хранителни вещества и организация на актина (Barbet et al., 1996).

Изследванията с ClustalW показаха, че гените *TOR1* и *TOR2* при *S. cerevisiae* са паралози, възникнали вероятно при цялостната дупликация на генома (Lorberg and Hall., 2004). При това явление, вследствие на мутация в нововъзникналия ген, е възможно промяна в неговата функция, въпреки че тя често остава свързана с функцията на изходния ген. Процентът идентичност, генериран от ClustalW, между аминокиселинните им последователности не е много висок – 67.74 %, което показва дивергенция в процеса на еволюция (Фиг. 52 и 53). 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.

```

TOR1  -----MEPHEEQI--WKS KLL-KAANNMMDMDRNVPLAPNLNVNMNMKM 41
TOR2  MNKYINKYTPPNLLSLRQRAEGKHRTKKLTHKSHSHDDEM----- 42
      .: .: * .: * * .: * *

TOR1  NASRNGDEFGLTSSRFDGWVIGSNGDVN---F-----KPILEKIFRELTSDYKEERK 90
TOR2  STTSNTDSNHNGPNDSSRGVITGSAGHIGKISFVDSLEDTTFSTLNLIFDKLKSVDQPQERA 102
      .: * * .: * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TOR1  LASISLFDLLVSLHEHLSIEEFQAVSNDINNKILELVHTKKTSTRVGAVLSIDTLISFYA 150
TOR2  SGANELSTTLTSLAREVSAEQFQFNSLNNKIFELIHGFTSSEKIGGILAVDTLISFYL 162
      .: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TOR1  YTERLPNETSRLAGYLRGLIPSNDVEVMRLAAKTLGKLAVPGGTYTSDVFVEFIKSCLEW 210
TOR2  STEELPNQTSRLANYLRVLIPSSDIEVMRLAANTLGRLTVPGGTLTSDVFVEFVRTCIDW 222
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TOR1  LTASTEKNSFSSSKPDHAKHAALLIITALAENCPLYLYQYLSILDNIWRALRDPHLVIR 270
TOR2  LTLTADNNS-SSSKLEYRRHAALLIICALADNSPYLLYPVNSILDNIWVPLRDAKLIIR 281
      * * : : : * * * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TOR1  IDASITLAKCLSTLRNDPQLTSQWVQRLATSCEYGFQVNTLECIHASLLVYKEILFLKD 330
TOR2  LDAVALGKCLTIQDRDPALGKQWQRLFGGCTHGLSLNTNDSVHATLLVFRELLSLKA 341
      : : : : * * * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TOR1  PFLNQVFDQMCNCIAYENHKAKMIREKIYQIVPLASFPQLFAGKYLHQIMDNYLEIL 390
TOR2  PYLRDKYDDIYKSTMKYKEYKFDVIRREVYAILPLAAFDPAIFTKKYLDRIIMVHYRLYL 401
      * * * * : : : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TOR1  TNAPANKIPHLKDDKPQILISIGDIAYEVGPDIAPYVKQILDYIEHDLQTKFKFRKKFEN 450
TOR2  KNIDMNA--NNSDKPFIIVSIGDIAFVGGSSISPYMTLILDNIIEGLRTKFKVRKQFEK 459
      * * .: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Фигура 52: Сравняване на секвенциите, извършено чрез ClustalW

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

```

#
1: TOR1    100.00   67.74
2: TOR2     67.74  100.00

```

Фигура 53: Матрица за процент идентичност, генерирана от ClustalW

In silico данните за вътреклетъчното разпределение на Tor1p и Tor2p протеините при *S. cerevisiae* показват, че в съответствие с литературните данни, двата белтъка са периферни мембранни белтъци, като проведен анализ показва, че C- и N- краищата им се разполагат от вътрешната страна на мембраната (Таблица 1). Tor1p притежава потенциалната възможност да се насочва както към пероксизомите, с помощта на PTS2 сигнал, така и към клетъчното ядро (тип pat 4 и pat7 сигнали) и вакуола. Наличието на сигнален мотив от тип „левцинов цип“ в този белтък, показва, че той може да се свързва с ДНК. Разнообразните сигнални мотиви, открити в първичната структура на белтъка, предполагат участието му в различни клетъчни процеси, сред които, тези свързани със стрес и навлизане в състояние на покой. Изследването на аминокиселинната последователност на втората дрождева РІК-свързана протеин киназа Tor2p, показва по-

голяма пластичност на този ензим по отношение на възможните места за локализация. За разлика от Tor1p, той притежава потенциалната възможност да се насочва към митохондриите, тъй като в първичната му структура се открива типичен N-краен митохондриален сигнал с Гавел последователност за срязване на 38-ма позиция. В аминокиселинната му последователност отсъства мотив (левцинов цип), предполагащ свързването му с ДНК, има наличие на пероксизомални (тип PTS2) и ядрени сигнали (тип pat 4 и pat7 сигнал), както и такива за насочване към клетъчната вакуола.

Таблица 2: . Изследване на вътреклетъчната локализация на протеините, участващи в TOR протеин киназата

<u>Протеин</u>	Ген	Сигнали	Локализация SGD /NCBI	Локализация PSORT II	Биологични процеси
РІК-свързана протеин киназа	TOR1 <i>S. cerevisiae</i>	Мембранна топология: трансмембранен 1145-1161; периферен (вероятност = 0.63 (at 457); N >= C: N-края се разполагат от вътрешната страна на мембраната Пероксизомален сигнал в N края (PTS2/SKL2): KITRQIPQL at 2047 Ядрени сигнали за локализация(NUCDISC): pat4: RPRK (4) at 2105 pat7: PRVRKLA (5) at 598 Сигнали за вакуоли (VAC): KLPI at 1210 ДНК свързващи мотиви (Левцинов цип): LECIHASLLVYKEILFLKDPFL at 312	Клетъчни мембрани Ядро Цитоплазма	Клетъчна мембрана Ядро Пероксизоми Вакуоли	Участва в: - клетъчния отговор към различни стресови фактори: топлинен и оксидативен стрес, фактори, увреждащи ДНК. Процеси, свързани с хронологичното стареене на клетките. Регулатор в TOR – сигналния път
	TOR2 <i>S. cerevisiae</i>	Мембранна топология: трансмембранен 1148-1164; периферен (вероятност = 0.95 (at 634); N >= C: N-края се разполагат от вътрешната страна на мембраната Митохондриален сигнал (MITDISK): R content: 2 Hyd Moment (75): 11.95, Hyd Moment(95): 12.80, G content: 0, D/E content: 1, S/T content: 3 (Gavel): R-2 motif at 38 TRK KL	Цитоплазма Плазмена мембрана Вакуолна мембрана	Клетъчна мембрана Митохондрии Ядро Пероксизоми Вакуола	Регулатор в TOR-сигналния път; Участва в организацията на актиновия цитоскелет; Рибозомна биогенеза;

		Ядрени сигнали за локализация(NUCDISC): pat4: PKKK (4) at 733 pat4: RPRK (4) at 2109 pat7: PKKKEES (5) at 733 Пероксизомален сигнал (PTS2): KIGKQLPQL at 2050 Сигнали за вакуоли (VAC): ILPK at 765			
	MTOR (Gene ID: 2475) <i>Homo sapiens</i>	Мембранна топология: трансмембранен; периферен (вероятност = 0.53 (at 1011); N >= C: N-края се разполагат от вътрешната страна на мембраната ЕР мембранен сигнал: XXRR-мотив в N-края: PSER Ядрени сигнали за локализация(NUCDISC): pat4: RPRK (4) at 2208 Пероксизомален сигнал (PTS2 / SKL2): RLLTPSIHL at 668 RISKQLPQL at 2150		Ендоплазмен ретикулум Ядро Пероксизоми	Участва в клетъчния отговор при стрес, като ДНК повреди и отсъствие на хранителни вещества

ClustalW анализът на първичната структура на двата двата дрождеви белтъка Tor1p и Tor2p със серин/треонин протеин киназата при човек – mTOR (protein ID NP_004949.1) показва 42,21 % хомоложност между тях (Фиг. 54). Това дава основание да се предположи, че тези гени при дрождите и човека са ортолози. В потвърждение на това са и данните за функцията на човешката протеин киназа mTOR, която подобно на дрождевите протеин кинази, принадлежи към семейство на фосфатидилинозитол киназа свързани кинази, регулиращи клетъчния отговор при стресови условия като увреждане на ДНК и липса на хранителни вещества. Подобно на дрождевия TORC1 комплекс, този протеин действа като мишена за имуносупресирания ефект на рапамицина и респективното задържане на клетъчния цикъл. Данните от проведения PSORT II анализ за вътреклетъчна локализация на протеина, кодиран от гена *MTOR* при човека, показваха, че той има сигнални последователности, позволяващи да бъде локализиран в ядрото и пероксизомите, подобно на изследваните дрождеви кинази. Наличието на мембранен сигнал за задържане в ендоплазмения ретикулум (ER) предполага, че белтъкът може да бъде локализиран и в този клетъчен органел, по което се отличава от Tor1p и Tor2p при дрожди.

```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: NP_004949.1 100.00 42.21 44.06
2: TOR1       42.21 100.00 67.74
3: TOR2       44.06 67.74 100.00

```

Фигура 54: Матрица за процент идентичност, генерирана от ClustalW

От казаното до тук, може да се заключи, че мишената за рапамицин TOR е силно консервативна във функционално отношение протеин киназа, която регулира растежа и деленето на клетките в отговор на енергийни запаси в клетката, растежни сигнали и хранителни вещества както при дрожди, така и при човек. Контролът на активността на човешкия mTOR е от решаващо значение за клетката, тъй като неговата дисрегулация води до рак, метаболитни заболявания и диабет (Laplanche and Sabatini., 2012). Подобно на *S. cerevisiae*, в човешките клетки mTOR съществува като два структурно обособени комплекса, наречени mTOR комплекс 1 (mTORC1) и mTOR комплекс 2 (mTORC2), всеки със своята специфичност за различни набори ефектори.

3.2. Протеин киназа А (РКА)

Цикличната АМФ (сАМР) - зависима протеин киназа (РКА) присъства във всички еукариотни клетки, въпреки че структурата ѝ не е идентична във всяка една от тях (Edelman et al., 1987; Walsh et al., 1994; Gray et al., 2004). Тя е компонент на сигналния път, който контролира различни клетъчни процеси, включително метаболизъм, клетъчен цикъл, стресов отговор, стационарна фаза и спорулация. РКА действа основно като инхибитор на навлизането в състояние на покой (van Aelst et al., 1991; Gray et al., 2004; Virgilio., 2011). Мутанти с нарушена аденилатциклазна активност не могат да се размножават и техния растеж спира в състояние, подобно на G_0 (Tsukada and Ohsumi., 1993). От друга страна конститутивното активиране на РКА, чрез делеция на *BCY1*, предизвиква клетъчна смърт по време на диауксичната смяна на въглеродния източник (Werner-Washburne et al., 1989). Това показва, че потискането на РКА е от важно значение за успешното преминаване в постдиауксична фаза. Инактивацията на РКА е от решаващо значение за навлизане на клетките в G_0 , а нейното активиране е важен момент за правилното им излизане от това състояние. Регулирането на РКА от наличието на хранителни вещества в средата става по следния механизъм. G - белтъчните рецептори, Ras1p и Ras2p, се активират от външни сигнали, например, наличие на хранителни вещества. Те директно се свързват и активират аденилатциклазата (Cdc35 / Cyr1p) (Toda et al., 1985), което води до увеличаване на нивото на междуклетъчния цАМФ. Основните регулатори на РКА обаче, по време на навлизането в G_0 състояние, все още не са открити. Също така е установено, че РКА инхибира и транскрипционните фактори Msn2p и Msn4p, които също участват и в TOR протеин киназния път (Fabrizio et al., 2001). Следователно, няколко транскрипционни фактора са сред известните мишени на РКА. Msn2 и Msn4 медиират транскрипцията на т. нар. STRE гени (стрес-индуцируеми гени) (Estruch et al., 1993, Martinez-Pastor et al., 1996, Schmitt et al., 1996). STRE гените участват във важни процеси като въглехидратния метаболизъм и регулирането на растежа, както и в адаптирането към различни видове стрес, включително топлинен, увреждане на ДНК и окислителен и осмотичен стрес (Mai and Breeden., 1997, Moskvina et. al., 1998, Smith et.al., 1998, Gasch et. al., 2000). При условия, стимулиращи растежа (наличие на глюкоза и отсъствие на стрес), Msn2 и Msn4 се фосфорилират и се локализируют в цитозола. При изчерпване на глюкозата или друг вид стресови условия (Gorner et al., 1998), те стават хипофосфорилирани и се локализируют в ядрото, където индуцират експресия на STRE гени.

Биоинформатичният анализ на генома на *Saccharomyces cerevisiae* показва наличието на три гена - *TPK1*, *TPK2* и *TPK3*, които кодират протеините Трк1р, Трк2р, Трк3р, изграждащи три каталитични субединици на цикличната АМФ (сАМР) - зависима протеин киназа. Тези субединици подпомагат вегетативния растеж в отговор на хранителни вещества чрез сигналния път Ras-сАМР. Регулаторната субединица на РКА се кодира от гена *BCY1*. При липса на сАМР, Bcy1p (416 а.а.) инхибира активността на РКА чрез образуване на неактивен хетеротетрамерен комплекс с РКА каталитичните субединици. В присъствието на сАМР, свързването му с Bcy1p води до неговата дисоциация от комплекса като хомодимер, освобождавайки каталитичните субединици като два активни мономера.

In silico анализът на човешкия геном показва наличието на три гена *PRKACA*, *PRKACB* и *PRKACG*, които кодират каталитичните субединици на РКА. Генът *PRKAR1B* кодира протеин (381 а.а.), който е регулаторна субединица на РКА. При човека са идентифицирани четири различни регулаторни и три каталитични субединици. сАМР-зависимо фосфорилиране на протеините от протеин киназа А е важно за много клетъчни процеси, включително диференциация, пролиферация и апоптоза. Процентът на идентичност между гените, кодиращи регулаторните субединици на РКА при дрожди и човек е сравнително нисък (33.52 %) (Фиг. 55 и Фиг. 56).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

NP_001158230.1  MA-SPPA-----CPSE-----EDES LKG--CE      19
BCY1           MVSSLPKESQAE LQLFQNEINAA NP SDF LQFSANYFNKRLEQQRAFLKAREPEFKAKNIV  60
               *  *  *                      *  *  *                      :  :  :

NP_001158230.1  LYV-----QLHG IQQ--VLKDCIV-HLCISKPERPMKFLREHFKEKLEENRQILARQ    69
BCY1           LFPEPEESFSR PQSAQSQRSSSMFKSPFVNEDPHSNVFKSGFNLD PHEQD-----TH  115
               *  :  :  *  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

NP_001158230.1  KSNISQSDSHDEEVSPTPNPVVKARRRRGGVSAEVYTEEDAVSVVRK-VIPKDYKTM TAL   128
BCY1           QQAQEEQQHTREKTSTPPLPMHFNAQRRTSVSGETLQPNFDDWTFDHYKEKSEQQLQRL  175
               :  :  :  :  *  :  *  *  *  :  *  *  *  *  :  :  :  :  *  :  :  *

NP_001158230.1  AKAIKKNVLF A HLDNERSDIFDAMFPVTHIAGETVIQQGNEGDNFYVVDQGEVDVYVNG   188
BCY1           EKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCLEEKSVPGATIIKQGQGDYFYVVEKGTVDVYVND  235
               *  *  :  *  *  *  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  *  *  *  *  *  *  *

NP_001158230.1  EIWNTNISEGGSFGELAL IYGT PRAATVKAKTDLKLWGI DRDSYRILMGSTLRKRKMYEE   248
BCY1           NKVNSSGPGSSFGELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRKILLGSSFKKRLMYDD  295
               :  *  .  .  *  *  *  *  *  :  *  *  *  *  *  :  :  *  *  *  :  :  *  *  :

NP_001158230.1  FLSKVSILESLEKMERLTVADALEPVQFEDGEKIVVQGE PGDDFYIITEGTASVLQRRSP   308
BCY1           LLKSMPLVKSLTTYDRAKLADALDTKIYQPGETIIRGDDQGENFYLI EYGAVDVSKKG--  353
               :  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :

NP_001158230.1  NEEYVEVGR LGPSDYFGEIALLNRPRAATVVARGPLKCVKLD RPRF ERLVGP CSEILKR   368
BCY1           ---QGVINKLKDHDYFGEVALLNDLP RQATVTATKRTKVATLGKSGFQRL LGPAVDVLKL  410
               :  :  *  *  *  *  *  *  :  *  *  *  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :

NP_001158230.1  NIQRVNSFISLTV      381
BCY1           NDPTRH*-----      416
               *  :

```

Фигура 55: Сравняване на протеинови секвенциите протеин киназа А при *S. cerevisiae* и човек

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

```

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

```

Фигура 56: Матрица за процент идентичност, генерирана от ClustalW

Изследването с PSORT II показва, че в аминокиселинната секвенция на дрождевия протеин Vcu1p не се наблюдават сигнали за насочване към конкретни клетъчни органели. Наличието на региони, богати на основни бази в нуклеотидната последователност е причина за ограничаване локализацията на Vcu1p в ядрото с вероятност от 47,8 % (Таблица 2).

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

Протеин	Ген	Сигнали	Локализация я SGD /NCBI	Локализация PSORT II	Биологични процеси
Циклична АМФ (сAMP) - зависима протеин киназа (РКА), регулаторна субединица	<i>BCY1 (YIL033C)</i> <i>S. cerevisiae</i>	Ядрени сигнали за локализация(NUC DISC): основни бази - 13.2%	Ядро Цитоплазма Плазмена мембрана	Ядро	Компонент на сигнален път, участващ в регулация на процеси, включващи: метаболизъм, клетъчен цикъл, стресов отговор, стационарна фаза, спорулация
Цикличната АМФ (сAMP) - зависима протеин киназа (РКА), регулаторна субединица (NP_001158230.1)	<i>PRKAR1B (ID 5575)</i> <i>Homo sapiens</i>	Ядрени сигнали за локализация(NUC DISC): pat4: RRRR (5) at 94 pat4: RKRK (5) at 241 pat7: PVVKARR (3) at 89 основни бази: 13.6%	Ядро Цитозол	Ядро Цитозол	Участва в регулация на процеси на диференциация, пролиферация и апоптоза

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 (Vcy1p) и в този протеин се откриват региони, богати на основни аминокиселинни остатъци, което предполага локализацията на РКА в ядрото (Таблица 2).

3.3. Протеин киназа С

Протеин киназа С (РКС) е от семейството на сериновите и треониновите протеин кинази (Lew., 2000). Тя участва във фосфорилирането на голяма група таргетни белтъци

и е свързана с вътреклетъчното сигнализиране. Доказано е, че тя играе важна роля в регулирането на различни клетъчни функции като: клетъчна активация, индукция на апоптоза и др. (Gray et al., 2004).

