

ТРАНСПОРТ ЭРГОСТЕРИНА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ НАРУШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭРГОСТЕРИНА

Обзор

© 2019 С.С. Соколов^{1*}, Н.И. Трушина², Ф.Ф. Северин¹, Д.А. Кнорре^{1,3}

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: sviatoslav.sokolov@gmail.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

³ Первый московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 01.10.2018

После доработки 21.11.2018

Принята к публикации 21.11.2018

Стерины являются важным компонентом биологических мембран, они определяют их физико-химические свойства и влияют на работу мембранных белков. Будучи нерастворимыми в воде, стерины не могут свободно проникать из одной клеточной мембраны в другую через водную фазу. Поэтому распределение стерина по мембранам разных органелл происходит неравномерно. Перемещение стерина между мембранами осуществляется преимущественно невезикулярным транспортом, с помощью белков семейств Lam и Osh. В обзоре обсуждаются последствия нарушения биосинтеза и транспорта эргостерина, в качестве примера используется модельный организм – пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Несмотря на то, что молекулярные механизмы работы Lam и Osh белков хорошо изучены, их биологическая роль остается неясной. Это связано с тем, что делеции отдельных *LAM* или *OSH* генов практически не имеют проявлений. В то же время нарушение биосинтеза эргостерина приводит к гибели клеток или их сенсibilизации ко многим стрессам. Однако в некоторых условиях, таких как мягкий солевой или тепловой стресс, снижение содержания эргостерина в мембранах, наоборот, приводит к увеличению относительной приспособленности клеток. Это говорит о том, что клеткам может быть выгодно быстро менять содержание стерина в плазматической мембране. Предполагается, что биологическая роль Lam-белков заключается, в частности, в оптимизации стеринового состава клеточных мембран при изменениях условий внешней среды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дрожжи, мембраны, метаболизм, стерины, Lam-белки, Osh-белки.

DOI: 10.1134/S032097251904002X

Стерины – это основные неполярные липиды клеточных мембран эукариот. В клетках животных преобладает холестерин, у многих видов грибов, включая наиболее изученный вид – пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, преобладает эргостерин, а в клетках растений присутствуют разнообразные фитостерины [1, 2]. Стерины играют важную роль в эндоцитозе [3], стабилизации мембранных белков [4], сортировке белков [5, 6], формировании и поддержании

кривизны мембран [7], поддержании уровня проницаемости мембран [8] и регуляции работы рецепторов [9]. Многие животные, в частности, насекомые, не способны синтезировать стерины и нуждаются в получении стерина с пищей. Иногда формируется симбиоз с основным донором стерина – грибами аскомицетами [10, 11]. Так, основным стеринотом у дрозофил является получаемый ими из дрожжей эргостерин [12]. Нематоды *Caenorhabditis elegans* также не способны к синтезу стерина [13]. В их мембранах содержание холестерина относительно небольшое, однако он играет важную роль в структуре мембран. Считается, что в нематодах он выполняет сигнальные функции, например, регулирует линьку у их личинок [14].

Принятые сокращения: МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ММК – межмембранные контакты; ПМ – плазматическая мембрана; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

* Адресат для корреспонденции.

Плазматическая мембрана помимо стерина содержит большое количество сфинголипидов. Согласно модели «зонтика», такое сочетание липидов вызвано не внутримембранными межмолекулярными взаимодействиями, а тем, что стерины не содержат гидрофильной части. Крупная гидрофильная группа сфинголипидов, при относительно малой гидрофобной части, необходима для компенсации избытка гидрофобных молекул стерина в этом участке мембраны [15]. Стерины являются ключевым липидным компонентом особых мембранных структур, называемых липидными «рафтами». Липидные рафты более структурированы и упакованы плотнее, чем окружающий их липидный бислой, в них преобладают насыщенные жирные кислоты [16]. Физико-химические свойства рафтов отличаются от свойств окружающей этот рафт мембраны. В частности, рафты толще остальной мембраны, из-за чего на их границе возникает поверхностное натяжение. В то же время стерины делают мембрану устойчивой к действию неионных детергентов [15]. Рафты структурируют плазматическую мембрану: многие белки, например, Na^+/H^+ антипортер Nha1p [17] и Р-АТФаза Pma1p [18] локализованы в рафтах. Разрушение рафтов приводит к ошибочной адресации Pma1p в другие мембраны клетки, что указывает на функциональную значимость рафтов при сортировке белков [18]. Таким образом, биологическая роль стерина обуславливается как их непосредственным влиянием на физико-химические свойства липидных мембран, так и опосредованно — их наличием влияет на сортировку и активность мембранных белков.

Дрожжи *S. cerevisiae* являются удобным модельным объектом для исследований липидного обмена. Это связано с простотой проведения генетических манипуляций с ними, а также с тем, что липидный состав дрожжей хорошо изучен и при этом не так богат, как липидный состав многоклеточных животных. В дрожжах *S. cerevisiae* содержится ~250 различных липидов [19], а у млекопитающих — более 1000 [20]. У дрожжей эргостерин является одним из самых распространенных липидов, его молярная доля от всех липидов составляет до 12%. Больше всего эргостерина содержится в плазматической мембране, где его концентрация достигает 40%. Меньше всего эргостерина — в мембранах митохондрий. Во всех остальных мембранах клетки молярная доля эргостерина составляет ~5% [19].

Синтез стерина — один из самых консервативных биосинтетических путей в эукариотических клетках. Было показано, что потерю многих генов биосинтеза эргостерина (17 из 19 незаменимых генов) можно компенсировать пу-

тем гетерологической экспрессией ортогологичного гена человека. Такая большая доля возможных замен является максимальной среди всех биосинтетических путей [21]. Пути биосинтеза эргостерина и холестерина схожи и различаются только на последних стадиях. Биосинтез стерина подразделяют на несколько этапов: 1) образование мевалоновой кислоты из ацетил-КоА, 2) образование изопентенил дифосфата из мевалоновой кислоты, 3) образование сквалена из изопентенил дифосфата, 4) циклизация сквалена в ланостерин, 5) превращение ланостерина в эргостерин. В биосинтезе эргостерина у дрожжей *S. cerevisiae* вовлечены 25 ферментов, называемых Erg (ERGosterol biosynthesis — биосинтез эргостерина [22–25]). Начиная со сквалена, все промежуточные продукты биосинтеза эргостерина нерастворимы в водной среде и дальнейшие превращения происходят на мембранах эндоплазматического ретикулума [22, 23] (рис. 1, см. также работу Hu et al. [25], в которой приведены структурные формулы интермедиатов пути). При этом Erg6p и другие ферменты биосинтеза стерина, а также эфиры промежуточных продуктов обнаруживаются в липидных каплях [26].

Несколько стадий биосинтеза стерина, осуществляемых белками Erg1p (сквален монооксигеназа КФ:1.14.13.132), Erg11p (ланостерин деметилаза, цитохром P450 КФ:1.14.13.70), Erg25p (С-4 метил стерин оксидаза КФ:1.14.13.72) и Erg5p (С-22 стерин десатураза КФ:1.14.19.41) требуют присутствия кислорода, поэтому в анаэробных условиях синтез эргостерина не происходит [23] (рис. 1).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА СТЕРИНОВ. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ НАРУШЕНИЙ

Стерины синтезируются в ЭР, откуда транспортируются в другие клеточные мембраны. Несмотря на постоянный липидный обмен между мембранами, клетка всегда поддерживает градиент стерина: концентрация стерина в ЭР составляет ~5 молярных %, увеличивается в секреторных путях и достигает максимума (до 40 молярных %) в ПМ, в которой содержится до 90% клеточных стерина [27–31]. Скорость транспорта стерина между ЭР и ПМ довольно высока: показано, что время полувыравнивания новосинтезированного эргостерина с пулом ПМ составляет 10–15 мин. Это соответствует переносу ~ 10^5 молекул эргостерина каждую секунду. Такая скорость более чем в 10 раз превышает расчетную величину пополнения эргостеринового

пула ПМ, необходимого для клеточного удвоения [32, 33].

Ингибирование везикулярного транспорта не оказывает существенного влияния на транспорт стерина в ПМ, поэтому считается, что основным путем обмена стерина между мембранами является невезикулярный транспорт через водную фазу в комплексе с белком [32]. Транспорт осуществляют два семейства эволюционно консервативных стерин-связывающих белков:

Osh и Lam. Последовательности генов, кодирующих белки этих семейств, обнаружены у большинства крупных таксонов эукариот. Однако поскольку подробнее всего они изучены на примере дрожжей *S.cerevisiae*, в данном обзоре рассмотрена роль этих белков и сделан акцент на транспорте эргостерина в дрожжевой клетке.

Osh-белки. Белковое семейство Osh (*Oxysterol-binding protein* [OSBP] *homologs* – гомологи оксистерин-связывающих белков) представлено у



Рис. 1. Метаболический путь биосинтеза эргостерина из сквалена в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. На схеме отражена: 1) последовательность реакций и обозначены гены, отвечающие за соответствующие стадии биосинтеза. Обозначены реакции, включающие в качестве реагента молекулярный кислород; 2) предсказанные *in silico* (www.molinspiration.com) изменения logP и площадь полярной поверхности интермедиатов биосинтеза стерина. На схеме отмечены только некоторые интермедиаты биосинтеза, имеющие тривиальные названия

дрожжей *S. cerevisiae* семью цитоплазматическими белками Osh1p–Osh7p, которые содержат ~400-аминокислотный липид-связывающий ORD (*OSBP related domain*) домен и являются переносчиками стерина [34]. В клетках человека гомологичное OSBP семейство представлено 16 белками, закодированными 12-ю генами, содержащими варианты сплайсинга [35]. Эксперименты на искусственных мембранах показали, что основной Osh-белок Osh4p достаточно медленно переносит стерин между ними [36]. В дальнейших функциональных и структурных работах было показано, что Osh4p может связывать не только стерин, но и фосфатидилинозитол 4-фосфат во взаимоисключающей манере и, таким образом, обменивать эти два липида между мембранами [37]. Это открытие послужило объяснением молекулярного механизма создания градиента стерина в клетках.

Согласно современным моделям, для ускорения межмембранного переноса стерина он осуществляется в специализированных местах межмембранных контактов (ММК), где расстояние между мембранами сокращается до 30 нм [35]. Механизм формирования и работы ММК был показан для гомолога Osh OSBP человека, который также функционирует как стерин/фосфатидилинозитол 4-фосфат обменник между ЭР и *транс*-отделом аппарата Гольджи. OSBP кроме стерин-связывающего домена (ORD) содержит FFAT мотив, который связывается с *транс*-

мембранным ЭР белком VAP [38] и *N*-концевой PH домен, который связывается с поверхностью Гольджи через белок Arf1p и фосфатидилинозитол 4-фосфат [39]. Таким образом, OSBP посредством FFAT и PH доменов создает ММК, в котором его ORD домен способен быстро обменивать стерин на фосфатидилинозитол 4-фосфат. Аналогичным доменным устройством обладают белки Osh1p, Osh2p и Osh3p *S. cerevisiae* [40] (рис. 2).

Несмотря на принадлежность к Osh-белкам, Osh6p и его близкий гомолог Osh7p транспортируют преимущественно не стерин. Их ORD домен обладает большим сродством к фосфатидилсерину и транспортирует его из ЭР в ПМ, аналогично остальным Osh-белкам, обменивая на фосфатидилинозитол 4-фосфат [41, 42]. При этом Osh6p и Osh7p способны связывать холестерин [43].