Дрождевата протеин киназа С (Pkc1p) основно е отговорна за стабилизирането на клетъчната стена в активна конформация по време на вегетативната пролиферация. Pkc1p частично регулира и митоген-активираните протеин кинази (MAP) (Lee et al., 1993). При изследвания с мутанти по гена *BSK1*, кодиращ такава MAP киназа, е установено, че те губят много бързо жизнеспособност в условия на лимитация по азот (Costigan and Snyder., 1994). Въз основа на тези наблюдения е предложено, че Pkc1p-MAP киназния път вероятно играе важна роля като сензор за наличието на хранителни вещества в средата. Последващи изследвания обаче показват, че тя по-скоро действа като негативен регулатор на различни вътреклетъчни процеси, като временно се индуцира от инактивирането на TOR сигналния път (Krause and Gray., 2002). Установено е, че Pkc1p-MAP киназата е необходима за поддържане на клетъчната жизнеспособност при гладуване по въглерод, както и за увеличаване на преживяемостта на култури в стационарна фаза (Torres et al., 2002).

Основната роля на Pkc1p при превръщането на една дяляща се клетка в G_0 е свързано с характерните изменения, които настъпват в клетъчната повърхност (Krause and Gray., 2002).

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 3). 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 пероксизомален сигнален мотив в N-края – RIQYMLQQL, в позиция 115, определящ вероятност за локализация на белтъка в пероксизомите.

За разлика от *S. cerevisiae*, при човека *in silico* анализа показва наличието на пет гена, кодиращи протеини от семейството на протеин кинази С – *PRKCA*, *PRKCB*, *PRKCD*, *PRKCE*, *PRK CZ*, разположени на различни хромозоми. След провеждане на множество сравняване на секвенциите на съответните пет протеина с дрождевата протеин киназа С чрез ClustalW беше установено наличие на сходство от 34,5 % между тях (Фиг. 57 и 58).

[illegible]

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

Вътреклетъчната компартментализация на протеин киназа С – тип алфа (NP_002728.2) при човека, се определя от наличието на специфични ядрени сигнали, насочващи протеина към този клетъчен органел - pat7: PSDKDRR (3) в позиция 233, както и съдържание на основни АК остатъци: 13.2%.

При изследване на аминокиселинните последователности на съответните продукти на гените *PRKCD*, *PRKCE* и *PRKCZ* за наличие на сигнални последователности беше установено, че протеин киназа С – тип епсилон (NP_005391), притежава мотив, предполагащ митохондриална насоченост. Това е Гавел R-2 последователност за срязване в 42 позиция. Допълнително беше показано, че този белтък има възможност за

ядрена насоченост посредством наличието на ядрени сигнали тип pat4 и pat7. Последното предполага регулаторната роля на този протеин, подобно на останалите протеини от семейството на протеин киназа С и на други белтъци, навлизащи в ядрото. За разлика от РКС – тип епсилон, протеин киназа С – тип делта (NP_001341605) не притежава в аминокиселинната си секвенция ядрени сигнали за насочване към ядрото. При него бяха открити мотиви, определящи възможната му локализация му в ендоплазмения ретикулум, в допълнение на типичната вътреклетъчна локализация на този протеин в цитозола (вероятност 56.5 %). При протеин киназа С – тип зета (XP_016857279) беше установено наличие на митохондриален сигнал и Гавел R-2 последователност за срязване в 27 позиция. Данните от PSORT анализа, показаха, че подобно на РКС при *S. cerevisiae*, този протеин притежава пероксизомален сигнал за насочване към пероксизомите, но не бяха наблюдавани типичните pat 4 или pat 7 сигнали за локализация в ядрото.

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

Протеин	Ген	Сигнали	Локализация SGD /NCBI	Локализация PSORT II	Биологични процеси
Протеин киназа С (1151 aa)	<i>PKC1 (YBL105C)</i> <i>S. cerevisiae</i>	Ядрени сигнали за локализация (NUCDISC): pat4: RKKK (5) at 301 pat4: KKKR (5) at 554 pat4: KHKK (3) at 808 pat4: HKKR (3) at 809 pat4: KRRK (5) at 815 pat7: PKFRRKQ (5) at 200 основни АК остатъци: 13.4% Пероксизомален сигнал (PTS2 / SKL2): RIQYMLQQL at 115	Цитоплазма Цитоскелет Ядро Плазмена мембрана	Ядро Пероксизоми	Участва в: -стабилизиране на клетъчната стена при пролифериращи клетки - Pkc1p-MAP киназния път, който е сензор за наличие на хранителни вещества - Pkc1p-MAP киназния път, който поддържа клетъчната жизнеспособност при гладуване по въглерод, както и увеличава преживяемостта на култури в стационарна фаза
Протеин киназа С - α (NP_002728.2) (672 aa)	<i>PRKCA (Gene ID: 5578)</i> <i>Homo sapiens</i>	Ядрени сигнали за локализация (NUCDISC): pat7: PSDKDRR (3) at 233; основни АК остатъци: 13.2%		Ядро Цитоплазма	Участва в клетъчни процеси като клетъчна адхезия и трансформация, регулация на клетъчния цикъл и обема на клетката.
Протеин киназа С – β (NP_997700.1) (673 aa)	<i>PRKCB (Gene ID: 5578)</i> <i>Homo sapiens</i>	Ядрени сигнали за локализация (NUCDISC): основни АК остатъци: 13.5 %		Ядро Ендоплазмен ретикулум	Участва в много различни клетъчни функции, като активиране на В клетки,

		ЕР мембранен сигнал: KKXX- като мотив в С-края: PEVK (Pro, Glu, Val, Lys).		Цитозол	индуциране на апоптоза, пролиферация на ендотелни клетки
Протеин киназа С – делта (NP_001341605) (695 aa)	PRKCD (Gene ID: 5580) <i>Homo sapiens</i>	ЕР мембранен сигнал: XXRR- мотив в N-края: RERQ		Ендоплазмен ретикулум Цитозол	Участва в позитивна регулация на клетъчния цикъл, регулира позитивно или негативно апоптозата на клетките.
Протеин киназа С – епсилон (NP_005391) (737 aa)	PRKCE (Gene ID: 5581) <i>Homo sapiens</i>	Гавел: сайт за срязване на митохондриалния сигнал: R-2 мотив на 42 (PRP QT) Ядрени сигнали за локализация (NUCDISC): pat4: RPRK (4) at 152 pat4: PRKR (4) at 153 pat4: RRKK (5) at 319 pat7: PRKRQGA (5) at 153 pat7: PRIKTKR (3) at 687 Основни АК остатъци: 13.3%		Митохондрии Ядро Цитозол	Участва в клетъчния отговор при топлинен стрес, регулира апоптозата, преноса на нервни импулси
Протеин киназа С – зета (XP_016857279) (600 aa)	PRKCZ (Gene ID: 5590) <i>Homo sapiens</i>	Митохондриален сигнал (MITDISC): клъстер от R content: 3 Hyd Moment(75): 11.66 Hyd Moment(95): 10.84G content: 6		Митохондрии Ендоплазмен ретикулум Пероксизоми Цитозол	

		D/E content: 2 S/T content: 3 Score: -4.94 Гавел: сайт за срязване на митохондриалния сигнал: R-2 мотив на 27 (VRL KA) ЕР мембранен сигнал: XXRR - мотив в N-края: PSRT (Pro, Ser, Arg, Thr) Пероксизомален сигнал (PTS2 / SKL2): KLYRANGHL at 124			
--	--	---	--	--	--

За петте изследвани човешки протеини от семейството на протеин киназа С беше установено, че с най-голяма вероятност те се локализируют в цитозола на клетката. Независимо от това, установяването на различни насочващи сигнали в първичната им структура предполага, че при определени условия те могат да бъдат насочени към тези клетъчни органели, където играят важна роля на регулатори на различни клетъчни процеси.

3.4. Snf1p протеин киназа

Генът *SNF1* кодира дрождевия хомолог на човешката АМФ-активирана протеин киназа (AMPK). AMPK 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). Дрождевата Snf1p също се индуцира, когато *in vivo* нивото на АТФ / АМФ се понижи, но се предполага че при тези микроорганизми то е индиректно (Wilson et al., 2003). Например, в присъствието на глюкоза, Snf1p протеин киназата е неактивна, в резултат на което се осъществява преференциалното усвояване на глюкоза като източник на въглерод (Wilson et al., 2003). Когато нивата на глюкоза спаднат, Snf1p бързо се активира (в рамките на 5 минути) и индуцира експресията на гени, необходими за асимилацията на алтернативни въглеродни източници и съответните метаболитни пътища, генериращи АТФ (Wilson et al., 2003). Мутанти, при които липсва гена *SNF1*, не могат да усвояват неферментируеми източници на въглерод, като етанол и глицерол, в резултат на което скоро след диауксичния преход загиват (Hardie et al., 1998). Това, както и други доказателства показва, че адаптирането към преминаването към респираторен метаболизъм и използването на алтернативни въглеродни източници са важни фактори за правилното навлизане в стабилно G₀ състояние.

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 (AMPK) (NP_006243.2) при човек (Фиг. 59 и 60). Сравнително високия процент на сходство показва, че генът, кодиращ Snf1p протеин киназа е ортолог на AMPK при човека. AMPK 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

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=human>)

[illegible]

Фигура 59: Сравняване на секвенциите на Snflp протеин киназа при *S. cerevisiae* с АМПК при човек.

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

Фигура 60: Матрица за идентичност между изследваните Snf1p и AMPK.

Данните от проведения *in silico* анализ за вълтреклетъчната локализация на Snf1p при *S. cerevisiae*, показва, че с най-голяма вероятност този протеин се локализира в ядрото (47.8 %), като беше идентифициран и сигнален мотив за насочване към клетъчната вакуола - TLPK в 270 позиция (Таблица 4). По литературни данни при дрожди *S. cerevisiae* Snf1p се импортира също във втори клетъчен органел – ендоплазмен ретикулум (Mizuno et al., 2015), независимо че анализът на вълтреклетъчната локализация на протеина при същия вид, не показва наличие на последователност за насочване към този клетъчен участък. Локализацията на протеина в ЕР е във връзка с ролята му на

основен регулатор на процеси, обуславящи устойчивост при стрес от околната среда и по-специално осъществяване на негативна регулация на стресовия отговор в ендоплазмения ретикулум. Установено е, че *snf1* мутантни клетки проявяват свръхчувствителност към различни външни стресови фактори, включително алкално рН, топлинен шок и генотоксичен стрес, вследствие въздействие с хидроксиурея и метилметансулфонат (Hedbacker and Carlson., 2008).

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 4). С най-голяма вероятност този ензим се локализира в цитоплазмата на клетката (65.2 %).

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

<u>Протеин</u>	Ген	Сигнали	Локализация SGD /NCBI	Локализация PSORT II	Биологични процеси
АМФ-активирана серин / треонин протеин киназа (633 aa)	SNF1 (YDR477W) <i>S. cerevisiae</i>	Ядрени сигнали за локализация (NUCDISC): основни АК остатъци: 11.1 % Вакуолен сигнал за локализация (VAC): TLPK at 270	Цитоплазма Ядро	Ядро Вакуола	Участва в: - клетъчния отговор при гладуване по азот - клетъчния отговор към външен стрес като топлинен и оксидативен стрес - позитивна регулация на филаментозен растеж при дрожди в отговор на гладуване - репликативно клетъчно стареене - позитивна регулация на глюконеогенеза, макроавтофагия, псевдохифален растеж - фосфорилиране на протеини и др.
АМФ-активирана протеин киназа –каталитична субединица 2(АМРК) NP_006243.2 (552 aa)	PRKAA2 (Gene ID 5563) <i>Homo sapiens</i>	Ядрени сигнали за локализация (NUCDISC): основни АК остатъци: 12.1 %	Цитоплазма	Цитоплазма Ядро	Участва в: - регулация на клетъчния енергиен статус - клетъчния отговор при стрес - регулацията на биосинтезата на мастни киселини и холестерол

Заклучение

Всички живи организми са изложени постоянно на различни стресови фактори от околната среда, включително липса на хранителни вещества, химични съединения ултравиолетови лъчи, топлина и др. Ето защо, всяка клетка притежава различни защитни механизми за поддържане на жизнения статус в условия на стрес. Многобройни проучвания показват, че редица протеини, играещи ключова роля в регулацията на клетъчния адаптивен отговор към външен стрес, са функционално консервативни при дрожди и човек и се кодират от съответни гени ортолози. Изучаването на тяхната роля и вътреклетъчна локализация при човека се улеснява чрез използване на дрождеви клетки в състояние на покой, които наподобяват клетките на бозайниците и човешките стволови клетки. Изследването на регулаторните механизми, които са отговорни за навлизането и оцеляването в G_0 състояние е важно не само за изучаване на механизмите на стресов отговор, но и за разработването на терапии за различни заболявания. Ето защо, въз основа на всички проведени изследвания и анализирането на получените научни данни бе съставен „Физиологичен профил“ за отговор към стрес на клетки *S. cerevisiae*, намиращи се в различна фаза на клетъчния цикъл – пролиферативна, G_0 и стационарна непролиферативна фаза (Фиг. 61).

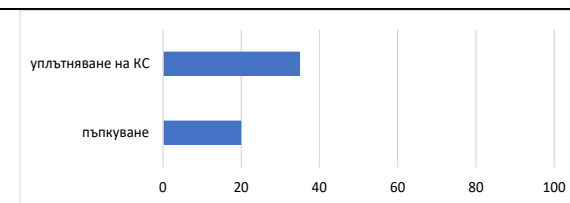
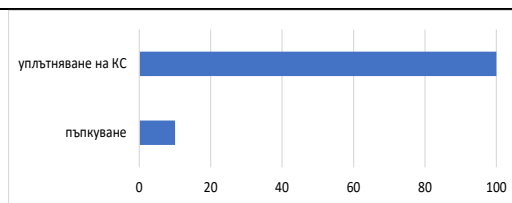
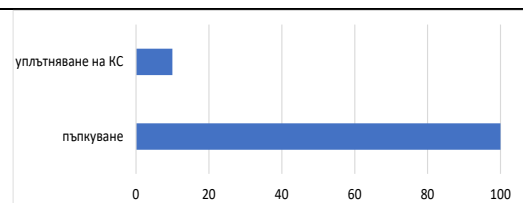
„Функционален профил на стресов отговор“ при *S. cerevisiae* BY4741

*Клетки в пролиферативна фаза
(Log)*

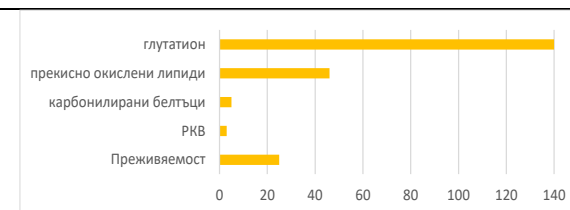
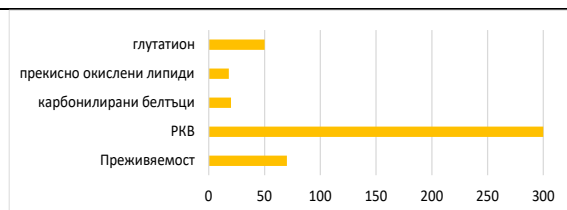
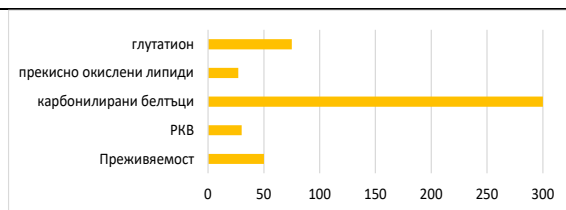
*Клетки във фаза на покой
(Go)*

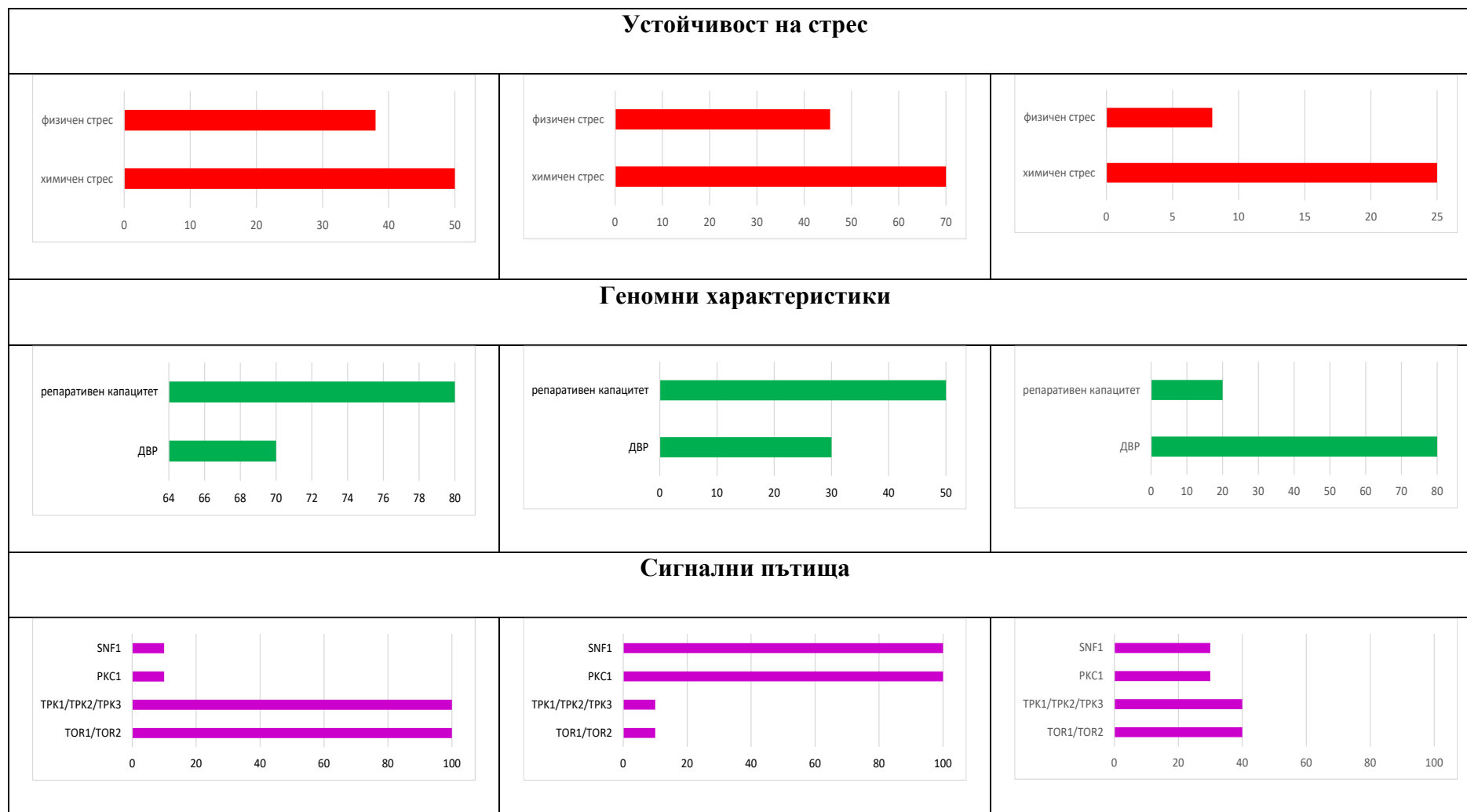
*Стационарни непролиферативни клетки
(NQ)*

Морфологични характеристики



Метаболитни характеристики





Фигура 61: 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.

Прилагането на такива *in vitro* модели при оценка на риска при използването на различни токсични съединения значително би подобрило нашето ограничено разбиране за лекарствените препарати и механизмите на тяхното токсично действие. От обществена гледна точка моделните *in vitro* системи са много по-полезни и хуманни, тъй като тяхното приложение не включва тестване върху живи животни. Усъвършенстването на тези *in vitro* модели за осъществяване на последователни, бързи и рентабилни тестове за токсичност е от голямо значение, тъй като те имат различни предимства: намаляване на броя на опитни животни, намалената цена за поддръжка на тези животни, както и необходимост от по-малки количества на химичните вещества, които се тестват. Всичко това предполага и съкращаване на необходимото време и увеличаване на производителността за оценка на голям брой химични съединения и техния метаболизъм. През годините са използвани много различни *in vitro* модели за тестване на лекарствена токсичност, но именно установяването на възможността на еукариотните дрождеви микроорганизми *S. cerevisiae* да навлизат в състояние на покой G₀, силно наподобяващо това при човешки клетки, предостави нови възможности за разработване на моделни тест системи на базата на тези микроорганизми.

VI. 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 μM за менадион, 5 mM за водороден пероксид, 1,1 mg/ml за ибупрофен и 50 $\mu\text{g/ml}$ 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. G_0 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 G_0 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 G_0 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.

VII. 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 *S. cerevisiae* 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 G_0 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 G_0 състояние обуславя 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. G_0 клетките са по-устойчиви на химичен и физичен стрес от пролифериращите и стационарните нелатентни клетки, което ги прави подходящи и за потенциални индустриални приложения.

VIII. Използвана литература

1. **Abualhasan M., (2015).** “SYNTHESIS AND FORMULATION OF IBUPROFEN PRO-DRUGS FOR ENHANCED TRANSDERMAL ABSORPTION”, *Int J Pharm Pharm Sci*, vol. 7, no. 2, pp. 352–354.
2. **Acar M., Becskei A., van Oudenaarden A., (2005).** Enhancement of cellular memory by reducing stochastic transitions. *Nature*. 435:228–232. doi: 10.1038/nature03524.
3. **Adachi S., Yamada S., Takatsu Y., Matsui H., Kinoshita M., Takase K., Sugiura H., Ohtaki T., Matsumoto H., Uenoyama Y., Tsukamura H., Inoue K., Maeda K., (2007).** Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*. 53(2):367-78. doi: 10.1262/jrd.18146. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17213691.
4. **Adams SS., (1992).** The propionic acids: a personal perspective. *J Clin Pharmacol*. 32(4):317-23.
5. **Ades SE., (2004).** Control of the alternative sigma factor σ^E in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*. Volume 7, Issue 2, Pages 157-162.
6. **Adusumilli VS., Walker TL., Overall RW., Klatt GM., Zeidan SA., Zocher S., Kirova DG., Ntitsias K., Fischer TJ., Sykes AM., Reinhardt S., Dahl A., Mansfeld J., Rünker AE., Kempermann G., (2021).** ROS Dynamics Delineate Functional States of Hippocampal Neural Stem Cells and Link to Their Activity-Dependent Exit from Quiescence. *Cell Stem Cell*. 28(2):300-314.e6. doi: 10.1016/j.stem.2020.10.019. PMID: 33275875.
7. **Albertyn J., Hohmann S., Prior BA., (1994).** Characterization of the osmotic stress response in *S. cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol 3-phosphate dehydrogenase independently, *Curr. Genet*. 25, 12 - 18.
8. **Alemohammad MM., Knowles CJ., (1974).** Osmotically induced volume and turbidity changes of *Escherichia coli* due to salts, sucrose and glycerol, with particular reference to the rapid permeation of glycerol into the cell. *J Gen Microbiol*. 82(1):125-42. doi: 10.1099/00221287-82-1-125. PMID: 4604867.
9. **Alhamdy T., Al-Sowayan N., (2020).** The Effect of Sunscreens on Yeast to Prevent Ultraviolet Damage. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 11, 111-122.

10. **al-Khodairy F., Carr AM., (1992).** DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J. 11(4):1343-50. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05179.x. PMID: 1563350; PMCID: PMC556583.
11. **Allen C., Büttner S., Aragon AD., Thomas JA., Meirelles O., Jaetao JE., Benn D., Ruby SW., Veenhuis M., Madeo F., (2006).** Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. J Cell Biol; 174:89-100; PMID:16818721.
12. **Alliger H., (1975).** Ultrasonic disruption. Am. Laboratory, 10, pp. 75-85.
13. **Allison SD., Chang B., Randolph TW., Carpenter JF., (1999).** Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration induced protein unfolding, Arch. Biochem. Biophys. 356, 289 - 298.
14. **Altman RB., (2012).** Introduction to translational bioinformatics collection. PLoS Comput Biol. 8(12):e1002796. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002796. Epub 2012 Dec 27. PMID: 23300404; PMCID: PMC3531318.
15. **Altmann K., Durr M., Westermann B., (2007).** *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. Methods Mol Biol. 372:81–90.
16. **Amend A., Oliver T., Amaral-Zettler L., Boetius A., Fuhrman JA., Horner-Devine M., Huse S., Welch D., Martiny A., Ramette A., Zinger L., Martiny J., (2013).** Macroecological patterns of marine bacteria on a global scale, Journal of Biogeography, 40 (4), pp. 800-811. doi: 10.1111/jbi.12034.
17. **Ames BN., Yanofsky C., (1971).** The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. Chemical Mutagens. Hollaender, A., ed. New York, Plenum Press pp. 267-287.
18. **Ansell R., Granath K., Hohmann S., Thevelein JM., Adler L., (1997).** The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J 16(9):2179–2187. doi:10.1093/emboj/16.9.2179.
19. **Aragon AD., Rodriguez AL., Meirelles O., Roy S., Davidson GS., Tapia PH., Allen C., Joe R., Benn D., Werner-Washburne M., (2008).** Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. Mol. Biol. Cell. 19:1271–1280.

20. **Aravind L., Koonin EV., (1999).** DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res.* 27(23):4658-70. doi: 10.1093/nar/27.23.4658. PMID: 10556324; PMCID: PMC148756.
21. **Arcos JC., Argus MF., (1974).** Chemical Induction of Cancer. New York, Academic Press, 11A:338-339.
22. **Ariño J., (2010).** Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *J Integr Biol*, 14, 517, 23.
23. **Arlia-Ciommo A., Leonov A., Piano A., Svistkova V., Titorenko VI., (2014).** Cell-autonomous mechanisms of chronological aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell.* 1(6):163-178. doi: 10.15698/mic2014.06.152. PMID: 28357241; PMCID: PMC5354559.
24. **Arthur H., Watson K., (1976).** Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *J Bacteriol.* 128(1):56-68. doi: 10.1128/jb.128.1.56-68.1976. PMID: 988016.
25. **Avendaño C., Menéndez JC., (2015).** Anticancer Drugs Acting via Radical Species: Radiotherapy and Photodynamic Therapy of Cancer. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.* 133-195.
26. **Ayala A., Muñoz MF., Argüelles S., (2014).** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438.. PMID: 24999379; PMCID: PMC4066722.
27. **Babazadeh R., (2014).** Integrative analysis of osmoregulation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ISBN: 978-91-628-9020-9.
28. **Badotti F., Dário MG., Alves JS., (2008).** Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* *Microb Cell Fact.* 7, 111.
29. **Barahona S., Yuivar Y., Socias G., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M., (2016).** Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica. *Extremophiles* 20:479–491
30. **Barbet NC., et. al., (1996).** TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol biol cell* 7(1):25-42.

31. **Barnes S., Brown KW., Krusemark E., Campbell WK., Rogge RD., (2007).** The role of mindfulness in romantic relationship satisfaction and responses to relationship stress. *J Marital Fam Ther.* 33(4):482-500. doi: 10.1111/j.1752-0606.2007.00033.x. PMID: 17935531.
32. **Barnett T., Atwood T., Blasdel B., Boker C., Anderson T., (2016).** *The Effects of Different Concentrations of Sucrose on the Growth of Yeast. Journal of Introductory Biology Investigations. Vol 4, No 3.*
33. **Bayliak M., Semchyshyn H., Lushchak V., (2006).** Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain-specific. *Biochemistry (Mosc).* 71(9):1013-20. doi: 10.1134/s0006297906090100. PMID: 17009956.
34. **Beck H., Dobritsch D., Piskur J., (2008).** *Saccharomyces kluyveri* as a model organism to study pyrimidine degradation. *FEMS Yeast Res*, 8:1209–1213.
35. **Beckett GJ., Hayes JD., (1993).** Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv Clin Chem.* 30:281-380. doi: 10.1016/s0065-2423(08)60198-5. PMID: 8237562.
36. **Bellinger Y., Larher F., (1987).** ¹³C comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeast *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media, *Can. J. Microbiol.* 34, 605 - 612 A.
37. **Benaroudj DH., Lee AL., (2001).** Goldberg, Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.* 276, 24261–24267.
38. **Bennett CB., Lewis LK., Karthikeyan G., Lobachev KS., Jin YH., Sterling JF., Snipe JR., Resnick MA., (2001).** Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nat Genet* 29(4):426-34
39. **Benson DA., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman DJ., Ostell J., Sayers EW., (2013).** GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195. PMID: 23193287; PMCID: PMC3531190.
40. **Bérdy J., (1980).** Recent advances in and prospects of antibiotic research. *Process Biochem* 15: 28–35.
41. **Bethke CM., Sanford RA., Kirk MF., Jin Q, Flynn TM., (2011).** The Thermodynamic Ladder in Geomicrobiology. *Science Paper Vol. 311, Issue 3.* doi.org/10.2475/03.2011.01.

42. **Bhaganna P., Volkers RJ., Bell AN., Kluge K., Timson DJ., McGrath JW., Ruijsenaars HJ., Hallsworth JE., (2010).** Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. *Microb Biotechnol.* 3(6):701-16. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00203.x. PMID: 21255365.
43. **Biddick R., Young ET., (2009)** The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast.* 26:205–220.
44. **Bilinski J., Grzesiowski P., Sorensen N., Madry K., Muszynski J., Robak K., Wroblewska M., Dzieciatkowski T., Dulny G., Dwilewicz-Trojaczek J., Wiktor-Jedrzejczak W., Basak GW., (2017).** Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Blood Disorders Inhibits Gut Colonization With Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study. *Clin Infect Dis.* 65(3):364-370. doi: 10.1093/cid/cix252. PMID: 28369341.
45. **Bivi N., Romanello M., Harrison R., Clarke I., Hoyle DC., Moro L., Ortolani F., Bonetti A., Quadri-Foglio F., Tell G., Delneri D., (2009).** Identification of secondary targets of N-containing bisphosphonate in mammalian cells via parallel competition analysis of the barcoded yeast deletion collection. *Genome Biol.* 10, R93.
46. **Blomberg A., (2000).** Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaption to saline conditions: questions, some answers, and a model, *FEMS Microbiol. Let.* 182, 1-8.
47. **Blomberg A., Adler L., (1992).** Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* 33:145-212.
48. **Botstein D., Chervitz SA., Cherry JM., (1997).** Yeast as a model organism. *Science.* 277(5330):1259-60. doi: 10.1126/science.277.5330.1259. PMID: 9297238.
49. **Botstein D., Fink GR., (2011).** Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics.* 189(3):695-704. doi: 10.1534/genetics.111.130765. PMID: 22084421.
50. **Boulloc P., D'Ari R., (1991).** *Escherichia coli* metabolism in space. *J Gen Microbiol.* 1991 Dec;137(12):2839-43. doi: 10.1099/00221287-137-12-2839. PMID: 1791437.
51. **Bourbouloux A., Shahi P., Chakladar A., (2000).** Hgt1p, A high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2000;275:13259–13265.

52. **Bourrouet A., Garcia J., Mujeriego R., Penuelas G., (2001).** Faecal bacteria and bacteriophage inactivation in a full-scale UV disinfection system used for wastewater reclamation. *Water Sci. Technol.*, 43: 187-194.
53. **Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M., (1998).** Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, Vol.180, No.5, pp. 1044-1052, ISSN 0021-9193.
54. **Brocard-Masson C., Dumas B., (2006).** The fascinating world of steroids: *S. cerevisiae* as a model organism for the study of hydrocortisone biosynthesis. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 22:213 - 252.
55. **Brombacher K., Fischer BB., Rüfenacht K., Eggen RI., (2006).** The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast* 23: 741–750.
56. **Brown AD., Simpson JR., (1972).** Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72: 589–591.
57. **Brown JP., Josse RG., (2002).** Scientific Advisory Council of the Osteoporosis Society of Canada. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ.* 167(10 Suppl):S1-34.
58. **Bruno-Bárcena JM., Azcárate-Peril MA., Hassan HM., (2010).** Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids. *Appl Environ Microbiol.* 2010 May;76(9):2747-53. doi: 10.1128/AEM.02718-09. PMID: 20305033.
59. **Buffinton GD., Ollinger K., Bruninark A., Cadenas E., (1989).** *Biochem. J.* 257, 561- 571.
60. **Burger RM., (1998).** Cleavage of nucleic acids by bleomycin. *Chem. Rev.* 98:1153–1169.
61. **Bussey H., Storms RK., Ahmed A., Albermann K., Allen E., Ansorge W., Araujo R., Aparicio A., Barrell B., Badcock K., Benes V., Botstein D., Bowman S., Brückner M., Carpenter J., Cherry JM., Chung E., Churcher C., Coster F., Davis K., Davis RW., Dietrich FS., Delius H., DiPaolo T., Hani J., (1997).** The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI. *Nature.* 387(6632 Suppl):103-5. PMID: 9169875.

62. **Cabiscol E., Tamarit J., Ros J., (2000).** Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 3(1):3-8. PMID: 10963327.
63. **Cabrera M., Langemeyer L., Mari M., Rethmeier R., Orban I., Perz A., Bröcker C., Griffith J., Klose D., Steinhoff HJ., Reggiori F., Engelbrecht-Vandré S., Ungermann C., (2010).** Phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif switches function of the HOPS subunit Vps41 in membrane tethering. *J Cell Biol* 191(4):845-59.
64. **Cadet J., Douki T., (2018).** Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem Photobiol Sci* 17(12):1816–41.
65. **Cadet J., Wagner JR., (2013).** DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(2):a012559. doi: 10.1101/cshperspect.a012559. PMID: 23378590; PMCID: PMC3552502.
66. **Calabrese EJ., (2015).** Hormesis within a mechanistic context. *Homeopathy.* 2015;104(2):90–96.
67. **Calabrese V., Cornelius C., Cuzzocrea S., Iavicoli I., Rizzarelli E., Calabrese EJ., (2011).** Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol Aspects Med.* 32(4-6):279–304.
68. **Calahorra M., Martínez GA., Hernández-Cruz A., (1998).** Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast*, 14, 501, 15.
69. **Calamini B., Morimoto RI., (2012).** Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation. *Curr Top Med Chem.* 12(22):2623-40. doi: 10.2174/1568026611212220014. PMID: 23339312.
70. **Calberg-Bacq CM., (1971).** Drugs which form reversible complexes with DNA. *Fundamentals of Biochemical Pharmacology.* Pergamon Press, pp. 476-490.
71. **Cardenas ME., Cutler NS., Lorenz MC., Di Como CJ., Heitman J., (1999).** The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes and development*, Vol.13, No.24, pp. 3271-3279, ISSN 0890-9369.
72. **Carmelo V., Santos H., Sá-Correia I., (1997).** Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1325(1):63-70. doi: 10.1016/s0005-2736(96)00245-3. PMID: 9106483.

73. **Carmona-Gutierrez D., Bauer MA., Zimmermann A., Aguilera A., Austriaco N., Ayscough K., Balzan R., Bar-Nun S., Barrientos A., Belenky P., Blondel M., Braun RJ., Breitenbach M., Burhans WC., Büttner S., Cavalieri D., Chang M., Cooper KF., Côte-Real M., Costa V., Cullin C., Dawes I., Dengjel J., Dickman MB., Eisenberg T., Fahrenkrog B., Fasel N., Fröhlich KU., Gargouri A., Giannattasio S., Goffrini P., Gourlay CW., Grant CM., Greenwood MT., Guaragnella N., Heger T., Heinisch J., Herker E., Herrmann JM., Hofer S., Jiménez-Ruiz A., Jungwirth H., Kainz K., Kontoyiannis DP., Ludovico P., Manon S., Martegani E., Mazzoni C., Megeney LA., Meisinger C., Nielsen J., Nyström T., Osiewacz HD., Outeiro TF., Park HO., Pendl T., Petranovic D., Picot S., Polčic P., Powers T., Ramsdale M., Rinnerthaler M., Rockenfeller P., Ruckenstuhl C., Schaffrath R., Segovia M., Severin FF., Sharon A., Sigrist SJ., Sommer-Ruck C., Sousa MJ., Thevelein JM., Thevissen K., Titorenko V., Toledano MB., Tuite M., Vögtle FN., Westermann B., Winderickx J., Wissing S., Wölfl S., Zhang ZJ., Zhao RY., Zhou B., Galluzzi L., Kroemer G., Madeo F., (2018).** Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. *Microb Cell.* 5(1):4-31. doi: 10.15698/mic2018.01.607. PMID: 29354647.
74. **Carmona-Gutierrez D., Eisenberg T., Büttner S., Meisinger C., Kroemer G., Madeo F., (2010).** Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell death differ* 17(5):763-73.
75. **Carvalho BS., Rustici G., (2013).** The challenges of delivering bioinformatics training in the analysis of high-throughput data. *Brief Bioinform.* 14(5):538-47. doi: 10.1093/bib/bbt018. Epub 2013 Mar 29. PMID: 23543353.
76. **Cascorbi I., (2006).** Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals, *Toxicol. Lett.* 15 (2006) 16–28.
77. **Castro-González MI., Méndez-Armenta M., (2008).** Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008 Nov;26(3):263-71. doi: 10.1016/j.etap.2008.06.001. PMID: 21791373.
78. **Causton HC., Ren B., Koh SS., Harbison CT., Kanin E., Jennings EG., Lee TI., True HL., Lander ES., Young RA., (2001).** Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 12(2):323-37. doi: 10.1091/mbc.12.2.323. PMID: 11179418.
79. **Chankova SG., Dimova E., Dimitrova M., Bryant PE., (2007).** Induction of DNA double-strand breaks by eocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased

DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiation and Environmental Biophysics* 46(4): 409–416.