В работе Beh et al. было проведено широко-масштабное исследование фенотипических последствий нарушений *OSH* генов и попытка определить степень их взаимозаменяемости. Были получены 127 мутантов со всеми комбинациями нарушений семи *OSH* генов. Одиночные, как и двойные, тройные и даже четверные нарушения *OSH* генов не приводили к существенному снижению жизнеспособности в нормальных условиях роста. Сверхэкспрессия любого из семи *OSH* генов на мультикопийной плазмиде восстанавливала способность к росту штамма с

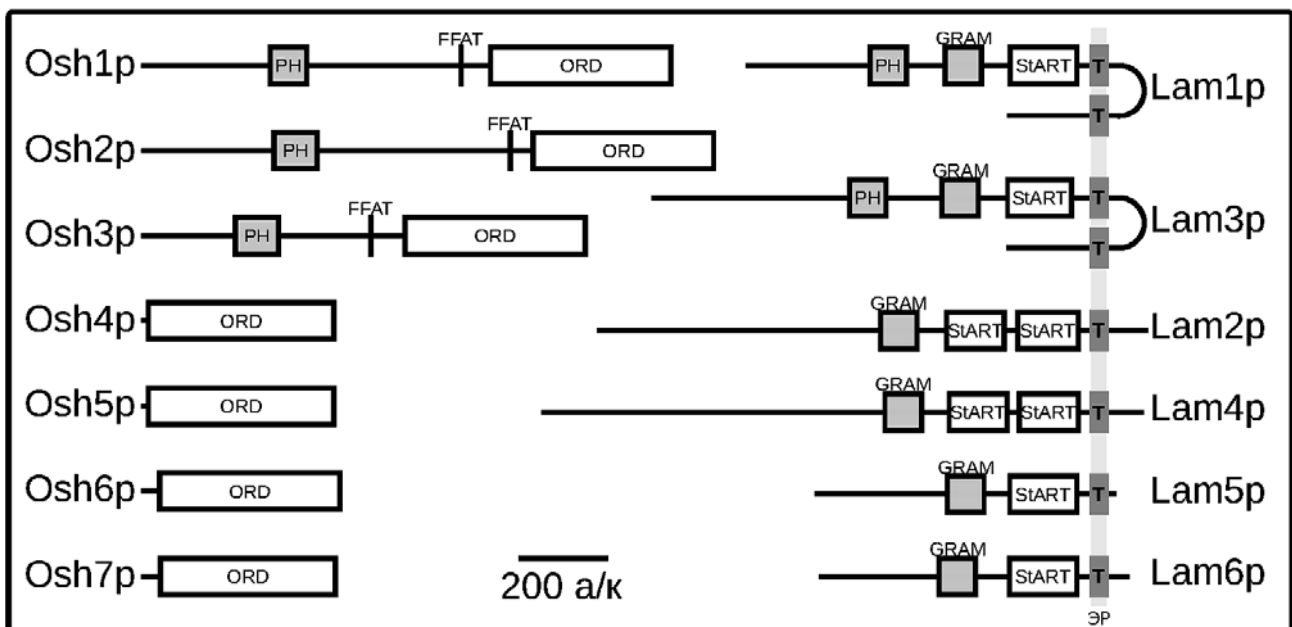


Рис. 2. Доменная структура Lam и Osh-белков дрожжей *S. cerevisiae*. На схеме обозначены стерин-связывающие: StART-подобные домены Lam-белков и ORD Osh-белков; PH домен, который связывается с поверхностью Гольджи через белок Arf1p и фосфатидилинозитол 4-фосфат; GRAM PH подобный домен Lam-белков; FFAT мотив, который связывается с *транс*-мембранным ЭР белком VAP; T – трансмембранный домен, закоренный в ЭР

нарушением всех семи *OSH* генов. Все мутанты были проверены на фенотипы, типичные для штаммов с нарушением стерина обмена, такие, как изменение чувствительности к добавлению в среду роста ловастатина (ингибитор HMG-CoA редуктазы, осуществляющей лимитирующий этап биосинтеза стерина и изопреноидов) [44], нистатина (полиеновый противогрибковый антибиотик, связывающийся с эргостерином клеточной мембраны и образующий каналы) [45], высоких концентраций хлорида натрия. Одиночные нарушения *osh2* и *osh4* приводили к устойчивости к нистатину, но не изменяли суммарного содержания эргостерина в клетках. Поэтому было предположено, что *Osh2p* и *Osh4p* участвуют в транспорте эргостерина к ПМ. Нарушение *osh1* приводило к повышенной чувствительности к ловастатину. Нарушение *osh5* или *osh6* повышало суммарное содержание стерина в клетках в полтора раза. Нарушение всех семи *OSH* генов приводило к 3,5-кратному увеличению суммарного содержания эргостерина в клетках. Был сделан вывод, что *OSH1*, *OSH5* и *OSH6* каким-то образом вовлечены в регуляцию биосинтеза эргостерина. Однако, несмотря на существенную взаимозаменяемость, все *Osh*-белки, по всей видимости, имеют и свою уникальную роль: во-первых, профили экспрессии генов в *OSH* мутантах отличались друг от друга и от дикого типа; исключение составили относительно схожие *osh5* и *osh6*. Во-вторых, оказалось, что многие тройные делеции *OSH* генов более вредны для клетки, чем четверные. Это предполагает антагонистичность действия отдельных *Osh*-белков. Например, если два отдельно взятых *Osh*-белка участвуют в переносе липидов в противоположном направлении, то делеция одного из них теоретически может приводить к большему изменению липидного состава мембран, чем делеция сразу обоих генов. В-третьих, было показано, что функция *Osh5p* иногда оказывается противоположной функциям *Osh3p* и *Osh6p*. Об этом говорит то, что нарушение *osh1* и *osh4* самих и в комбинации с другими *OSH* приводит к увеличению чувствительности клеток к 1,2 М NaCl, а нарушение *osh6* и *osh7*, напротив, к устойчивости [46].