80. **Chemat F., Zill-e-Huma., Khan M.K., (2011).** Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.*, 18, pp. 813-835.
81. **Chen BJ., Causton HC., Mancenido D., Goddard NL., Perlstein EO., Pe'er D., (2010).** Harnessing gene expression to identify the genetic basis of drug resistance. *Mol. syst.biol.* 5, 1–14.
82. **Chen BJ., Causton HC., Mancenido D., Goddard NL., Perlstein EO., Pe'er D., (2010).** Harnessing gene expression to identify the genetic basis of drug resistance. *Mol. syst.biol.* 5, 1–14.
83. **Chen D., Toone WM., Mata J., Lyne R., Burns G., Kivinen K., Brazma A., Jones N., Bähler J., (2003).** Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol biol cell* 14:214 - 229.
84. **Chen J., Stubbe J., (2004).** Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:175–181.
85. **Chen RE., Thorner J., (2007).** Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1773(8):1311-40. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.05.003. Epub 2007 May 22. PMID: 17604854; PMCID: PMC2031910.
86. **Cherry JM., Hong EL., Amundsen C., Balakrishnan R., Binkley G., Chan ET., Christie KR., Costanzo MC., Dwight SS., Engel SR., Fisk DG., Hirschman JE., Hitz BC., Karra K., Krieger CJ., Miyasato SR., Nash RS., Park J., Skrzypek MS., Simison M., Weng S., Wong ED., (2012).** Jou *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res* 40 (Database issue):D700-5. Journal Article.
87. **Cheung Tim., Ko Jessica., Lee Jae., Manpreet Takhi., (2014).** The Effect of Temperature on the Growth Rate of *Saccharomyces cerevisiae*. *The expedition Issue* Vol. 4.
88. **Choder M., (1991).** A general topoisomerase I-dependent transcriptional repression in the stationary-phase of yeast. *Genes Dev.* 5, 2315–2326.

89. **Chong JJ., Yang X., Don CW., Minami E., Liu YW., Weyers JJ., Mahoney WM., Van Biber B., Cook SM., Palpant NJ., Gantz JA., Fugate JA., Muskheli V., Gough GM., Vogel KW., Astley CA., Hotchkiss CE., Baldessari A., Pabon L., Reinecke H., Gill EA., Nelson V., Kiem HP., Laflamme MA., Murry CE., (2014).** Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 510(7504):273-7. doi: 10.1038/nature13233. Epub 2014 Apr 30. PMID: 24776797.
90. **Chou KC., Shen HB., (2010).** A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0. *PLoS One*. 2010 Apr 1;5(4):e9931. doi: 10.1371/journal.pone.0009931. PMID: 20368981.
91. **Chung SH., Chung SM., Lee JY., Kim SR., Park KS., (1999).** The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. *FEBS Lett*. 23:235–240.
92. **Ciccolini L., Taillandier P., Wilhelm AM., Delma H., Strehaiano P., (1997).** Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: Effect of temperature and of ultrasonic power. *Chemical Engineering Journal*, 65, 145–149.
93. **Ciferri O., Tiboni O., Di Pasquale G., Orlandoni AM., Marchesi ML., (1986).** Effects of microgravity on genetic recombination in *Escherichia coli*. *Naturwissenschaften*. 73(7):418-21. doi: 10.1007/BF00367284. PMID: 3531875.
94. **Clark WR., Gao D., (2002).** Properties of membranes used for hemodialysis therapy. *Semin Dial*. 15(3):191-5. doi: 10.1046/j.1525-139x.2002.00019.x. PMID: 12100457.
95. **Claussen CA., Long EC., (1999).** Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem. Rev.* 99:2797–2816.
96. **Clément K., Vaisse C., Lahlou N., Cabrol S., Pelloux V., Cassuto D., Gormelen M., Dina C., Chambaz J., Lacorte JM., Basdevant A., Bougnères P., Lebouc Y., Froguel P., Guy-Grand B., (1998).** A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 392(6674):398-401. doi: 10.1038/32911. PMID: 9537324.
97. **Clough E., Barrett T., (2016).** The Gene Expression Omnibus Database. *Methods Mol Biol*. 1418:93-110. doi: 10.1007/978-1-4939-3578-9_5. PMID: 27008011.
98. **Cogburn LA., Porter TE., Duclos MJ., Simon J., Burgess SC., (2007).** Functional genomics of the chicken—a model organism. *Poult Sci.*, 86:2059 - 2094.

99. **Coliva G., Duarte S., Pérez-Sala D., Fedorova M., (2019).** Impact of inhibition of the autophagy-lysosomal pathway on biomolecules carbonylation and proteome regulation in rat cardiac cells. *Redox Biology*. Volume 23, 101123.
100. **Conway E.J., Brady T.G., (1950).** Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem J*, 47, 360, 9.
101. **Costa V., Moradas-Ferreira P., (2001).** Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol aspects Med*22: 217–246.
102. **Costa V., Quintanilha A., Moradas-Ferreira P., (2007).** Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life* 59 (4-5):293-8.
103. **Costigan C., Snyder M., (1994).** SLK1, a yeast homolog of MAP kinase activators, has a RAS/cAMP-independent role in nutrient sensing. *Mol. gen. genet.* 243:286–296.
104. **Crawford AH., (1968).** Large scale ultrasonic cleaning. *Ultrasonics*. Volume 6, Issue 4, Pages 211-216.
105. **Cray JA., Bell ANW., Bhaganna P., Mswaka AY., Timson DJ., Hallsworth JE., (2013b).** The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microb Biotechnol* 6:453 – 492.
106. **Cray JA., Russell JT., Timson DJ., Singhal RS., Hallsworth JE., (2013a).** A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environ Microbiol* 15:287–296. doi:10.1111/1462-2920.12018.
107. **Cray JA., Stevenson A., Ball P., Bankar SB., Eleutherio ECA., Ezeji TC., Singhal RS., Thevelein JM., Timson DJ., Hallsworth JE., (2015a).** Chaotropicity: a key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* 33:228–259. doi:10.1016/j.copbio.2015.02.010.
108. **Crowe JH., Crowe IM., Chapman D., (1984).** Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose, *Science* 223, 701—703.
109. **Crowe JH., Hoekstra FA., Crowe LM., (1992).** Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol*, 54:579-599.

110. **Cutler TD., Zimmerman JJ., (2011).** Ultraviolet irradiation and the mechanisms underlying its inactivation of infectious agents. *Anim Health Res Rev.* 12(1):15-23. doi: 10.1017/S1466252311000016. PMID: 21676338.
111. **Davidson GS., Joe RM., Roy S., Meirelles O., Allen CP., Wilson MR., Tapia PH., Manzanilla EE., Dodson AE., Chakraborty S., Carter M., Young S., Edwards B., Sklar L., Werner-Washburne M., (2011).** The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Mol Biol Cell* 22(7):988-98.
112. **Davies KJ., (1995).** Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 1995;61:1–31.
113. **Dawes IW., (2004).** Stress responses. In: Dickinson JR., Schweizer M., The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC Press, New York, 2004; pp. 376 – 438.
114. **de Cabo R., Carmona-Gutierrez D., Bernier M., Hall MN., Madeo F., (2014).** The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. *Cell.* 157(7):1515-26. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.031. PMID: 24949965.
115. **de Lima Alves F., Stevenson A., Baxter E., Gillion JL., Hejazi F., Hayes S., Morrison IE., Prior BA., McGenity TJ., Rangel DE., Magan N., Timmis KN., Hallsworth JE., (2015).** Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr Genet.* 61(3):457-77. doi: 10.1007/s00294-015-0496-8. PMID: 26055444.
116. **de Nadal E., Casadomé L., Posas F., (2003).** Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 23: 229–237
117. **De Paiva SR., Lima LA., Figueiredo MR., Kaplan MAC., (2004).** Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. *An Acad Bras Cienc.* 76:499–504.
118. **de Sousa Lopes SM., Roelen BA., Monteiro RM., Emmens R., Lin HY., Li E., Lawson KA., Mummery CL., (2004).** BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* 18(15):1838-49. doi: 10.1101/gad.294004. PMID: 15289457.

119. **De Virgilio C., (2012).** The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):306-39. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00287.x. Epub 2011 Jul 14. PMID: 21658086.
120. **De Virgilio C., Loewith R., (2006).** The TOR signalling network from yeast to man. *Int J biochem cell biol.* 38(9):1476-81.
121. **De Virgilio C., Piper P., Boller T., Wiemken A., (1991).** Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein hsp 104 and in the absence of protein synthesis. *FEBS Lett.* 288(1-2):86-90. doi: 10.1016/0014-5793(91)81008-v. PMID: 1831771.
122. **Dean RT., Fu S., Stocker R., Davies MJ., (1997).** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324 (Pt 1)(Pt 1):1-18. doi: 10.1042/bj3240001. PMID: 9164834.
123. **DeArmond B., Francisco CA., Lin JS., Huang FY., Halladay S., (1995).** Safety profile of over-the-counter naproxen sodium. *Clin Ther* 17: 587–601 discussion 586.
124. **Deguchi S., Matsui TS., Iio K., (2011).** The position and size of individual focal adhesions are determined by intracellular stress-dependent positive regulation. *Cytoskeleton (Hoboken).* 68(11):639-51. doi: 10.1002/cm.20541. PMID: 22021203.
125. **Delacôte F., Lopez BS., (2008).** Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle.* 7(1):33-8. doi: 10.4161/cc.7.1.5149. PMID: 18196958.
126. **Delaunay AD., Pflieger MB., Barrault J., Vinh MB., Toledano., (2002).** A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111:471–481.
127. **Demain AL., Fang A., (2000).** The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 69:1-39. doi: 10.1007/3-540-44964-7_1. PMID: 11036689.
128. **Deng Y., Liu J., Li L., Fang H., Tu J., (2015).** Reduction and restoration of culturability of beer-stressed and low-temperature-stressed *Lactobacillus acetotolerans* strain 2011-8. *Int. J. Food Microbiol.*, 20 (2015), pp. 96-101.
129. **DeNobel H., Ruiz C., Martin H., Morris W., Brul S., Molina M., (2000).** Cell wall perturbations in yeast result in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinases

- and the Slt2- mediated increase in FKS-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* 146, 2121–2123.
130. **Di Monte D., Bellomo G., Thor H., Nicotera P., Orrenius S., (1984).** Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984; 235:343–350.
 131. **Dinis-Oliveira RJ., Duarte JA., Sánchez-Navarro A., Remião F., Bastos ML., Carvalho F., (2008).** Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Crit Rev Toxicol.* 38(1):13-71. doi: 10.1080/10408440701669959. PMID: 18161502.
 132. **Dmitrieva IN., Burg MB., (2004).** Hypertonic stress response, *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Mutation Research* 569 (2005) 65—74.
 133. **Du Y., Fu Z., Calhoun VD., (2018).** Classification and Prediction of Brain Disorders Using Functional Connectivity: Promising but Challenging. *Front Neurosci.* 12:525. doi: 10.3389/fnins.2018.00525. PMID: 30127711.
 134. **Dyson M., (1982).** Non-thermal cellular effects of ultrasound. *Br J Cancer Suppl.* 5:165-71. PMID: 6950755.
 135. **Edelman AM., Blumenthal DK., Krebs EG., (1987).** Protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 56:567-613.
 136. **Eisenberg T., Büttner S., (2014).** Lipids and cell death in yeast. *FEMS Yeast Res.* 14(1):179-97. doi: 10.1111/1567-1364.12105. PMID: 24119111.
 137. **Elder SA., (1959).** Cavitation Microstreaming. *J Acoust Soc Am* 31, 54–64.
 138. **Elhasi T., Blomberg A., (2019).** Integrins in disguise - mechanosensors in *Saccharomyces cerevisiae* as functional integrin analogues. *Microb Cell.* 2019 Jul 15;6(8):335-355. doi: 10.15698/mic2019.08.686. PMID: 31404395.
 139. **Esterbauer H., Schaur RJ., Zollner H., (1991).** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81–128.
 140. **Estruch F., (2000).** Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.* 24(4):469-86. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00551.x. PMID: 10978547.
 141. **Estruch F., Carlson M., (1993).** Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:3872–3881.

142. **Evison LM., Rose AH., (1965).** Journal of General Microbiology, 39,555.
143. **Fabrizio P., Longo VD., (2003).** The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. Aging Cell. 2(2):73-81. doi: 10.1046/j.1474-9728.2003.00033.x. PMID: 12882320.
144. **Fabrizio P., Pozza F., Pletcher SD., Gendron CM., Longo VD., (2001).** Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. Science. Apr 13;292(5515):288-90.
145. **Falkowski PG., Fenchel T., Delong EF., (2008).** The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. Science. 320(5879):1034-9. doi: 10.1126/science.1153213. PMID: 18497287.
146. **Fang FC., (1997).** Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. J Clin Invest. 99(12):2818-25. doi: 10.1172/JCI119473. PMID: 9185502.
147. **Fang P., Lev-Lehman E., Tsai TF., Matsuura T., Benton CS., Sutcliffe JS., Christian SL., Kubota T., Halley DJ., Meijers-Heijboer H., Langlois S., Graham JM Jr., Beuten J., Willems PJ., Ledbetter DH., Beaudet AL., (1999).** The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. Hum Mol Genet. 8(1):129-35. doi: 10.1093/hmg/8.1.129. PMID: 9887341.
148. **Farrugia G., Balzan R., (2012).** Oxidative stress and programmed cell death in yeast. Front Oncol. 2:64. doi: 10.3389/fonc.2012.00064. PMID: 22737670.
149. **Farrugia G., Balzan R., (2013).** The proapoptotic effect of traditional and novel nonsteroidal anti-inflammatory drugs in mammalian and yeast cells. Oxid Med Cell Longev. 2013:504230. doi: 10.1155/2013/504230. PMID: 23983899.
150. **Favier R., Aoki N., de Moerloose P., (2001).** Congenital alpha (2) - plasmin inhibitor deficiencies: a review. Br J Haematol. 114(1):4-10. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02845.x. PMID: 11472338.
151. **Feldmann H., Butenandt A., (2005).** YEAST MOLECULAR BIOLOGY. A SHORT COMPENDIUM ON BASIC FEATURES AND NOVEL ASPECTS. Institute
152. **Fields S., Johnston M., (2005).** Whither model organism research? Science 307: 1885–1886.
153. **Finkel T., Holbrook NJ., (2000).** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408: 239–247.

154. **Flattery-O'Brien J., Collinson LP., Dawes IW., (1993).** *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J Gen Microbiol.* 139:501 - 507.
155. **Foster JW., (2004).** *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol.* 2(11):898-907. doi: 10.1038/nrmicro1021. PMID: 15494746.
156. **Foury F., (1997).** Human genetic diseases: across-talk between man and yeast. *Gene* 195, 1 - 10.
157. **Friedberg EC., Walker GC., Siede W., Wood RD., Schultz RA., Ellenberger T., (2006).** DNA repair and mutagenesis, second edition. Washington, DC: ASM Press; 2006.
158. **Fu S., Hick LA., Sheil MM., Dean RT., (1995).** Structural identification of valine hydroperoxides and hydroxides on radical-damaged amino acid, peptide, and protein molecules. *Free Radic. Biol. Med.* 1995;19(3):281–292.
159. **Fu SL., Dean RT., (1997).** Structural characterization of the products of hydroxyl-radical damage to leucine and their detection on proteins. *Biochem. J.* 324(1):41–48.
160. **Fuge EK., Braun EL., Werner-Washburne M., (1994).** Protein-synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176, 5802–5813.
161. **Furey SA., Waksman JA., Dash BH., (1992).** Nonprescription ibuprofen: side effect profile. *Pharmacotherapy* 12: 403–407.
162. **Futcher B., (2000).** Microarrays and cell cycle transcription in yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, 12 (6). pp. 710-715. ISSN 0955-0674.
163. **Gabriel AA., Vera DD., Lazo OMY., Azarcon VB., De Ocampo CG., Marasigan JC., Sandel GT., (2017).** Ultraviolet-C inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enterica* in liquid egg white. *Food Contr.*, 73 (2017), pp. 1303-1309.
164. **Galdieri L., Mehrotra S., Yu S., Vancura A., (2010).** Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *OMICS* (6):629-38. doi: 10.1089/omi.2010.0069. Epub 2010 Sep 23.

165. **Galluzzi LV., Berghe T., Vanlangenakker N., Buettner S., Eisenberg T., Vandenabeele P., Made F., Kroemer G., (2011).** Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int rev cell mol biol* 289:1–35.
166. **Gammie AE., Erdeniz N., Beaver J., Devlin B., Nanji A., Rose MD., (2007).** Functional characterization of pathogenic human MSH2 missense mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 177, 707 - 721.
167. **Ganske F., (2014).** UV absorbance DNA quantitation. *BMG LABTECH*.
168. **Gao X., Chen H., Schwarzschild MA., Ascherio A., (2011).** Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology* 76: 863–869.
169. **Gasch AP., Spellman PT., Kao CM., Carmel-Harel O., Eisen MB., Storz G., Botstein D., Brown PO., (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol biol cell* 11: 4241–4257.
170. **Gasch AP., Werner-Washburne M., (2002).** The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics*. 2(4-5):181-92. doi: 10.1007/s10142-002-0058-2. Epub 2002 Apr 30. PMID: 12192591.
171. **Gasset G., Tixador R., Eche B., Lapchine L., Moatti N., Toorop P., Woldringh C., (1994).** Growth and division of *Escherichia coli* under microgravity conditions. *Res Microbiol* 145, 112-120.
172. **Gavel Y., von Heijne G., (1990).** Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* 3(5):433-42. doi: 10.1093/protein/3.5.433. PMID: 2349213.
173. **Gavin AC., Aloy P., Grandi P., Krause R., Boesche M., Marzioch M., Rau C., Jensen LJ., Bastuck S., Dümpelfeld B., Edelmann A., Heurtier MA., Hoffman V., Hoefert C., Klein K., Hudak M., Michon AM., Schelder M., Schirle M., Remor M., Rudi T., Hooper S., Bauer A., Bouwmeester T., Casari G., Drewes G., Neubauer G., Rick JM., Kuster B., Bork P., Russell RB., Superti-Furga G., (2006).** Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*. 440(7084):631-6. doi: 10.1038/nature04532. PMID: 16429126.
174. **Giaever G., Flaherty P., Kumm J., Proctor M., Nislow C., Jaramillo DF., Chu AM., Jordan MI., Arkin AP., Davis RW., (2004).** Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecule sin yeast. *Proc. natl. acad. Sci.U.S.A.* 101, 793–798.