Lam-белки. Биоинформатический анализ, выполненный в группе Т. Levine, показал еще одно эволюционно консервативное белковое семейство, содержащее стерин-связывающий StART-подобный домен (*steroidogenic acute regulatory transfer*). Данные белки были названы Lam (*lipid transfer protein anchored at a membrane contact site* — липид-переносящие белки, заякоренные в местах контактов мембран) [47]. StART-подобные домены Lam-белков имеют гидрофобную

полость, которая может связывать стерин. Субстратная специфичность Lam-белков до сих пор полностью не определена. Однако, по всей видимости, Lam-белки способны переносить довольно широкую группу стерина. Так, например, Lam2p (*Ysp2p*) способен переносить не только эргостерин, но также холестерин и дигидро-эргостерин [48]. С другой стороны, недавно была определена структура стерин-связывающего StART домена Lam2p. Выяснилось, что сайт связывания эргостерина расположен ближе ко входу в карман, чем считалось ранее. В то же время в глубине кармана содержится несколько молекул структурированной воды, образующих водородные связи с 3-гидроксильной группой эргостерина [48]. Опубликованная структура и проведенный авторами мутационный анализ кармана связывания позволяет предположить, что константа связывания эргостерина с белком Lam2p может быть все же несколько выше, чем константы связывания этого белка с интермедиатами биосинтеза эргостерина.

Lam семейство представлено у дрожжей *S. cerevisiae* шестью Lam1p-Lam6p белками. Их отличительной от *Osh*-белков особенностью является наличие трансмембранного C-концевого домена, заякоренного в ЭР. Гены *LAM1-LAM6* являются попарными гомологами, возникшими в результате полногеномной дупликации (рис. 2). Lam-белки локализованы в ММК ЭР с остальными мембранами: Lam1p (*Ysp1p*), Lam2p (*Ysp2p*), Lam3p (*Sip3p*) и Lam4p находятся в ММК ЭР и ПМ [47], Lam5p и Lam6p в ЭР-митохондриальных и ЭР-вакуолярных контактах [47, 49] (рис. 3). Причем Lam-содержащие ММК не совпадают с известными ММК и являются новым типом межмембранных контактов. Основной функцией Lam является либо непосредственный неvesикулярный транспорт стерина, либо организация транспорта стерина цитозольными *Osh*-белками в контактных сайтах между ЭР и другими мембранами. Способность Lam-белков непосредственно переносить стерин между мембранами была показана экспериментально [47, 48]. Также существует модель, согласно которой основной функцией Lam может быть организация ММК и функционирования *Osh*-белков в нем [50]. Примечательно, что белки Lam и *Osh*, согласно доступной информации из базы данных о белковых семействах Pfam [51], закодированы в геноме насекомых, которые, как обсуждалось выше, не способны синтезировать стерин. Это свидетельствует о том, что белки этих семейств могут осуществлять и обратный транспорт стерина от плазматической мембраны к мембранам клеточных органелл.

Нарушение отдельных *LAM* генов не меняет скорости роста клеток *S. cerevisiae* в оптималь-

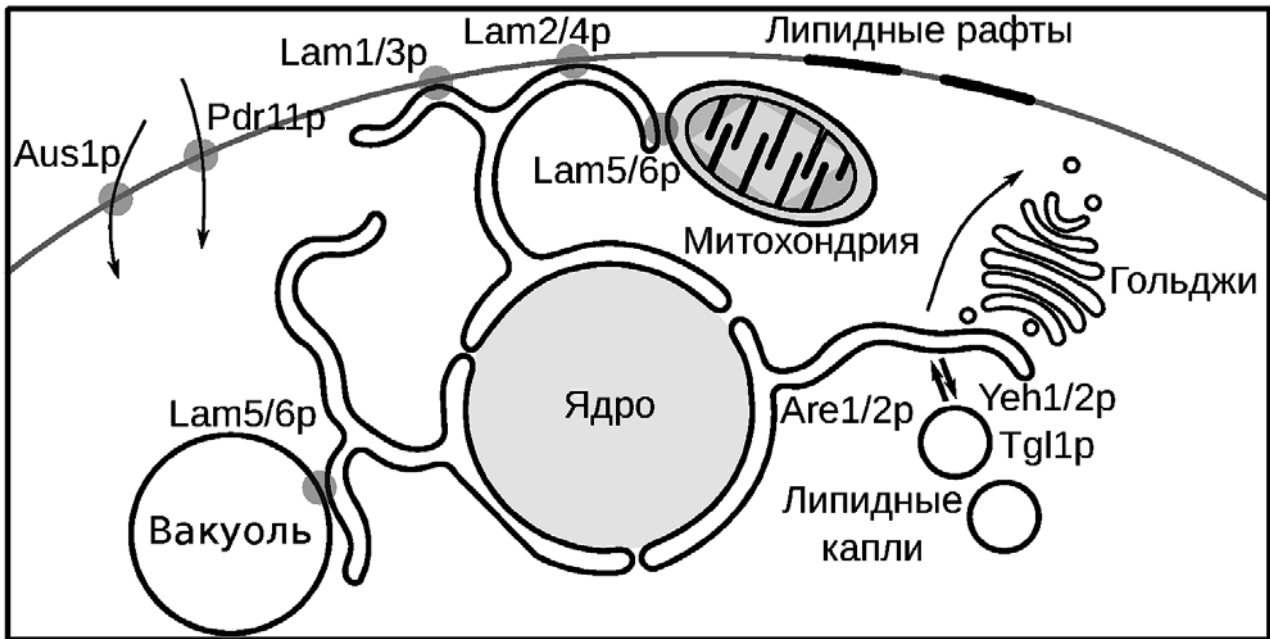


Рис. 3. Основные места транспорта стерина в *S. cerevisiae*. Мембранные белки-транспортеры стерина обозначены серыми кружками. Стрелки указывают направление транспорта стерина