175. **Gillet LCJ., Schärer OD., (2006).** Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev.* 106:253–76.
176. **Glory E., Murphy RF., (2007).** Automated Subcellular Location Determination and High-Throughput Microscopy. *Developmental Cell*, 12, 7-16.
177. **Glover JR., Lindquist S., (1998).** Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell.* 94(1):73-82. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81223-4. PMID: 9674429.
178. **Go Y., Jones DP., (2013).** The Redox Proteome. *J. Biol. Chem.* 288:26512–26520. doi: 10.1074/jbc.R113.464131.
179. **Goffeau A., Barrell BG., Bussey H., Davis RW., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel JD., Jacq C., Johnston M., Louis EJ., Mewes HW., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver SG., (1996).** Life with 6000 genes. Journal article. *Science* 274(5287):546, 563-7.
180. **Gomase VS., Tagore S., (2008).** Toxicogenomics. *Curr. drug metab.* 9, 250–254.
181. **González-Flecha B., Demple B., (1997).** Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179(2):382-8. doi: 10.1128/jb.179.2.382-388.1997. PMID: 8990289.
182. **Goosen N., Moolenaar GF., (2008).** Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst).* 7(3):353-79. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.09.002. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17951115.
183. **Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor MT., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H., Schuller C., (1998).** Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 1998;12:586–597.
184. **Granot D., Snyder M., (1993).** Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. *Yeast*: 465 – 479.
185. **Grant CM., MacIver FH., Dawes IW., (1996).** Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29:511 – 515.

186. **Gray JV., Petsko GA., Johnston GC., Ringe D., Singer RA., Werner-Washburne M., (2004).** “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 187–206.
187. **Grune T., Reinheckel T., Davies KJ., (1996).** Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* 1996;271(26):15504–15509.
188. **Grune T., Reinheckel T., Joshi M., Davies KJ., (1995).** Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 270(5):2344–2351.
189. **Guénolé F., Louis J., Creveuil C., Baleyte JM., Montlahuc C., Fourneret P., Revol O., (2013).** Behavioral profiles of clinically referred children with intellectual giftedness. *Biomed Res Int.* 2013:540153. doi: 10.1155/2013/540153. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23956988.
190. **Guerreiro N., Staedtler F., Grenet O., Kehren J., Chibout SD., (2003).** Toxicogenomics in drug development. *Toxicol. pathol.* 31, 471–479.
191. **Gunstone FD., (1996).** *atty Acid and Lipid Chemistry.* Springer New York, NY. 978-0-8342-1342-5.
192. **Hagen PO., Rose AH., (1961).** *Canadian Journal of Microbiology,* 7,287.
193. **Halford GM., Lordkipanidzé M., Watson SP., (2012).** 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: an interview with Dr Stewart Adams. *Platelets.* 23(6):415-22. doi: 10.3109/09537104.2011.632032. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22098129.
194. **Halliwell B., (1999).** Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr Rev* 57: 104–113.
195. **Halliwell B., Gutteridge JMC., (1999).** *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1-25.
196. **Hamadeh HK., Amin RP., Paules RS., Afshari CA., (2002).** An over view of toxicogenomics. *Curr. issues mol. biol.* 4, 45 - 56.
197. **Hamagishi Y., Yoshimoto Y., Oki T., (1981).** Determination of guanosine tetraphosphate (ppGpp) and adenosine pentaphosphate (pppGpp) in various microorganisms by radioimmunoassay. *Arch microbiol.;* 130: 134–137. doi: 10.1007/BF00411065.

198. **Hamilton AC., Taylor JG., Good GA., (2002).** Vacuolar H⁺-ATPase but not mitochondrial F1F0-ATPase is required for NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiol. Let. 208, 227—232.
199. **Hampton MB., Orrenius S., (1997).** Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett. ;414(3):552-6. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01068-5. PMID: 9323034.
200. **Hannan M., Young TA., Nielsen F., (1976).** "Specification bias analysis of the effects of grouping of observations in multiple regression models." Paper presented at the annual meetings of American Educational Research Association.
201. **Harbison ST., Yamamoto AH., Fanara JJ., Norga KK., Mackay TF., (2004).** Quantitative trait loci affecting starvation resistance in *Drosophila melanogaster*. Genetics 166(4): 1807-1823.
202. **Hardie DG., (1999).** Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. Biochem Soc Symp 64:13–27.
203. **Hardie DG., Carling D., Carlson M., (1998).** The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell Annu. Rev. Biochem. 67:821–855.
204. **Harmes DC., Di Renzo J., (2009).** Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses? J Mammary gland biol neoplasia, 2009, 14:19 - 27.
205. **Harper CE., Hernandez CJ., (2020).** Cell biomechanics and mechanobiology in bacteria: Challenges and opportunities. APL Bioeng. 4(2):021501. doi: 10.1063/1.5135585. PMID: 32266323.
206. **Harsch MJ., Lee SA., Goddard MR., Gardner RC., (2010).** Optimized fermentation of grape juice by laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 10(1):72-82. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00580.x. PMID: 19840118.
207. **Hartwell LH., (2002).** Nobel Lecture. Yeast and cancer. Biosci Rep. 22(3-4):373-94. doi: 10.1023/a:1020918107706. PMID: 12516780.
208. **Hayashi M., Ohkuni K., Yamashita I. (1998).** Control of division arrest and entry into meiosis by extracellular alkalisation in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14, 905–913.

209. **Hayes JD., Pulford DJ., (1995).** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 30(6):445-600. doi: 10.3109/10409239509083491. PMID: 8770536.
210. **He C., Tsuchiyama SK., Nguyen QT., Plyusnina EN., Terrill SR., Sahibzada S., Patel B., Faulkner AR., Shaposhnikov MV., Tian R., Tsuchiya M., Kaeberlein M., Moskalev AA., Kennedy BK., Polymenis M., (2014).** Enhanced longevity by ibuprofen, conserved in multiple species, occurs in yeast through inhibition of tryptophan import. *PLoS Genet.* 10(12):e1004860. doi: 10.1371/journal.pgen.1004860. PMID: 25521617.
211. **Hedbacker K., Carlson M., (2008).** SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front biosci.*13: 2408–2420.
212. **Heidelberger C., (1975).** Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 44:79-121.
213. **Heinicke S., Livstone MS., Lu C., Oughtred R., Kang F., Angiuoli SV., White O., Botstein D., Dolinski K., (2007).** The Princeton protein orthology database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *Plos one* 2, e766.doi:10.1371/journal.
214. **Helen E., Adrian L., (2001).** Measurement of microvessel density in primary tumors. *Methods Mol Med.* 57:115-21. doi: 10.1385/1-59259-136-1:115. PMID: 21340894.
215. **Helena Pálková., Viktor Hronský., L’uboš Jankovič., Jana Madejová., (2013).** The effect of acid treatment on the structure and surface acidity of tetraalkyl ammonium-montmorillonites. *Journal of Colloid and Interface Science* Volume 395, Pages 166-175.
216. **Herdeiro MT., Figueiras A., Polónia J., Gestal-Otero JJ., (2005).** Physicians' attitudes and adverse drug reaction reporting: a case-control study in Portugal. *Drug Saf.* 28(9):825-33. doi: 10.2165/00002018-200528090-00007. PMID: 16119975.
217. **Herman PK., (2002).** Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:602–607.

218. **Hicks GR., Raikhel NV., (1995).** Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:155-88. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.001103. PMID: 8689555.
219. **Hirshfield IN., Terzulli S., O'Byrne C., (2003).** Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Sci Prog.* 86(Pt 4):245-69. doi: 10.3184/003685003783238626. PMID: 15508892.
220. **Hockberger PE., (2002).** A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochem Photobiol.* 76(6):561-79. doi: 10.1562/0031-8655(2002)0760561AHOU2.0.CO2. PMID: 12511035.
221. **Hodges PE., McKee AH., Davis BP., Payne WE., Garrels JI., (1999).** The Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic acids res* 27(1):69-73. PMID: 9847145.
222. **Höglund A., Dönnies P., Blum T., Adolph HW., Kohlbacher O., (2006).** MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics.* 2006 May 15;22(10):1158-65. doi: 10.1093/bioinformatics/btl002. PMID: 16428265.
223. **Hohmann S., (2002a).** Osmotic adaptation in yeast--control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol* 215:149-187.
224. **Hohmann S., (2002b).** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-372.
225. **Hohmann S., Krantz M., Nordlander B., (2007).** Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* 428:29-45.
226. **Hohmann S., Mager WH., (1997).** Stress response mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Yeast stress responses*, eds S. TX: Molecular biology intelligence unit, R. G. Landes Company), 1-5.
227. **HOLTTA E., (1977).** Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase. *Biochemistry* 16, 91-100.
228. **Hoon S., Stonge RP., Giaever G., Nislow C., (2008b).** Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. *Trends Pharmacol.Sci.* 29, 499-504.
229. **Hosaka K., Yamashita S., (1984).** Regulatory role of phosphatidate phosphatase in triacylglycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 796, 110-117.

230. **Hou J., Tyo KE., Liu Z., Petranovic D., Nielsen J., (2012).** Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS yeast Res 12 (5): 491-510.
231. **Huang G., Chen S., (2017).** Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. Ultrason. Sonochem. 2017;37:144–149.
232. **Hughes DE., Nyborg WL., (1962).** Cell disruption by ultrasound. Science, 138, 108–114.
233. **Hunter K., Rose AH., (1972).** Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. Biochimica et Biophysica Acta 260:639–653
234. **Imlay JA., Linn S., (1987).** Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. J Bacteriol. 169(7):2967-76. doi: 10.1128/jb.169.7.2967-2976.1987. PMID: 3298208.
235. **Ishida T., Ando H., Fukuhara M., (1991).** Estimation of complex refractive index of soft particles and its dependence on soil chemical properties, Remote Sens. Environ. 38:173-182.
236. **Ishihama A., (1999).** Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. Genes Cells. 1999 Mar;4(3):135-43. doi: 10.1046/j.1365-2443.1999.00247.x. PMID: 10320479.
237. **Ishikawa T., (1992).** The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends Biochem. Sci., 17, pp. 463-468.
238. **Ishmayana S., Learmonth RP., Kennedy UJ., (2011).** Fermentation performance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in media with high sugar concentration. Proceedings of the 2nd International Seminar on Chemistry 2011 (pp. 379-385) Jatinangor, 24-25, ISBN 978-602-19413-1-7.
239. **Izawa S., Inoue Y., Kimura A., (1996).** Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae* . Biochem. J., 320 (1996), pp. 61-67.
240. **Jamieson DJ., (1992).** *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. J. Bacteriol., 174, pp. 6678-6681.
241. **Jamieson DJ., (1998).** Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 14. pp. 1511-1527.

242. **Janssens GE., Veenhoff LM., (2016).** Evidence for the hallmarks of human aging in replicatively aging yeast. *Microb Cell.* 3(7):263-274. doi: 10.15698/mic2016.07.510. PMID: 28357364.
243. **Jelinsky SA., Estep P., Church GM., Samson D., (2000).** Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol* 20, 8157–8167.
244. **Jeong S., Rebeiz M., Andolfatto P., Werner T., True J., Carroll SB., (2008).** The evolution of gene regulation underlies a morphological difference between two *Drosophila* sister species. *Cell.* 132(5):783-93. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.014. PMID: 18329365.
245. **Jin T., Xu X., Fang J., Isik N., Yan J., (2009).** How human leukocytes track down and destroy pathogens: lessons learned from the model organism *Dictyostelium discoideum*. *Immunol Res.*, 43:118 - 127.
246. **Johanson K., Allen PL., Lewis F., Cubano LA., Hyman LE., Hammond TG., (2002).** *Saccharomyces cerevisiae* gene expression changes during rotating wall vessel suspension culture. *J Appl Physiol* (1985). 93(6):2171-80. doi: 10.1152/jappphysiol.01087.2001. PMID: 12391061.
247. **Johansson MT., Ellegaard HR., Tankisi H., Fuglsang-Frederiksen A., Qerama E., (2017).** Fasciculations in nerve and muscle disorders - A prospective study of muscle ultrasound compared to electromyography. *Clin Neurophysiol.* 2017 Nov;128(11):2250-2257. doi: 10.1016/j.clinph.2017.08.031. PMID: 29028499.
248. **Johnston GC., Singer RA., (1980).** Ribosomal precursor RNA metabolism and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol gen et* 178(2):357–360.
249. **Jona G., Choder M., Gileadi O., (2000).** Glucose starvation induces a drastic reduction in the rates of both transcription and degradation of mRNA in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1491, 37–48.
250. **Jonsson KI., (2007).** Tardigrades as a potential model organism in space research. *Astrobiology.*, 7:757–766.
251. **Kacena MA., Merrell GA., Manfredi B., Smith EE., Klaus DM., Todd P., (1999).** Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51(2):229-34. doi: 10.1007/s002530051386. PMID: 10091330.

252. **Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg AL., (2004).** Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*. 13(6):771-81. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00148-0. PMID: 15053871.
253. **Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R., (2011).** *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* 6(2): e16015.
254. **Kayingo G., Kilian SG., Prior BA., (2001).** Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypo-osmotic stress. *Arch Microbiol*. 177(1):29-35. doi: 10.1007/s00203-001-0358-2. Epub 2001 Oct 12. PMID: 11797041.
255. **Kellstein DE., Waksman JA., Furey SA., Binstok G., Cooper SA., (1999).** The safety profile of nonprescription ibuprofen in multiple-dose use: a meta-analysis. *J Clin Pharmacol* 39: 520–532.
256. **Kemmitt SJ., Wright D., Goulding KWT., Jones DL., (2006).** pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*. Volume 38, Issue 5, May 2006, Pages 898-911.
257. **Kim K., Ryu E., Chon MY., Yeun EJ., Choi SY., Seo JS., Nam BW., (2006).** Internet addiction in Korean adolescents and its relation to depression and suicidal ideation: a questionnaire survey. *Int J Nurs Stud*. 43(2):185-92. PMID: 16427966.
258. **Kiyosawa K., (1991).** Volumetric properties of polyols (ethylene glycol, glycerol, meso-erythritol, xylitol and mannitol) in relation to their membrane permeability: Group additivity and estimation of the maximum radius of their molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* Volume 1064, Issue 2, Pages 251-255.
259. **Klaunig JE., Kamendulis LM., (2004).** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 44:239-67. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851. PMID: 14744246.
260. **Klaus D., Simske S., Todd P., Stodieck L., (1997).** Investigation of space flight effects on *Escherichia coli* and a proposed model of underlying physical mechanisms. *Microbiology (Reading)*. 143 (Pt 2):449-455. doi: 10.1099/00221287-143-2-449. PMID: 9043122.
261. **Kleinig A R., (1997).** Cell disruption mechanics. Thesis (Ph.D.) University of Adelaide, Dept. of Chemical Engineering.

262. **Knijnenburg TA., Wessels LF., Reinders MJ., Shmulevich I., (2009).** Fewer permutations, more accurate P-values. *Bioinformatics*. 25(12):i161-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btp211. PMID: 19477983.
263. **Knorre D., Zyrina A., Severin F., (2016).** The double face of mitochondrial dysfunction. *Aging (Albany NY)* 8(3):420.
264. **Kohl T., Tchatcheva K., Weinbach J., Hering R., Kozlowski P., Stressig R., Gembruch U., (2010).** Partial amniotic carbon dioxide insufflation (PACI) during minimally invasive fetoscopic surgery: early clinical experience in humans. *Surg Endosc*. 24(2):432-44. doi: 10.1007/s00464-009-0579-z. Epub 2009 Jun 30. PMID: 19565298.
265. **Kopaskova M., Hadjo L., Yankulova B., Jovtchev G., Galova E., Sevcovicova A., Mucaji P., Miadokova E., Bryant P., Chankova S., (2011).** Extract of *Lillium candidum* L. can modulate the genotoxicity of the antibiotic zeocin. *Molecules*. 17(1):80-97. doi: 10.3390/molecules17010080. PMID: 22269865.
266. **Korovila I., Hugo M., Castro JP., Weber D., Höhn A., Grune T., Jung T., (2017).** Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol*. 2017 Oct;13:550-567. doi: 10.1016/j.redox. PMID: 28763764; PMCID: PMC5536880.
267. **Krause SA., Gray JV., (2002).** The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current biology*, Vol.12, No.7, pp. 588-593, ISSN 0960-9822.
268. **Krol K., Brozda I., Skoneczny M., Bretner M., Bretne M., Skoneczna A., (2015).** A genomic screen revealing the importance of vesicular trafficking pathways in genome maintenance and protection against genotoxic stress in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Plos one* 10(3):e012070.
269. **Krulwich TA., Sachs G., Padan E., (2011).** Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 9(5):330-43. doi: 10.1038/nrmicro2549. Epub 2011 Apr 5. PMID: 21464825.
270. **Kuiper HA., Hagler AN., Lewis MJ., (1972).** *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*, 84.
271. **Kupiec M., Byers B., Esposito RE., Mitchell AP., (1997).** Meiosis and sporulation. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Volume III: Cell Cycle and Cell Biology. pp. 889 – 1036.

272. **Kusakabe M., Sun AC., Tyshchenko K., Wong R., Nanda A., Shanna C., Gusscott S., Chavez EA., Lorzadeh A., Zhu A., Hill A., Hung S., Brown S., Babaian A., Wang X., Holt RA., Steidl C., Karsan A., Humphries RK., Eaves CJ., Hirst M., Weng AP., (2019).** Synthetic modeling reveals HOXB genes are critical for the initiation and maintenance of human leukemia. *Nat Commun.* 10(1):2913. doi: 10.1038/s41467-019-10510-8. PMID: 31266935.
273. **Lans A., Hemming A., Adler L., (1991).** Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD), *FEBS* 286, 1,2 13 - 17.
274. **Laplane M1., Sabatini DM., (2012).** mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.*;149(2):274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
275. **Lasserre JP., Dautant A., Aiyar RS., Kucharczyk R., Glatigny A., Tribouillard-Tanvier D., Rytka J., Blondel M., Skoczen N., Reynier P., Pitayu L., Rötig A., Delahodde A., Steinmetz LM., Dujardin G., Procaccio V., di Rago JP., (2015).** Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech.* 8(6):509-26. doi: 10.1242/dmm.020438. PMID: 26035862.
276. **Lauren F., Stevenson., Brian K., Kennedy., Ed Harlow. (2001).** A large-scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98(7): 3946–3951. PMID: 11274415.
277. **Le Pecq LB., Le Bret M., Barbet J., Roques B., (1975).** DNA polyintercalating drugs: DNA binding of diacridine derivatives. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:2915-2919.
278. **Lee KS., Levin DE., (1992).** Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* 12:172–182.
279. **Lee KSK., Irie Y., Gotoh Y., Wantanabe H., Araki E., Nishida K., Matsumoto D., Levin E., (1993).** A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *mol. cell. biol.* 13:3067–3075.
280. **Lee MH., Cho Y., Kim DH., Woo HJ., Yang JY., Kwon HJ., Yeon MJ., Park M., Kim SH., Moon C., Tharmalingam N., Kim TU., Kim JB., (2016).** Menadione

- induces G2/M arrest in gastric cancer cells by down-regulation of CDC25C and proteasome mediated degradation of CDK1 and cyclin B1. *Am J Transl Res.* 8(12):5246-5255. PMID: 28077999.
281. **Leighton T., (2007).** What is ultrasound? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93, 3–83.
 282. **Lennon JT., Jones SE., (2011).** Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol.* 9(2):119-30. doi: 10.1038/nrmicro2504. PMID: 21233850.
 283. **Levin DE., (2005).** Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:262-291.
 284. **Levine RL., Moskovitz J., Stadtman ER., (2000).** Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 50, 301 – 307.
 285. **Levine TP., Munro S., (2002).** Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns-4-kinase-dependent and –independent components. *Current Biology* 12, 695-704.
 286. **Lew DJ., (2000).** Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. opin. genet. dev.* 10:47–53.
 287. **Lewis MJ., Kuiper HA., (1972).** *Journal of the Institute of Brewing*, 78,465.
 288. **Lewis MW., (2000).** Exploring paradox: Toward a more comprehensive guide. *The Academy of Management Review*, 25(4), 760–776. <https://doi.org/10.2307/259204>.
 289. **Li W., Mitchell AP., (1997).** Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* 145, 63–73.
 290. **Lillie SH., Pringle JR., (1980).** Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol* 143, 1384–1394
 291. **Lin LS., Blatchley ER., (2001).** UV dose distribution characterization using fractal concepts for system performance evaluation. *Water Sci Technol.* 43(11):181-8. PMID: 11443961.
 292. **Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo JL., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall MN., (2002).** Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell*, Vol.10, No.3, pp. 457-468, ISSN 1097-2765.

293. **Longo VD., Fabrizio P., (2002).** Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jun;59(6):903-8. doi: 10.1007/s00018-002-8477-8. PMID: 12169020.
294. **Longo VD., Fabrizio P., (2012).** Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Subcell Biochem.* 57:101-21. doi: 10.1007/978-94-007-2561-4_5. PMID: 22094419.
295. **Lopes M., Foiani M., Sogo JM., (2006).** Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* 21: 15 - 27
296. **Lopez-Mirabal HR., Winther JR., (2008).** Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochim Biophys Acta.* 1783:629–640.
297. **Lorberg A., Hall MN., (2004).** TOR: the first 10 years. *Curr top microbiol immunol* 279:1-18.
298. **Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., RANDALL RJ., (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J biol chem.* 265-75. PMID:14907713.
299. **Lu B., Malcuit C., Wang S., Girman S., Francis P., Lemieux L., Lanza R., Lund R., (2009).** Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells.* 27(9):2126-35. doi: 10.1002/stem.149. PMID: 19521979.
300. **Ludovico P., Burhans WC., (2014).** Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *FEMS Yeast Res.* 14(1):33–39.
301. **Lum PY., Armour CD., Stepaniants SB., Cavet G., Wolf MK., Butler JS., Hinshaw JC., Garnier P., Prestwich GD., Leonardson A., Garrett-Engle P., Rush CM., Bard M., Schimmack G., Phillips JW., Roberts CJ., Shoemaker DD., (2004).** Discovering modes of action for the rapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell,* 116, 121–137.
302. **Lund P., Tramonti A., De Biase D., (2014).** Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 38(6):1091-125. PMID: 24898062.
303. **Lunn JE., (2008).** Sucrose metabolism. In *Encyclopedia of Life Science (ELS)* (Smith, A.M., ed.). Chichester, UK: Wiley, doi: 10.1002/9780470015 902.a0021259.

304. **Luscombe NM., Greenbaum D., Gerstein M., (2001).** What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf Med.* 40(4):346-58. PMID: 11552348.
305. **Lushchak VI., (2001).** Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Mosc).* 66(5):476-89. doi: 10.1023/a:1010294415625. PMID: 11405881.
306. **Lushchak VI., (2014).** Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 224c:164–175.
307. **Lushchak VI., Bahniukova TV., (1999).** Vplyv hipoksii na obmin vuhlevodiv u tkanyakh skorpeny [Effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in scorpion tissues]. *Ukr Biokhim Zh.* 74(2):100-5. Ukrainian. PMID: 12152299.
308. **Luyten K., Albertyn J., Skibbe WF., Prior BA., Ramos J., Thevelein JM., Hohmann S., (1995).** Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* 14:1360– 1371.
309. **Lygre H., Moe G., Holmsen H., (2003).** Interaction of ibuprofen with eukaryotic membrane lipids. *Acta Odontol Scand.* 61(5):303-9. doi: 10.1080/00016350310006555. PMID: 14763783.
310. **Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist SJ., Wolf DH., Fröhlich KU., (1999).** Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J cell biol* 145(4):757– 767.
311. **Mager WH., Winderickx J., (2005).** Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol Sci.* (5):265-73. doi: 10.1016/j.tips.2005.03.004. PMID: 15860374.
312. **Maguffin SC., Kirk MF., Daigle AR., Hinkle SR., Jin Q., (2015).** Substantial contribution of biomethylation to aquifer arsenic cycling. *Nat. Geosci.* 8 290–293. 10.1038/NGEO2383.
313. **Mai B., Breeden L., (1997).** Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family. *Mol. Cell. Biol*;17:6491–6501.
314. **Maisonhaute E., Prado C., White PC., Compton RG., (2002).** Surface acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry. Part III: Shear stress

- in ultrasonic cleaning. *Ultrason Sonochem.* 9(6):297-303. doi: 10.1016/s1350-4177(02)00089-5. PMID: 12404794.
315. **Marcus G., Zoe Hilioti W., Sabbagh S., Paliwal A., Bergmann L., Bardwell A., Levchenko., (2008).** Oscillatory phosphorylation of yeast Fus3 MAP kinase controls periodic gene expression and morphogenesis. *Curr Biol.* 11; 18 (21): 1700–1706. doi:10.1016/j.cub.2008.09.027.
 316. **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.
 317. **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>.
 318. **Marjanovic J., Chalupska D., Paten-ode C., Coster A., Arnold E., Ye A., Anesi G., Lu Y., Okun I., Tkachenko S., Haselkorn R., Gornicki P., (2010).** Recombinant yeast screen for new inhibitors of human acetyl-CoA carboxylase 2 identifies potential drugs to treat obesity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107, 9093–9098.
 319. **Marot G., Foulley JL., Mayer CD., Jaffrézic F., (2009).** Moderated effect size and P-value combinations for microarray meta-analyses. *Bioinformatics.* 2009 Oct 15;25(20):2692-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp444. PMID: 19628502.
 320. **Marques WL., Mans R., Marella ER., Cordeiro RL., van den Broek M., Daran JG., Pronk JT., Gombert AK., van Maris AJ., (2017).** Elimination of sucrose transport and hydrolysis in *Saccharomyces cerevisiae*: a platform strain for engineering sucrose metabolism. *FEMS Yeast Res.* 17(1):fox006. doi: 10.1093/femsyr/fox006. PMID: 28087672.
 321. **Marszalek JR., Weiner JA., Farlow SJ., Chun J., Goldstein LS., (1999).** Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J Cell Biol.* 145(3):469-79. doi: 10.1083/jcb.145.3.469. PMID: 10225949.

322. **Martin B., (1982).** Critique of Nuclear Extinction. Journal of Peace Research Volume 19, Issue 4.
323. **Martinez MJ., Roy S., Archuletta AB., Wentzell PD., Anna-Arriola SS., Rodriguez AL., Aragon AD., Quiñones GA., Allen C., Werner-Washburne M., (2004).** Genomic analysis of stationary-phase and exit in *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression and identification of novel essential genes. *Mol Biol Cell* 15(12):5295-305. PMID: 15456898.
324. **Martínez-Muñoz GA., Kane P., (2017).** Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem.* 283(29):20309-19. doi: 10.1074/jbc.M710470200. Erratum in: *J Biol Chem.* 292(19):7743. PMID: 18502746.
325. **Martinez-Pastor MT., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F., (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE) *EMBO J.* 1996;15:2227–2235.
326. **Martins I., Galluzzi L., Kroemer G., (2011).** Hormesis, cell death and aging. *Aging (Albany NY).* 3(9):821–828.
327. **Mathiesen JM., Vedel L., Bräuner-Osborne H., (2013).** Chapter Eleven - cAMP Biosensors Applied in Molecular Pharmacological Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Methods in Enzymology.* Volume 522, 2013, Pages 191-207.
328. **Maynert EW., Hammond BG., (1976).** Modes of action of toxic agents. *Ann Clin Lab Sci.* 6(4):322-31. PMID: 962296.
329. **Mayr JA., Kohlwein SD., Paltauf F., (1996).** Identification of a novel, Ca(2+)-dependent phospholipase D with preference for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 393(2-3):236-40. doi: 10.1016/0014-5793(96)00893-9. PMID: 8814297.
330. **McNew JA., Goodman JM., (1996).** The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends Biochem Sci.* 21(2):54-8. PMID: 8851661.
331. **McSharry C., (2011).** Parkinson disease: Could over-the-counter treatment protect against Parkinson disease? *Nat Rev Neurol* 7: 244.
332. **Meikle AJ., Reed RH., Chudek JA., Gadd GM., (1988).** Natural abundance ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of acrylic polyol and trehalose

- accumulation by several yeast species in response to salt stress, *FEMS Microbiol. Let.* 82, 163 - 168.
333. **Menacho-Marquez M., Murguia JR., (2007).** Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anti-cancer drug research. *Clin. transl. oncol.* 9, 221–228.
 334. **Mennigmann HD., Lange M., (1986).** Growth and differentiation of *Bacillus subtilis* under microgravity. *Naturwissenschaften.* 73(7):415-7. doi: 10.1007/BF00367283. PMID: 3093896.
 335. **Merritt NR., (1966).** *Journal of the Institute of Brewing*, 72, 374.
 336. **Mesquita CS., Oliveira R., Bento F., Geraldo D., Rodrigues JV., Marcos JC., (2014).** Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal biochem*, 485, pp. 69-71.
 337. **Meyer M., Vilardell J., (2009).** The quest for a message: budding yeast, a model organism to study the control of pre-mRNA splicing. *Brief Funct Genomic Proteomic.*, 8:60 - 67.
 338. **Mfma B., Bx A., Sk C., Rs D., Na E., Mi F., Ar G., Ek G., Rma D., Sak H., (2021).** Impact of high-intensity thermosonication treatment on spinach juice: bioactive compounds, rheological, microbial, and enzymatic activities. *Ultrason. Sonochem.*
 339. **Middelberg APJ., (1992).** A model for the disruption of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization, Ph.D. thesis, University of Adrlade, Australia.
 340. **Miermont A., Uhlendorf J., McClean M., Hersen P., (2011).** The dynamical systems properties of the HOG signaling cascade. *J. Signal Transduct.* 2011:930940. doi: 10.1155/2011/930940.
 341. **Miller JA., (1970).** C arcinogenesis b y ch em icals: An overview — G. H . A. C low es M em orial L ecture. *Cancer Res.* 30:559-576.
 342. **Miller GL., (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Annual Chem.* 31:426 - 428.
 343. **Miller-Fleming L., Giorgini F., Outeiro TF., (2008).** Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J.* 3:325 - 338.
 344. **Miné-Hattab J., Rothstein R., (2013).** DNA in motion during double-strand break repair. *Trends Cell Biol.* 23(11):529-36. doi: 10.1016/j.tcb.2013.05.006. PMID: 23867212.

345. **Mira H., Andreu Z., Suh H., Lie DC., Jessberger S., Consiglio A., San Emeterio J., Hortigüela R., Marqués-Torrejón MA., Nakashima K., Colak D., Götz M., Fariñas I., Gage FH., (2010).** Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 7(1):78-89. doi: 10.1016/j.stem.2010.04.016. PMID: 20621052.
346. **Mira NP., Teixeira MC., (2013).** Microbial mechanisms of tolerance to weak acid stress. *Front Microbiol*. 4:416. doi: 10.3389/fmicb.2013.00416. PMID: 24416030.
347. **Mirzaei H., Regnier F., (2006).** Creation of allotypic active sites during oxidative stress. *J. Proteome Res.* 5, 2159 – 2168.
348. **Missiakas D., Mayer MP., Lemaire M., Georgopoulos C., Raina S., (1977).** Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol*. 24(2):355-71. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.3601713.x. PMID: 9159522.
349. **Mitchell P., (1961).** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191:144-8. doi: 10.1038/191144a0. PMID: 13771349.
350. **Miyazaki K., (2005).** A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9(6):415-25. doi: 10.1007/s00792-005-0458-z. PMID: 15999224.
351. **Mizuno T., Yuto M., Kenji I., (2015).** The *Saccharomyces cerevisiae* AMPK, Snf1, Negatively Regulates the Hog1 MAPK Pathway in ER Stress Response. *PloS genet.* 11(9): e1005491. doi: 10.1371/journal.pgen.1005491.
352. **Monks TJ., Jones DC., (2002).** The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinine methides, and quinone-thioethers. *Curr Drug Metabol.* 3:425 - 438.
353. **Monks TJ., Lau SS., (1998).** The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 38:229 - 255.
354. **Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W., (1996).** The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* 19(4):651-8.
355. **Morin B., Bubb W.A., Davies MJ., Dean RT., Fu S., (1998).** 3-Hydroxylysine, a potential marker for studying radical-induced protein oxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11(11):1265–1273.

356. **Moskvina E., Schuller C., Maurer CT., Mager WH., Ruis H., (1998).** A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast*. 1998;14:1041–1050.
357. **Mott R., Harrison A., Pearal F., (2002).** Quantifying the similarities within fold space. *J Mol biol.* doi: 10.1016/S0022-2836(02)00992-0.
358. **Mott IEC., Stickler DJ., Coakley WT., Bott TR., (1998).** The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 84, Issue 4, Pages 509–514.
359. **Moye-Rowley WS., (2003).** Transcriptional control of multidrug resistance in the yeast *Saccharomyces*. *Prog. nucleic acid res. mol. biol.* 73:251–279.
360. **Mullan A., Marsh A., (2019).** Advantages of using *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism. Oxford instruments.
361. **Muller LA., Lucas JE., Georgianna DR., McCusker JH., (2011).** Genome-wide association analysis of clinical vs. nonclinical origin provides insights into *Saccharomyces cerevisiae* pathogenesis. *Mol Ecol* 20(19):4085-97.
362. **Müllner H., Daum G., (2004).** Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol.* 2004;51(2):323-47. PMID: 15218532.
363. **Munoz AJ., Wanichthanarak K., Meza E., Petranovic D., (2012).** Systems biology of yeast cell death. *FEMS yeast res* 12 (2):249-65.
364. **Muñoz J., Stange DE., Schepers AG., van de Wetering M., Koo BK., Itzkovitz S., Volckmann R., Kung KS., Koster J., Radulescu S., Myant K., Versteeg R., Sansom OJ., van Es JH., Barker N., van Oudenaarden A., Mohammed S., Heck AJ., Clevers H., (2012).** The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J.* 2012 Jun 12;31(14):3079-91. doi: 10.1038/emboj. 166. PMID: 22692129.
365. **Muzzey D., Gomez-Urbe CA., Mettetal JT., van Oudenaarden A., (2009).** A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell*.138:160–171. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.047.
366. **Nair R., Shaffique T., (2002).** Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. *Appl biochem biotechnol* 102-103: 315-326.

367. **Nasheuer HP., Smith R., Bauerschmidt C., Grosse F., Weisshart K., (2002).** Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 72:41 - 94.
368. **Natarajan K., Dave S., Bajaj HC., Tayade RJ., (2020).** Enhanced photocatalytic degradation of nitrobenzene using MWCNT/ β -ZnMoO₄ composites under UV light emitting diodes (LEDs). *Materialstoday Chemistry.* Volume 17, 100331.
369. **Ni L., Snyder M., (2001).** A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.*12(7):2147-70. PMID:11452010.
370. **Nielsen J., (2009).** Systems biology of lipid metabolism: from yeast to human. *FEBS Lett.* 583(24):3905-13. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.054. PMID: 19854183.
371. **Nikolova M., Savova I., Marinov M., (2000-2002).** AN OPTIMISED METHOD FOR INVESTIGATION OF THE YEAST VIABILITY BY MEANS OF FLUORESCENT MICROSCOPY. *JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS* Volume 3, 2000-2002, pp. 66-71.
372. **Niu L., Wu Z., Yang L., Wang Y., Xiang Q., Bai Y., (2021).** Antimicrobial Effect of UVC Light-Emitting Diodes against *Saccharomyces cerevisiae* and Their Application in Orange Juice Decontamination. *J Food Prot.* 84(1):139-146. doi: 10.4315/JFP-20-200. PMID: 32916700.
373. **Noda T., Ohsumi Y., (1998).** Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273, 3963–3966.
374. **Norkrans B., (1966).** Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature *Arch Microbiol*, 54 374 92.
375. **North M., Vulpe CD., (2010).** Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology. *Int.J.mol.sci.* 11, 4796–4813.
376. **Nutter LM., et al. (1991).** Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines. *Biochem Pharmacol.* PMID: 2018560.
377. **Nutter LM., Ngo EO., Fisher GR., Gutierrez PL., (1992).** DNA strand scission and free radical production in menadione-treated cells. Correlation with cytotoxicity and role of NADPH quinone acceptor oxidoreductase. *J Biol Chem.* 267(4):2474-9. PMID: 1370822.

378. **Nyborg WL., (1982).** Ultrasonic microstreaming and related phenomena. Br J Cancer Suppl. 5:156-60. PMID: 6950752.
379. **O'Brien RJ., Kamboj S., Ehlers MD., Rosen KR., Fischbach GD., Huganir RL., (1998).** Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. Neuron. 21(5):1067-78. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80624-8. PMID: 9856462.
380. **Ochi N., Katsuyuki H., Nagio T., Isao O., Yoshiro F., Eik I., Akiko H., Masahiro T., Mitsune T., Katsuyuki K., (2012).** Treatment-related death in patients with small cell lung cancer in phase III trials over the last two decades. Journal list. Plos one, PMC3412813.
381. **OIV., (2015).** RESOLUTION OIV-OENO 445-2015. Available from: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/resolutions-oiv/oenology-resolutions>.
382. **Oku K., Watanabe H., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y., Komori M., Inoue Y., Sakurai M., (2003).** NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 12739–12748.
383. **Oliver SG., (2002).** Functional genomics: lessons from yeast. Phil trans R soc lond B 357:17-23.
384. **Owsianowski E., Walter D., Fahrenkrog B., (2008).** Negative regulation of apoptosis in yeast. Biochim Biophys Acta. 1783:1303 - 1310.
385. **Özçelik B., (2007).** Fungi/ bactericidal and static effects of ultraviolet light in 254 and 354 nm wavelength. Res. J. Microbiol., 2, 42-49.
386. **Pahlman AK., Granath K., Ansell R., Hohmann S., Adler L., (2001).** The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. J Biol Chem 276(5):3555-63.
387. **Palsson OS., (2006).** Standardized hypnosis treatment for irritable bowel syndrome: the North Carolina protocol. Int J Clin Exp Hypn. 54(1):51-64. doi: 10.1080/00207140500322933. PMID: 16316883.
388. **Pao CC., Paiella J., Gallant JA., (1977).** Synthesis of guanosine tetraphosphate (magic spot I) in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. biophys. Res. commun. 74, 314.