ных условиях. Единственным известным нам задокументированным фенотипом штамма *Δusp2* (*Δlam2*) является повышенная раздробленность митохондриальной сети в стационарной фазе роста [52]. Это согласуется с тем, что распределение стерина по мембранам клетки может оказывать влияние на митохондриальную динамику: репрессия некоторых генов, необходимых для биосинтеза эргостерина, вызывает значительные нарушения структуры митохондриальной сети [53]. Отсутствие выраженных фенотипов делеций говорит о том, что, по всей видимости, паралогичные *LAM* гены дрожжей способны взаимозаменять друг друга.

Нарушение *LAM* генов может приводить как к снижению, так и к значительному увеличению устойчивости клеток к стрессу. Так, *LAM1* (*YSP1*) и *LAM2* (*YSP2*, *LTC4*) изначально были охарактеризованы нами как гены, продукты которых участвуют в развитии клеточной гибели, вызванной амиодароном, альфа-фактором или уксусной кислотой [52, 54, 55]. Гены были названы *YSP1* (*yeast suicidal protein*) и *YSP2* соответственно [54, 55]. Нарушение *lam3* (*SIP3*) приводит к многократному увеличению устойчивости клеток *S. cerevisiae* к миконазолу [56] и хинину [57]. Делеции *lam1*, *lam2* и *lam3*, но не *lam4* (*LTC3*), *lam5* и *lam6* приводят к гиперчувствительности к амфотерицину В, токсичность которого опосредована связыванием со стеринами [47]. Нарушение *lam6* (*LTC1*) влияет на рост клеток при отсут-

ствии в них *Mdm34p* (субъединица ЭР митохондриального ММК *ERMES*). *LAM6* необходим для образования стерин-богатых доменов в вакуолях в ответ на стресс [49]. Делеция сразу обоих паралогичных генов *lam2* и *lam4* приводит к заметному увеличению резистентности мембран к ингибитору биосинтеза сфинголипидов — мириоцину [58], в то время как делеция каждого из них по отдельности не оказывает никакого эффекта. Мы предполагаем, что проявление явных фенотипов делеций в стрессорных условиях указывает на то, что 1) в условиях стресса функции одного из двух паралогичных генов оказывается недостаточно для нужд клетки или о том, что 2) функция *Lam*-белков востребована, в первую очередь, в стрессорных условиях. Следует отметить, что эти два предположения не являются взаимоисключающими.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ НАРУШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА ЭРГОСТЕРИНА

Поскольку невезикулярный транспорт стерина вносит основной вклад в обмен стерина между мембранами, можно предположить, что нарушение транспорта стерина вызывает такие же (или похожие) изменения в клетке, что и нарушение биосинтеза стерина. В этом разделе мы рассмотрим последствия нарушения био-

синтеза стерина на примере клеток дрожжей. В отличие от переносчиков стерина, делеция большинства *ERG* генов летальна. Исключение составляют пять последних ферментов, кодируемых генами *ERG2–ERG6* и осуществляющих превращение зимостерина в эргостерин [59, 60]. Вероятно, это связано с тем, что последние семь последних интермедиатов биосинтеза эргостерина довольно слабо отличаются от эргостерина по ключевым физико-химическим свойствам — гидрофобности и площади полярной поверхности (рис. 1). Нарушение этих генов не убивает клетки дрожжей [61], но меняет их устойчивость к некоторым стрессам [62, 63]. В стандартных лабораторных условиях на богатой среде нелетальные *ERG* мутанты, за исключением *erg5*, растут с такой же кинетикой, как у дикого типа. Снижению скорости роста *erg5* обусловлено его участием не только в биосинтезе эргостерина, но и в биосинтезе ненасыщенных жирных кислот в митохондриях. Нарушение *erg5* приводит к образованию дыхательно некомпетентных клеток в популяции [64]. Однако в стрессовых условиях (высушивание, гиперосмотический стресс, тепловой стресс) выживание *ERG* мутантов существенно снижается [65].

Выявление непосредственной роли эргостерина в защите клеток от стресса затруднено, поскольку нарушение его биосинтеза приводит не только к исчезновению эргостерина из клеточных мембран, но и к значительным вторичным перестройкам, в том числе к изменению содержания различных сфинголипидов в этих мембранах [66]. В то же время добавление экзогенного эргостерина к таким клеткам требует дополнительных вмешательств в геном дрожжей или создания анаэробии, что создает неопределенности при интерпретации результатов таких экспериментов. Кроме того, изменение стерина состава плазматической мембраны меняет как свойства фосфолипидного бислоя [67], так и активность белков, входящих в ее состав. Так, например, в клетках дикого типа переносчик триптофана Tat2p локализован в ПМ при низком содержании триптофана в клетке и в вакуоли — при высоком. Однако в штамме с делецией гена *erg6* белок Tat2p адресуется в вакуоль вне зависимости от концентрации триптофана. Это делает мутацию *erg6* летальной в штамме, ауксотрофном по триптофану [6].