389. **Park SK., Boulton R., Noble A., (2000).** Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. *Am J Enol Vitic.* 51:91–97.
390. **Parker N., Schneegurt M., Tu Anh-Hue T., Lister P., (2016).** The Effects of pH and Temperature on Microbial Growth. *Libre Texts Biology.*
391. **Parsons AB., Geyer R., Hughes TR., Boone C., (2003).** Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Prog. cellcycleres.* 5, 159–166.
392. **Patrick KM., John PB., (1994).** Transport of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* Volume 77, Issue 6, Pages 687-690.
393. **Peña A., Cinco G., García A., (1969).** Effect of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*,148, 673, 82.
394. **Peña A., Cinco G., Gómez-Puyou A., (1972).** Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, 153, 413, 25.
395. **Peña A., Ramírez J., Rosas G., (1995).** Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J Bacteriol*, 177, 1017, 22.
396. **Peñalva MA., Arst HN., (2002).** Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts *Microbiol Mol Biol R*, 66, 426, 46.
397. **Pennacchietti E., D'Alonzo C., Freddi L., Occhialini A., De Biase D., (2018).** The Glutaminase-Dependent Acid Resistance System: Qualitative and Quantitative Assays and Analysis of Its Distribution in Enteric Bacteria. *Front Microbiol.* 9:2869. PMID: 30498489.
398. **Perlstein EO., Ruderfer DM., Roberts DC., Schreiber SL., Kruglya L., (2007).** Genetic basis of individual difference sin the response to small molecule drugs in yeast. *Nat.genet.* 39, 496–502.
399. **Perrone GG., Tan SX., Dawes IW., (2008).** Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1783(7):1354-68. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.023. PMID: 18298957.
400. **Petelenz-Kurdziel E., Eriksson E., Smedh M., Beck C., Hohmann S., Goksor M., (2011).** Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Integr. Biol. (Camb.)* 3:1120–1126. doi: 10.1039/c1ib00027f.
401. **Petranovic D., Nielsen J., (2008).** Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease? *Trends biotechnol* 26 (11): 584 - 90.
 402. **Phillips DH., Arlt VM., (2009).** Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS.* 99:87-110. doi: 10.1007/978-3-7643-8336-7_4. PMID: 19157059.
 403. **Phipps CVG., Davies PJ., Hopley D., (1985).** The morphology of *Halimeda* banks behind the Great Barrier Reef east of Cooktown, Qld. *Proc 5th Int Coral Reef Symp* 5:27–30.
 404. **Pietzsch HJ., Gupta A., Reisgys M., Drews A., Seifert S., Syhre R., Spies H., Alberto R., Abram U., Schubiger PA., Johannsen B., (2000).** Chemical and biological characterization of technetium(I) and Rhenium(I) tricarbonyl complexes with dithioether ligands serving as linkers for coupling the Tc(CO)(3) and Re(CO)(3) moieties to biologically active molecules. *Bioconjug Chem.* 11(3):414-24. doi: 10.1021/bc990162o. PMID: 10821659.
 405. **Pinon R., (1978).** Folded chromosomes in non-cycling yeast cells: evidence for a characteristic G0 form. *Chromosoma* 67:263-274.
 406. **Pitsillides AA., Blake SM., Glynn LE., Frost GT., Bitensky L., Chayen J., (1991).** The effect of menadione epoxide on the experimental immune arthritis in the rabbit. *Int J Exp Pathol.* 72(3):301-9. PMID: 1843258.
 407. **Piyasena P., Mohareb E., McKellar RC., (2003).** Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int J Food Microbiol.* 87(3):207-16. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00075-8. PMID: 14527793.
 408. **Platara M., Ruiz A., Serrano R., (2006).** The transcriptional response of the yeast Na⁺-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways *J Biol Chem*, 281, 36632, 42.
 409. **Plesset J., Ludwig JR., Cox BS., McLaughlin CS., (1987).** Effect of cell cycle position on thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 169, 779 - 784.
 410. **Poljak A., Dawes IW., Ingelse BA., Duncan MW., Smythe GA., Grant CM., (2003).** Oxidative damage to proteins in yeast cells exposed to adaptive levels of H₂O₂. *Redox Rep.* 2003;8(6):371-7. doi: 10.1179/135100003225003401. PMID: 14980070.

411. **Posas F., Saito H., (1997).** Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*. 276:1702–1705. doi: 10.1126/science.276.5319.1702.
412. **Postnikoff SDL., Johnson JE., Tyler JK., (2017).** The integrated stress response in budding yeast lifespan extension. *Microb Cell*. 4(11):368-375. doi: 10.15698/mic2017.11.597. PMID: 29167799.
413. **Povey MJW., Mason TJ., (1998).** Eds., *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic and Professional, London, 105-126.
414. **Pramila TS., Miles D., GuhaThakurta D., Jemiolo LL, Breeden., (2002).** Conserved homeodomain proteins interact with MADS box protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle. *Genes Dev*. 16:3034–3045.
415. **Pryor WA., Bermúdez E., Cueto R., Squadrito GL., (1996).** Detection of aldehydes in bronchoalveolar lavage of rats exposed to ozone. *Fundam Appl Toxicol*. 34(1):148-56. doi: 10.1006/faat.1996.0185. PMID: 8937902.
416. **Purevdorj-Gage B., Sheehan KB., Hyman LE., (2006).** Effects of low-shear modeled microgravity on cell function, gene expression, and phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 72(7):4569-75. doi: 10.1128/AEM.03050-05. PMID: 16820445.
417. **Qualls RG., Johnson JD., (1983).** Bioassay and dose measurement in UV disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 45(3):872-7. doi: 10.1128/aem.45.3.872-877.1983. PMID: 6405690.
418. **Raina S., Missiakas D., Georgopoulos C., (1995).** The rpoE gene encoding the E (24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J*. 14, 1043–1055.
419. **Rainsford KD., (2003).** Discovery, mechanisms of action and safety of ibuprofen. *Int J Clin Pract Suppl*. (135):3-8.
420. **Rainsford KD., Roberts SC., Brown S., (1997).** Ibuprofen and paracetamol: relative safety in non-prescription dosages. *J Pharm Pharmacol* 49: 345–376.
421. **Ramesh N., Antón IM., Hartwig JH., Geha RS., (1997).** WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(26):14671-6. doi: 10.1073/pnas.94.26.14671. PMID: 9405671.

422. **Rao P., Knaus EE., (2008).** Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 11(2):81s-110s. doi: 10.18433/j3t886. PMID: 19203472.
423. **Recknagel RO., Glende EA., (1973).** Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Tox.* 2:263-297.
424. **Reed G., Nagodawithana TW., (1991).** Yeast technology. Van Nostrand Reinhold, New York, N.Y.
425. **Reimers M., Carey VJ., (2006).** Bioconductor: an open source framework for bioinformatics and computational biology. *Methods Enzymol.* 411:119-34. doi: 10.1016/S0076-6879(06)11008-3. PMID: 16939789.
426. **Reinhardt A., Hubbard T., (1998).** Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res.* 26(9):2230-6. doi: 10.1093/nar/26.9.2230. PMID: 9547285.
427. **Ribeiro GF., Côrte-Real M., Johansson B., (2006).** Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell.* 17(10):4584-91. doi: 10.1091/mbc.e06-05-0475. Epub 2006 Aug 9. PMID: 16899507.
428. **Richards ABS., Krakowka LB., Dexter H., Schmid APM., Wolterbeek DH., Waalkens-Berendsen A., Shigoyukif M., Kurimoto., (2002).** Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies, *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 871–898.
429. **Rigas B., (2007).** Novel agents for cancer prevention based on nitric oxide. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 5):1364-8. doi: 10.1042/BST0351364. PMID: 17956352.
430. **Robbins J., Dilworth SM., Laskey RA., Dingwall C., (1991).** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell.* 64(3):615-23. doi: 10.1016/0092-8674(91)90245-t. PMID: 1991323.
431. **Rockenfeller P., Madeo F., (2008).** Apoptotic death of ageing yeast. *Exp Gerontol.* 43(10):876-81. doi: 10.1016/j.exger.2008.08.044. Epub 2008 Aug 26. PMID: 18782613.

432. **Rodrigues-Pousada CA., Nevitt T., Menezes R., Azevedo D., Pereira J., Amaral C., (2004).** Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett.* 567(1):80-5. doi: 10.1016/j.febslet.2004.03.119. PMID: 15165897.
433. **Rodriguez CE., Shinyashiki M., Froines J., Yu RC., Fukuto JM., (2004).** An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology.* 201:185–196.
434. **Roemer T., Madden K., Chang J., Snyder M., (1996).** Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev* 10(7):777-93. PMID: 8846915.
435. **Rolland F., Winderickx J., Thevelein JM., (2002).** Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2 pp. 183-201.
436. **Rome LH., Lands WE., (1975).** Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 4863–4865.
437. **Rooney JA., (1988).** Other Nonlinear Acoustic Phenomena. In *Ultrasound Its Chemical, Physical, and Biological Effects*; Suslick, K. S., Ed.; VCH: New York, pp 65–96.
438. **Rost FWD., (1995).** *Fluorescence Microscopy.* Cambridge University Press. Rost FWD. *Fluorescence Microscopy.* Cambridge University Press.
439. **ROTHSTEIN A., DEMIS C., (1953).** The relationship of the cell surface to metabolism; the stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch Biochem Biophys.* 44(1):18-29. doi: 10.1016/0003-9861(53)90005-8. PMID: 13058350.
440. **Ruderfer DM., Roberts DC., Schreiber SL., Perlstein EO., Kruglyak L., (2009).** Using expression and genotype to predict drug response in yeast. *Plos one* 4, e6907.doi:10.1371.
441. **Ruis H., (1997).** Yeast stress responses: Achievements, goals and a look beyond yeast. In: Hohmann S, Mager WH, editors. *Yeast stress responses.* Austin, TX: Landes; 1997. pp. 231–247.
442. **Ruiz-Herrera J., (1992).** *Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly.* CRC Press, Boca Rat6n.
443. **Rupp WD., Howard-Flanders P., (1968).** Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet

- irradiation. *J Mol Biol.* 31(2):291-304. doi: 10.1016/0022-2836(68)90445-2. PMID: 4865486.
444. **Rusconi R., Guasto JS., Stocker R., (2014).** Bacterial transport suppressed by fluid shear. *Springer Nature* 10:212-217. DOI: 10.1038/nphys2883.
 445. **Russell JB., (2007).** The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 13(1-3):1-11. doi: 10.1159/000103591. PMID: 17693707.
 446. **Rustici G., Kolesnikov N., Brandizi M., Burdett T., Dylag M., Emam I., Farne A., Hastings E., Ison J., Keays M., Kurbatova N., Malone J., Mani R., Mupo A., Pedro PR., Pilicheva E., Rung J., Sharma A., Tang YA., Ternent T., Tikhonov A., Welter D., Williams E., Brazma A., Parkinson H., Sarkans U., (2013).** ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D987-90. doi: 10.1093/nar/gks1174. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23193272.
 447. **Saadat RY., Saeidi N., Zununi VS., Barzegari A., Barar J., (2015).** An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *Bioimpacts.* 5(1):25-8. doi: 10.15171/bi.2015.01. Epub 2015 Feb 21. PMID: 25901294.
 448. **Sá-Correia I., dos Santos SC., Teixeira MC., Cabrito TR., Mira NP., (2009).** Drug : H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends microbiol.* 17, 22–31.
 449. **Sagot I., Laporte D., (2019).** The cell biology of quiescent yeast - a diversity of individual scenarios. *J Cell Sci.* 132(1):jcs213025. doi: 10.1242/jcs.213025. PMID: 30602574.
 450. **Salvadó Z., Arroyo-López FN., Guillamón JM., Salazar G., Querol A., Barrio E., (2011).** Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Appl Environ Microbiol.* 77(7):2292-302. doi: 10.1128/AEM.01861-10. PMID: 21317255.
 451. **Sanchez Y., Lindquist SL., (1990).** HSP104 required for induced thermotolerance. *Science.* 248(4959):1112-5. doi: 10.1126/science.2188365. PMID: 2188365.
 452. **Sapienza K., Bannister W., Balzan R., (2008).** Mitochondrial involvement in aspirin-induced apoptosis in yeast. *Microbiology (Reading)* 154(Pt 9):2740-2747.

453. **Scandalios JG., (2005).** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995–1014.
454. **Schellhorn HE., Stones VL., (1992).** Regulation of *katF* and *katE* in *Escherichia coli* K-12 by weak acids. *J Bacteriol.* 174(14):4769-76. doi: 10.1128/jb.174.14.4769-4776.1992. PMID: 1385595.
455. **Schenberg-Frascino A., (1972).** Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. II. Recovery from thermolesions. *Mol Gen Genet.* 117(3):239-53. doi: 10.1007/BF00271651. PMID: 4560517.
456. **Schieber M., Chandel NS., (2014).** ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24:R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
457. **Schmelzle T., Hall MN., (2000).** TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):253-62. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00117-3. PMID: 11057898.
458. **Schmitt AP., McEntee K., (1996).** Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:5777–5782.
459. **Schneiter R., (2004).** Genetics, molecular and cell biology of yeast. University of Fribourg, Switzerland.
460. **Schneiter R., Daum G., (2006).** Analysis of yeast lipids. *Methods Mol Biol.* 2006;313:75-84. doi: 10.1385/1-59259-958-3:075. PMID: 16118426.
461. **Semchyshyn H., (2014).** Hormetic concentrations of hydrogen peroxide but not ethanol induce cross-adaptation to different stresses in budding yeast. *Int J Microbiol.* 2014;2014:485792.
462. **Semchyshyn HM., Abrat OB., Miedzobrodzki J., Inoue Y., Lushchak VI., (2011).** Acetate but not propionate induces oxidative stress in bakers' yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Rep.* 16(1):15–23.
463. **Serrano R., Kielland-Brandt MC., Fink GR., (1986).** Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ p K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319, 689–693.
464. **Seung SA., Lee JY., Lee MY., Park JS., Chung JH., (1998).** The relative importance of oxidative stress versus arylation in the mechanism of quinone-induced cytotoxicity to platelets. *Chem Biol Interact.* 113(2):133-44. doi: 10.1016/s0009-2797(98)00024-6. PMID: 9717514.
465. **Shacter E., (2000).** *Methods Enzymol.* 319:428.

466. **Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga NS., Wang JT., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T., (2003).** Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13(11):2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303. PMID: 14597658.
467. **Sharma KG., Kaur R., Bachhawat AK., (2002).** Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryotic Cell*, pp. 391-400.
468. **Sharon I., Alperovitch A., Rohwer F., Haynes M., Glaser F., Atamna-Ismaeel N., Pinter RY., Partensky F., Koonin EV., Wolf YI., Nelson N., Béjà O., (2009).** Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes. *Nature.* 461(7261):258-262. doi: 10.1038/nature08284. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19710652.
469. **Sheehan KB., McInnerney K., Purevdorj-Gage B., Altenburg SD., Hyman LE., (2007).** Yeast genomic expression patterns in response to low-shear modeled microgravity. *BMC Genomics.* 8:3. doi: 10.1186/1471-2164-8-3. PMID: 17201921.
470. **Siderius M., Rots E., Mager WH., (1997).** High-osmolarity signalling in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated in a carbon-source-dependent fashion. *Microbiology* 143 (Pt 10):3241-3250.
471. **Sies H., Cadenas E., (1985).** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 311:617.
472. **Simchen G., Piñon R., Salts Y., (1972).** Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Premeiotic DNA synthesis, readiness and commitment. *Experimental Cell Research* Volume 75, Issue 1, Pages 207-218.
473. **Simmons DL., Botting RM., Hla T., (2004).** Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56: 387–437.
474. **Simon JA., Bedalov A., (2004).** Yeast as a model system for anti - cancer drug discovery. *Nat.rev. Cancer* 4, 481–492.
475. **Singer MA., Lindquist S., (1998).** Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell.* 1(5):639-48. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80064-7. PMID: 9660948.
476. **Singer MA., Lindquist S., (1998).** Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 1998 Nov;16(11):460-8. doi: 10.1016/s0167-7799(98)01251-7. PMID: 9830154.

477. **Smith A., Ward MP., Garrett S., (1998).** Yeast PKA represses Msn2p/Msn4pdependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 1998;17:3556–3564.
478. **Smith AM., Ammar R., Nislow C., Giaever G., (2010).** A survey of yeast genomic assays for drug and target discovery. *Pharmacol. ther.* 127, 156–164.
479. **Smith ED., Tsuchiya M., Fox LA., Dang N., Hu D., Kerr EO., (2008).** Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species. *Genome res* 18(4): 564-570.
480. **Smith JA., Jarman M., Osborn M., (1999).** Doing interpretative phenomenological analysis. In: Murray, M. and Chamberlain, K., Eds., *Qualitative Health Psychology: Theories and Methods*, Sage, London, 218-241.
481. **Solecki M., Agnieszka T., Kacprowicz A., (2021).** The effect of cell size on the kinetics of yeast disintegration in a bead mill. *Powder Technology* Volume 380, Pages 584-597.
482. **Sorolla MA., Reverter-Branchat G., Tamarit J., Ferrer I., Ros J., Cabiscol E., (2008).** *Free Radic Biol Med.* 45:667.
483. **Srivastava AK., Penna S., Nguyen DV., Tran LS., (2016).** Multifaceted roles of aquaporins as molecular conduits in plant responses to abiotic stresses. *Crit Rev Biotechnol.* 36(3):389-98. doi: 10.3109/07388551.2014.973367. PMID: 25430890.
484. **Stadtman ER., (2001).** *Ann N Y Acad Sci.* 928:22.
485. **Stadtman ER., (1992).** *Science.* 257:1220.
486. **Stark C., Breitkreutz BJ., Chatr-Aryamontri A., Boucher L., Oughtred R., Livstone MS., Nixon J., Van Auken K., Wang X., Shi X., Reguly T., Rust JM., Winter A., Dolinski K., Tyers M., (2011).** The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* 39(Database issue):D698-704. doi: 10.1093/nar/gkq1116. Epub 2010 Nov 11. PMID: 21071413.
487. **Starritt HC., Duck FA., Humphrey VF., (1989).** An experimental investigation of streaming in pulsed diagnostic ultrasound beams. *Ultrasound Med Biol.* 15(4):363-73. doi: 10.1016/0301-5629(89)90048-3. PMID: 2527429.
488. **Stefanini GG., Holmes DR., (2013).** Drug-eluting coronary-artery stents. *N Engl J Med.* 368(3):254-65. doi: 10.1056/NEJMr1210816. PMID: 23323902.