Было показано, что работа неспецифических ABC-переносчиков, являющихся частью системы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) клетки, зависит от наличия эргостерина. Сверхэкспрессия гена основного неспецифического ABC-переносчика плазматической мембраны *PDR5* увеличивала резистент-

ность клеток к его субстратам, таким как циклогексимид [68], а делеция *erg2-erg6* генов в такой системе значительно снижала этот защитный эффект [69]. Позднее было показано, что добавление экзогенного эргостерина на фоне мутации *upc2-1*, активирующей способность клеток поглощать внеклеточные стеринны, позволяет частично компенсировать неблагоприятный эффект делеции *erg2* на защиту клетки от циклогексимида. Повышенная проницаемость плазматической мембраны *erg2* для циклогексимида объяснялась увеличением анизотропии мембраны [67]. Из-за нарушений барьерной функции плазматической мембраны и снижения активности помп МЛУ клетки дрожжей с делециями генов последних стадий биосинтеза эргостерина обычно оказываются сверхчувствительными к ингибиторам, чьи мишени локализованы в цитоплазме клетки [70–72].

Нарушение работы неспецифических ABC-переносчиков в плазматической мембране не является единственной причиной повышенной чувствительности клеток дрожжей с нарушенными системами синтеза эргостерина к стрессам. Изменение стерина состава в клетках приводит к изменению резистентности к стрессам, непосредственно не связанным с работой помп МЛУ. Так, делеция генов *erg3* или *erg6* снижает устойчивость дрожжей к перекиси водорода. Данный эффект, по всей видимости, связан с ограниченной скоростью диффузии перекиси водорода через мембраны, содержащие эргостерин [73]. В то же время, добавление экзогенного эргостерина приводит к увеличению чувствительности клеток к прооксиданту менадиону [74]. Это позволяет предположить, что главным вкладом эргостерина в антиоксидантную защиту клетки является ограничение диффузии перекиси водорода через плазматическую мембрану. С другой стороны, как было показано, мутация по *erg5* (и в меньшей степени *erg2* и *erg4*) сенсibiliзирует клетки к трет-бутилгидропероксиду [75]), что указывает на роль стерина в защите мембран от перекисного окисления ее липидов.

Делеции генов *erg2* и *erg6* увеличивают чувствительность клеток к высокой концентрации солей [76]. По всей видимости, это связано с повышением трансмембранного потенциала на плазматической мембране. Штаммы *erg2* и *erg6* с большой скоростью захватывают ионы металлов (Li^+ , Na^+), а также липофильный катион метиловый фиолетовый [76, 77]. Этот же эффект служит причиной повышенной чувствительности мутантов по генам биосинтеза эргостерина к тетраметиламмонии [78].

На разобранных выше примерах видно, что наличие оптимального набора стерина в плазм-

матической мембране клетки определяет избирательность ее проницаемости и способствует нормальной работе белков, расположенных в этой мембране. Тем не менее, нарушение последних стадий биосинтеза эргостерина могут приводить и к увеличению резистентности к стрессам. Так делеция генов *erg2-erg5* увеличивает скорость роста клеток при 39,5 °C [63]. Делеция *erg5* увеличивает устойчивость клеток дрожжей к калиевому ионофору валиномицину, однако стоит отметить, что делеция гена *erg3*, отвечающего за предыдущий этап биосинтеза эргостерина, вызывает обратный эффект [62]. Прерывание пути биосинтеза эргостерина на уровне *ERG11*, вызванное добавлением флюконазола в небольшой концентрации (20 мкМ), приводит к увеличению скорости роста клеток в присутствии 400 мМ NaCl. Более того, в таких условиях клетки сами пытаются выключить биосинтез эргостерина: добавление 400 мМ NaCl снижает уровень экспрессии генов *ERG11*, *ERG2* и *ERG3* [74]. Это говорит о том, что изменение стеринного состава мембран может быть адаптивным ответом на повышенную концентрацию соли во внешней среде. Мы предполагаем, что одной из функций невезикулярного транспорта стериннов может быть быстрое изменение липидного состава плазматической мембраны в условиях стресса.

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЭРГОСТЕРИНА. ТРАНСПОРТ СТЕРИНОВ ИЗ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ. ЗАПАСАНИЕ В ЛИПИДНЫХ КАПЛЯХ

Содержание стериннов в мембранных компартментах определяется не только скоростью его транспорта между этими компартментами, но и скоростью его биосинтеза. В этом разделе мы рассматриваем регуляторные механизмы, позволяющие клеткам дрожжей поддерживать содержание эргостерина в мембранах на приблизительно постоянном уровне. Регуляция синтеза стериннов очень важна, поскольку избыток стериннов токсичен для клеток. Поддержание количества стериннов достигается механизмами обратной связи на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях [79]. Способность дрожжей противостоять стрессу часто связана с уровнем содержания эргостерина. Так, например, содержание эргостерина в штаммах дрожжей, устойчивых к замораживанию, выше, чем в обычных дрожжах. В условиях высоких концентраций этанола в среде *S. cerevisiae* увеличивают содержание эргостерина для предотвращения повреждения и поддержания нормальной проницаемости мембран [80].

Транскрипционные факторы Urc2p и Esc2p являются сенсорами стериннов в клетке, это паралоги, возникшие в результате полногеномной дупликации. Они являются основными регуляторами биосинтеза эргостерина в клетках дрожжей. В условиях низкой концентрации стериннов (например, в условиях гипоксии, так как без кислорода невозможен синтез эргостерина, см рис. 1) Urc2p индуцирует экспрессию генов пути биосинтеза эргостерина, связываясь с регуляторным элементом в области промотора. Связывание эргостерина с Urc2p репрессирует его транскрипционную активность. Это происходит предположительно из-за того, что связывание эргостерина закрывает адресную последовательность белка ядерной локализации [81]. При гипоксии Urc2p также индуцирует продукцию ABC-переносчиков Aus1p и Pdr1p, которые участвуют в захвате стериннов из среды [82] (рис. 3).

Существует много механизмов регуляции гомеостаза стериннов в аэробных условиях. Один из способов — это запасание избытка стериннов в виде сложных эфиров в липидных каплях. Другой — экспорт стериннов в среду в ацетилированном виде. Ацетилирование стериннов может также служить для удаления поврежденных молекул. Эта реакция в клетках дрожжей осуществляется ацетилтрансферазой Atf2p, а деацетилирование — деацетилазой Say1p, оба этих фермента располагаются в ЭР [83]. Новосинтезированный эргостерин тоже ацетилируется Arf2p, но быстро деацетилируется Say1p; при этом незрелые интермедиаты биосинтеза эргостерина также могут ацетилироваться, но не деацетилируются. Для удаления ацетилированных стериннов они доставляются к ПМ, где связываются с белками (pathogen-related yeast — Pry), способными связывать стеринны [84]. Два белка этого семейства — Pry1p и Pry2p — являются секретирруемыми, и мутанты по этим генам не могут секретировать ацетилированные стеринны. Этерификация стериннов и гидролиз стеринновых эфиров служат для поддержания оптимального соотношения стериннов в различных клеточных компартментах [85].

Избыток свободных стериннов в ЭР может быть этерефицирован с длинноцепочечными жирными кислотами двумя ЭР-локализованными ацил-CoA: стерин ацилтрансферазами, Are1p and Are2p, а образованный стеринный эфир запасается в липидных каплях [86–88] (рис. 3). Are1p работает в основном в условиях гипоксии, Are2p активна в аэробных условиях [89]. Благодаря ацилтрансферазе Are2p в аэробных условиях флуоресцентный аналог эргостерина, дегидроэргостероин, перераспределяется внутри клет-

ки и собирается в липидные капли, для чего требуется АТФ [90]. За обратный процесс в дрожжах отвечают три гидролазы сложных эфиров Yeh1p, Yeh2p и Tgl1p [91, 92]. Tgl1p и Yeh1p локализируются в липидных каплях, а Yeh2p — в плазматической мембране, где наблюдается наибольшая гидролазная активность. Этерификация стерина и запасание в липидных каплях — потенциальный механизм предотвращения избыточного накопления стерина в мембранах. Процесс этерификации не является жизненно важным при росте в стандартных условиях, что свидетельствует о достаточности регуляции скорости биосинтеза и транспорта стерина в клетке для предотвращения избыточного накопления стерина. Липидные капли формируются из ЭР и состоят преимущественно из триацилглицерина и эфиров стерина, окруженных фосфолипидами. Подробно о строении и роли липидных капель в метаболизме (см. обзоры [93, 94]). Многие белки биосинтеза эргостерина присутствуют в липидных каплях [94], Erg6p считается маркерным белком для липидных капель [95].

Еще один белок, который участвует в переносе стерина и поглощении экзогенных стерина, кодируется геном *ARV1* и обнаружен среди различных эукариот. Делеция *arv1* приводит к увеличению уровней стерина в ЭР и в мембранах вакуолей, а также к уменьшению содержания стерина в плазматической мембране. Поглощение стерина из среды в клетках с инактивированным *arv1* нарушено. Ортолог *ARV1* человека способен восполнить нарушение *arv1* в *S. cerevisiae* [96]. Нарушение гомолога *ARV1* в млекопитающих приводило к аналогичным последствиям, кроме того повышался уровень желчных кислот [97]. Нарушение *arv1* не влияет на транспорт стерина между ПМ и ЭР. Вместо этого исследователи показали различия в морфологии ЭР и организации липидного бислоя ПМ между клетками дикого типа и *arv1*, что указывает на роль Arv1p в мембранном гомеостазе. В клетках *arv1* проявляются специфические дефекты, позволяющие предположить, что Arv1p катализирует встраивание в мембраны белков с якорным С-терминальным одинарным трансмембранным доменом, вовлеченных в гомеостаз мембран [98].

Доступная на данный момент информация о механизмах синтеза, транспорта, запасания и экспорта стерина в клетках дрожжей говорит о том, что клетка инвестирует существенные ресурсы в транспорт стерина между клеточными мембранами. При этом, с одной стороны, активность Osh-белков способствует созданию и поддержанию градиентов стерина. С другой стороны, отдельные Osh-белки, а также белки се-