489. **Stephen D W., Rivers SL., Jamieson DJ., (1995).** The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol microbiol* 16(3): 415–423.
490. **Strathern J., Hicks J., Herskowitz I., (1981).** Control of cell type in yeast by the mating type locus. The alpha 1-alpha 2 hypothesis. *J Mol Biol.* 147(3):357-72. doi: 10.1016/0022-2836(81)90488-5. PMID: 7031257.
491. **Stubbe J., Kozarich JW., (1987).** Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. *Chem. Rev.* 87:1107–1136.
492. **Sultana R., Perluigi M., Newman SF., Pierce WM., Cini C., Coccia R., Butterfield DA., (2010).** *Antioxid Redox Signal.* 12:327.
493. **Sun S., Gresham D., (2021).** Cellular quiescence in budding yeast. *Yeast.* 8(1):12-29. doi: 10.1002/yea.3545. PMID: 33350503.
494. **Swen JJ., Huizinga TW., Gelderblom H., De Vries EGE., Assendelft WJJ., Kirchheiner J., Guchelaar HJ., (2007).** Translating pharmacogenomics: challenges on the road to the clinic. *Plosmed.* 4, e209. doi:10.1371/journal.
495. **Tai SL., Daran-Lapujade P., Luttik MA., Walsh MC., Diderich JA., Krijger GC., van Gulik WM., Pronk JT., Daran JM., (2007).** Control of the glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature: a multi-level analysis in anaerobic chemostat cultures. *J Biol Chem* 282(14):10243-51.
496. **Tamas MJ., Luyten K., Sutherland FC., Hernandez A., Albertyn J., Valadi H., Li H., Prior BA., Kilian SG., Ramos J., Gustafsson L., Thevelein JM., Hohmann S., (1999).** Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* 31:1087-1104.
497. **Tatchell K., (1986).** RAS genes and growth control in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. bacteriol.* 166, 364-367.
498. **Taylor FR., Parks LW., (1979).** Triacylglycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* in relation to phospholipids synthesis. *Biochim Biophys Acta* 575, 204–214.
499. **Taylor GR., (1974).** Space Microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 28, 121–137. 2946 10.1146/annurev.mi.28.100174.001005.
500. **Teixeira MC., Fernandes AR., Mira NP., Becker JD., Sa-Correia I., (2006a).** Early transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress imposed by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Yeast Res.* 6,230-248.

501. **Tenreiro S., Outeiro TF., (2010).** Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Res.* 10(8):970-9. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x. PMID: 20579105.
502. **Than K., (2011).** Bacteria Grow Under 400,000 Times Earth's Gravity. FOR NATIONAL GEOGRAPHIC NEWS.
503. **Thevelein JM., (1984).** Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev.* 48(1):42-59. doi: 10.1128/mr.48.1.42-59.1984. PMID: 6325857; PMCID: PMC373002.
504. **Thevelein JM., de Winde JH., (1999).** Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33(5):904-18.
505. **Thompson LR., Sanders JG., McDonald D., Amir A., Ladau J., Locey KJ., Prill RJ., Tripathi A., Gibbons SM., Ackermann G., Navas-Molina JA., Janssen S., Kopylova E., Vázquez-Baeza Y., González A., Morton JT., Mirarab S., Zech Xu Z., Jiang L., Haroon MF., Kanbar J., Zhu Q., Jin Song S., Kosciolk T., Bokulich NA., Lefler J., Brislawn CJ., Humphrey G., Owens SM., Hampton-Marcell J., Berg-Lyons D., McKenzie V., Fierer N., Fuhrman JA., Clauset A., Stevens RL., Shade A., Pollard KS., Goodwin KD., Jansson JK., Gilbert JA., Knight R., (2017).** Earth Microbiome Project Consortium. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature.* 551(7681):457-463. doi: 10.1038/nature24621. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29088705.
506. **Tietze F., (1969).** Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal biochem.* 27(3):502-22.
507. **Toda TS., Cameron P., Sass M., Zoller M., Wigler., (1987b).** Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMPdependent protein kinase. *Cell* 50:277–287.
508. **Todorova T., Miteva D., Chankova S., (2015).** DNA DAMAGING EFFECT OF ZEOCIN AND METHYLMETHANESULFONATE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MEASURED BY CFGE. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences: sciences mathématiques et naturelles* 68(1):71-78.

509. **Todorova T., Miteva D., Chankova S., (2015b).** DNA damaging effect of zeocin and methyl methansulfonate in *Saccharomyces cerevisiae* measured by CFGE. Comptes Rendus de l'Acad'Emie Bulgare des Sciences 68(1): 71–78.
510. **Todorova T., Miteva D., Chankova S., (2019).** DNA susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* to Zeocin depends on the growth phase. International Microbiology 22(4): 419–428. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00065-5>
511. **Todorova T., Pesheva M., Gregan F., Chankova S., (2015a).** Antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Papaver rhoeas* L. extract on *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Medicinal Food 18(4): 460–467. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0050>.
512. **Tomova AA., Kujumdzieva AV., Petrova VY., (2019).** Carbon source influences *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell survival strategies: quiescence or sporulation, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 33:1, 1464-1470, DOI: 10.1080/13102818.2019.1674188.
513. **Torres J., Di Como CJ., Herrero E., de la Torre-Ruiz MA., (2002).** Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. The journal of biological chemistry, Vol. 277, No.45, pp. 43495-43504, ISSN 0021-9258.
514. **Tribouillard D., Bach S., Gug F., Des-ban N., Beringue V., Andrieu T., Dormont D., Galons H., Laude H., Vilette D., Blondel M., (2006).** Using budding yeast to screen for antiprion drugs. Biotechnol. J. 1, 58 - 67.
515. **Tsukada M., Ohsumi Y., (1993).** Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 333: 169–174.
516. **UK Essays., (2018).** Impacts and Importance of New Product Development Marketing Essay. <https://www.ukessays.com/essays/marketing/impacts-and-importance-of-new-product-development-marketing-essay.php?vref=1>. University of Munich.
517. **Valadi A., Granath K., Gustafsson L., Adler L., (2004).** Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. J Biol Chem. 279(38):39677-85. doi: 10.1074/jbc.M403310200. PMID: 15210723.

518. **Valcourt JR., Lemons JM., Haley EM., Kojima M., Demuren OO., Collier HA., (2012).** Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle*. 11(9):1680-96. doi: 10.4161/cc.19879. PMID: 22510571.
519. **Van Aelst L., Jans AW., Thevelein J., (1991).** Involvement of the CDC25 gene product in the signal transmission pathway of the glucoseinduced RAS-mediated cAMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. microbiol.* 137:341–349.
520. **Van Eck JH., Prior BA., Brandt EV., (1993).** The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J Gen Microbiol* 139:1047–1054.
521. **van Leeuwen JS., Orij R., Luttik MAH., Smits GJ., Vermeulen NPE., Vos JC., (2011).** Subunits Rip1p and Cox9p of the respiratory chain contribute to diclofenac-induced mitochondrial dysfunction. *Microbiology* 157(Pt 3):685-694.
522. **Van Leeuwen MP., Slot DE., Van der Weijden GA., (2011).** Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol.* 82(2):174-94. doi: 10.1902/jop.2010.100266. PMID: 21043801.
523. **Veldman MB., Lin S., (2008).** Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatr Res.*, 64:470–476.
524. **Verghese J., Abrams J., Wang Y., Morano KA., (2012).** Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(2):115-58. doi: 10.1128/MMBR.05018-11. PMID: 22688810.
525. **Vilhelmsson O., Miller KJ., (2002).** Synthesis of pyruvate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* is stimulated by osmotic stress. *Appl Environ Microbiol.* 2002 May;68(5):2353-8. doi: 10.1128/AEM.68.5.2353-2358.2002. PMID: 11976108;.
526. **Vlad SC., Miller DR., Kowall NW., Felson DT., (2008).** Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology.* 70(19):1672-7. doi: 10.1212/01.wnl.0000311269.57716.63. PMID: 18458226.
527. **Vogel J., Snyder M., (2000).** The carboxy terminus of Tub4p is required for γ -tubulin function in budding yeast. *J. Cell Sci;* 113:3871–3882.
528. **Vogel K., Hinnen A., (1990).** The yeast phosphatase system *Mol Microbiol* 1990 4 2013 7.

529. **Wallbank AM., Ingridlehtag W., Meyer W., Boehm P., (1985).** Inactivation of bacteria and viruses in water: Passage of germicidal ultraviolet light through Teflon. Lab. Anim., 19: 273-274.
530. **Walsh DA., Van SM., Patten., (1994).** Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. FASEB J. 8:1227–1236.
531. **Wang L., Li, YJ., Chu Xu Z., Zhong Q., (2011).** Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains Mol. Biol. Rep., 39, pp. 445-449.
532. **Wang L., Weinshilboum RM., (2008).** Pharmacogenomics: candidate gene identification, functional validation and mechanisms. Hum. mol.genet. 17, R174–R179.
533. **Wang Y., Shirogane T., Liu D., Harper JW., Elledge SJ., (2003).** Exit from exit: resetting the cell cycle through Amn1 inhibition of G protein signaling. Cell 112(5):697-709.
534. **Wanichthanarak K., (2014).** Applied Bioinformatics in *Saccharomyces cerevisiae*. Chalmers Reproservice. ISBN 978-91-7597-032-5.
535. **Wanichthanarak., (2014).** Graph Database and R package for Omics integration. Available at <http://github.com/kwanjeera/grinn>.
536. **Warriner KG., Rysstad A., Murden P., Rumsby DT., Waites WM., (2000).** Inactivation of *Bacillus subtilis* spores on aluminum and polyethylene performed cartons by UV-excimer laser irradiation. J. Food Prot., 63: 753-757.
537. **Watson MS., (2006).** Environmental Influences on Microbial Growth. THE VIRTUAL EDGE: Lab 6 Cultivation of Bacteria II. Cell: 307-760-2942.
538. **Watson PF., Morris GJ., (1987).** Cold shock injury in animal cells. Symp Soc Exp Biol. 41:311-40. PMID: 3332489.
539. **Wawryn J., Krzepilko A., Myszk A., Bilinski T., (1999).** Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. Acta biochim pol 46 (2):249–253.
540. **Wei AA., (2021).** The Effect of Temperature on Microorganisms Growth Rate. The Expedition. Vol. 10.
541. **Wemmie JA, Steggerda SM., Moye-Rowley WS., (1997).** The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. J. Biol. chem. 272:7908–7914.

542. **Werner-Washburne M., Becker J., Kosic-Smithers J., Craig EA., (1989).** Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J. Bacteriol.* 171:2680–2688.
543. **Werner-Washburne ME, Braun GC, Johnston RA, Singer., (1993).** Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 57:383–401.
544. **Wiese-Bjornstal DM., Smith AM., LaMott EE., (1995).** A model of psychologic response to athletic injury and rehabilitation. *Athletic Training: Sports Health Care Perspectives*, 1(1), 16-30.
545. **Wilk A., (2007).** Pharmacopeia. *Pharmacopeial Forum: Volume No. 29(5);* 1531.
546. **Williams JP., Hallsworth JE., (2009).** Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? *Environ Microbiol.* 11(12):3292-308. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02079.x. PMID: 19840102.
547. **Wilson MA., Collins JL., Hod Y., Ringe D., Petsko GA., (2003).** The 1.1-Å^o resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease. *Proc. natl. acad. sci. USA* 100: 9256–9261.
548. **Wilson RS., Mendes De Leon CF., Barnes LL., Schneider JA., Bienias JL., Evans DA., Bennett DA., (2002).** Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *JAMA.* 287(6):742-8. doi: 10.1001/jama.287.6.742. PMID: 11851541.
549. **Winderickx J., Delay C., De Vos A., Klinger H., Pellens K., Vanhelmont T., Van Leuven F., Zabrocki P., (2008).** Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jul;1783(7):1381-95. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.020. PMID: 18298958.
550. **Wiseman H., Halliwell B., (1996).** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 313 (Pt 1)(Pt 1):17-29. doi: 10.1042/bj3130017. PMID: 8546679.
551. **Wong CM., Cheema AK., Zhang L., Suzuki YJ., (2008).** *Circ Res.* 102:310.
552. **Wong CM., Marcocci L., Liu L., Suzuki YJ., (2010).** *Antioxid Redox Signal.* 12:393.
553. **Wordon BA., Mortimer B., McMaster LD., (2012).** Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by

- ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. Food Research International. Volume 47, Issue 2, Pages 134-139.
554. **Xu W., San Lucas A., Wang Z., Liu Y., (2014).** Identifying microRNA targets in different gene regions. BMC Bioinformatics. 15 Suppl 7(Suppl 7):S4. doi: 10.1186/1471-2105-15-S7-S4. PMID: 25077573.
 555. **Xu Z., Liang YS., Lin D., Chen BL., (2016).** Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. Curr. Microbiol., 73, pp. 474-482.
 556. **Xu ZL., Li E., Shirliff MJ., Alam S., Yamasaki., (2009).** Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China J. Clin. Microbiol., 47, pp. 230-234.
 557. **Yagiela JA., Down FG., Johnson BS., Mariotti AJ., Neidle EA., (2011).** Pharmacology and therapeutics for dentistry. Mosby Elsevier. ISBN: 978-0-323-05593-2
 558. **Yamada T., Okabe M., Hiromi Y., (2003).** EDL/MAE regulates EGF-mediated induction by antagonizing Ets transcription factor Pointed. Development 130(17): 4085-4096.
 559. **Yamashoji S., Al Mamun A., Bari L., (2020).** Cytotoxic effects of menadione on normal and cytochrome c-deficient yeast cells cultivated aerobically or anaerobically. Biochem Biophys Rep. 24:100823. doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100823. PMID: 33083578.
 560. **Yancey PH., (2005).** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. J Exp Biol 208:2819-2830.
 561. **Yancey PH., Clark ME., Hand SC., Bowlus RD., Somero GN., (1982).** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science 217:1214 - 1222.
 562. **Yang Q., Zhang R., Tang P., Sun Y., Johnson C., Saredy J., Wu S., Wang J., Lu Y., Saaoud F., Shao Y., Drummer C., Xu K., Yu D., Li R., Ge S., Jiang X., Wang H., Yang X., (2021).** Ultrasound May Suppress Tumor Growth, Inhibit Inflammation, and Establish Tolerogenesis by Remodeling Innatome via Pathways of ROS, Immune Checkpoints, Cytokines, and Trained Immunity/Tolerance. J Immunol Res. 2021 Feb 9;2021:6664453. doi: 10.1155/2021/6664453. PMID: 33628851.

563. **Yuen K W Y., Warren C D., Chen O., Kwok T., Hieter P., Spencer F A., (2007).** Systematic genome in stability screen in yeast and their potential relevance to cancer. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3925 - 3930.
564. **Zemke, V L P., Schoenen D., (1990).** Ultraviolet disinfection of drinking water 1, communication: Inactivation of *E. coli* and coliform bacteria. *Zentralbl Hyg. Umweltmed.*, 190: 51-61.
565. **Zhalnina K., Dias R., de Quadros P D., Davis-Richardson A., Camargo F A., Clark I M., McGrath S P., Hirsch P R., Triplett E W., (2015).** Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microb Ecol.* 69(2):395-406. doi: 10.1007/s00248-014-0530-2. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25395291.
566. **Zhang L., Zhao H., Gan M., Jin Y., Gao X., Chen Q., Guan J., Wang Z., (2011).** Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresour Technol* 102(6):4573-9
567. **Zhang N., Wu J., Oliver S G., (2009).** Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during transition into stationary phase in yeast. *Microbiology* 155, 1690 - 1698.
568. **Zhang Y., (2000).** Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis*, Volume 21, Issue 6, Pages 1175–1182.
569. **Zhao X., Li Y L., Wang L., Xu Y Z., (2010).** Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Mol. Biol. Rep.*, 37, pp. 2183-2188.
570. **Zheng B., Albrecht U., Kaasik K., Sage M., Lu W., Vaishnav S., Li Q., Sun Z S., Eichele G., Bradley A., Lee C C., (2001).** Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell.* 105(5):683-94. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00380-4. PMID: 11389837.
571. **Zheng D Q., Wang Y T., Zhu Y X., Sheng H., Li K J., Sui Y., Zhang K., (2022).** Uncovering Bleomycin-Induced Genomic Alterations and Underlying Mechanisms in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 88(2):e0170321. doi: 10.1128/AEM.01703-21. Epub 2021 Nov 3. PMID: 34731050.

572. **Zheng P., Zhang M., Khan MH., Liu H., Jin Y., Yue J., Gao Y., Teng M., Zhu Z., Niu L., (2019).** Crystallographic Analysis of the Catalytic Mechanism of Phosphopantothenoylcysteine Synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 431(4):764-776.
573. **Zheng Y., Matlen B., Gentner D., (2002).** Spatial Alignment Facilitates Visual Comparison in Children. Cognitive Science published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Cognitive Science Society (CSS). ISSN: 1551-6709 online DOI: 10.1111/cogs.13182.
574. **Zhou Y., Kastiris PL., Dougherty SE., Bouvette J., Hsu AL., Burbaum L., Mosalaganti S., Pfeffer S., Hagen WJH., Förster F., Borgnia MJ., Vogel C., Beck M., Bartesaghi A., Silva GM., (2020).** Structural impact of K63 ubiquitin on yeast translocating ribosomes under oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(36):22157-22166. doi: 10.1073/pnas.2005301117. PMID: 32855298.
575. **Zips A., Schaule G., Flemming HC., (1990).** Ultrasound as a means of detaching biofilms. *Biofouling*, 2, 323 333. Zips, A., Schaule, G., Flemming, H.C. 1990 Ultrasound as a means of detaching biofilms. *Biofouling*, 2, 323 333.

IX. 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 1.167.

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 1.167.

X. 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).

XI. 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, MOMH;
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, MOMH.

Международни проекти:

1. „Green Technology Foresight about challenges from biotechnology and ICT - Digit-BioTech” номер: 2019-1-BG01-KA203-062371, програма ЕРАЗЪМ +;
2. „Smart Decision Tools for Reducing Hazards to Our Environment and Water Resources by Rehabilitating Open Dump” номер:2020-1-TR01-KA226-VET-098150;