мейства Lam, выравнивают эти градиенты. С чем может быть связано наличие такой противоположно направленной активности переносящих белков? Мы предполагаем, что функционирование этой системы необходимо для того, чтобы клетка имела возможность быстро менять содержание эргостерина в плазматической мембране при резком изменении условий среды. Это может быть важным для защиты как от гиперосмотического стресса, так и от бактериальных токсинов, способных встраиваться в стерин-содержащую мембрану эукариотической клетки (см. [99]). Кроме того, поскольку возможности эукариот по утилизации стерина ограничены, можно предположить, что обмен стерина между мембранами и липидными каплями позволяет клетке поддерживать их концентрацию в мембранах на относительно постоянном (оптимальном) уровне. Липидные капли могут выступать в качестве резервуара для стерина и, в совокупности с системами транспорта, уменьшать необходимость тонкой регуляции биосинтеза стерина — мультистадийного процесса, зависящего от многих внешних факторов (например, от наличия кислорода). Многие аспекты механизма работы и биологической роли стерин-транспортирующих белков остаются до сих пор нераскрытыми. Это обусловлено взаимозаменяемостью функций этих белков друг другом в пределах каждого из семейств. Например, не до конца ясна субстратная специфичность стерин-связывающих доменов. Неизвестно, способны ли Lam-белки переносить модифицированные молекулы стерина или интермедиаты его биосинтеза. Также пока неясно, существуют ли посттрансляционные механизмы регуляции активности стерин-переносящих систем. Решение этих вопросов позволит получить полную картину пространственной организации потока стерина в эукариотической клетке.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (18-14-00151).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Мы очень благодарны рецензентам за ценные замечания, а также Аглае Азбаровой за помощь с редактированием нашей рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Desmond, E., and Gribaldo, S. (2009) Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature, *Genome Biol. Evol.*, **1**, 364–381, doi: org/10.1093/gbe/evp036.
- Weete, J.D., Abril, M., and Blackwell, M. (2010) Phylogenetic distribution of fungal sterols, *PLoS One*, **5**, e10899, doi: org/10.1371/journal.pone.0010899.
- Souza, C.M., and Pichler, H. (2007) Lipid requirements for endocytosis in yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 442–454, doi: org/10.1016/j.bbaliip.2006.08.006.
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2002) Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 384–392.
- Mayor, S., Sabharanjak, S., and Maxfield, F.R. (1998) Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes, *EMBO J.*, **17**, 4626–4638, doi: org/10.1093/emboj/17.16.4626.
- Umeyayashi, K., and Nakano, A. (2003) Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane, *J. Cell. Biol.*, **161**, 1117–1131, doi: org/10.1083/jcb.200303088.
- Lucero, H.A., and Robbins, P.W. (2004) Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, **426**, 208–224, doi: org/10.1016/j.abb.2004.03.020.
- Mullner, H., and Daum, G. (2004) Dynamics of neutral lipid storage in yeast, *Acta Biochim. Polonica*, **51**, 323–47, doi: org/035001323.
- Gimpl, G., Burger, K., and Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as modulator of receptor function, *Biochemistry*, **36**, 10959–10974, doi: org/10.1021/bi963138w.
- Blackwell, M. (2017) Made for each other: ascomycete yeasts and insects, *Microbiol. Spectr.*, **5**, doi: org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0081-2016.
- Clark, A.J., and Block, K. (1959) The absence of sterol synthesis in insects, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2578–2582.
- Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., and Eaton, S. (1999) Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains, *J. Biol. Chem.*, **274**, 12049–12054.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, *Science*, **282**, 2012–2008.
- Kurzchalia, T.V., and Ward, S. (2003) Why do worms need cholesterol? *Nat. Cell Biol.*, **5**, 684–688, doi: org/10.1038/ncb0803-684.
- Huang, J., and Feigenson, G.W. (1999) A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers, *Biophys. J.*, **76**, 2142–2157, doi: org/10.1016/S0006-3495(99)77369-8.
- Simons, K., and Ehehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J. Clin. Invest.*, **110**, 597–603, doi: org/10.1172/JCI16390.
- Mitsui, K., Hatakeyama, K., Matsushita, M., and Kanazawa, H. (2009) *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p associates with lipid rafts and requires sphingolipid for stable localization to the plasma membrane, *J. Biochem.*, **145**, 709–720, doi: org/10.1093/jb/mvp032.
- Bagnat, M., Chang, A., and Simons, K. (2001) Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast, *Mol. Biol. Cell*, **12**, 4129–4138, doi: org/10.1091/mbc.12.12.4129.
- Ejsing, C.S., Sampaio, J.L., Surendranath, V., Duchoslav, E., Ekroos, K., Klemm, R.W., and Shevchenko, A. (2009) Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2136–2141, doi: org/10.1073/pnas.0811700106.
- Sampaio, J.L., Gerl, M.J., Klose, C., Ejsing, C.S., Beug, H., Simons, K., and Shevchenko, A. (2011) Membrane lipidome of an epithelial cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1903–1907, doi: org/10.1073/pnas.1019267108.
- Kachroo, A.H., Laurent, J.M., Yellman, C.M., Meyer, A.G., Wilke, C.O., and Marcotte, E.M. (2015) Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity, *Science*, **348**, 921–925, doi: org/10.1126/science.aaa0769.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., and Dickson, R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **14**, 1471–1510.
- Kristan, K., and Rizner, T.L. (2012) Steroid-transforming enzymes in fungi, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **129**, 79–91, doi: org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.012.
- Klug, L., and Daum, G. (2014) Yeast lipid metabolism at a glance, *FEMS Yeast Res.*, **14**, 369–388, doi: org/10.1111/1567-1364.12141.
- Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., and Zeng, B. (2017) Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*, *Indian J. Microbiol.*, **57**, 270–277, doi: org/10.1007/s12088-017-0657-1.
- Zinser, E., Paltauf, F., and Daum, G. (1993) Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism, *J. Bacteriol.*, **175**, 2853–2858.
- Lange, Y., Swaisgood, M.H., Ramos, B.V., and Steck, T.L. (1989) Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **264**, 3786–3793.
- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M. Athenstaedt, K., Hrstnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F.T., and Kohlwein, S.D. (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane, *J. Cell Biol.*, **146**, 741–754.
- Brugger, B., Sandhoff, R., Wegehingel, S., Gorgas, K., Malsam, J., Helms, J.B., Lehmann, W.D., Nickel, W., and Wieland, F.T. (2000) Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles, *J. Cell Biol.*, **151**, 507–518.
- Klemm, R.W., Ejsing, C.S., Surma, M.A., Kaiser, H.-J., Gerl, M.J., Sampaio, J.L., de Robillard, Q., Ferguson, C., Proszynski, T.J., Shevchenko, A., and Simons, K. (2009) Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the *trans*-Golgi network, *J. Cell Biol.*, **185**, 601–612, doi: org/10.1083/jcb.200901145.
- Mesmin, B., and Maxfield, F.R. (2009) Intracellular sterol dynamics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 636–645, doi: org/10.1016/j.bbaliip.2009.03.002.
- Baumann, N.A., Sullivan, D.P., Ohvo-Rekila, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z. Beh, C.T., and Menon, A.K. (2005) Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs *via* non-vesicular equilibration, *Biochemistry*, **44**, 5816–5826, doi: org/10.1021/bi048296z.
- Sullivan, D.P., Ohvo-Rekila, H., Baumann, N.A., Beh, C.T., and Menon, A.K. (2006) Sterol trafficking between the endoplasmic reticulum and plasma membrane in yeast, *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 356–358, doi: org/10.1042/BST0340356.
- Kentala, H., Weber-Boyyat, M., and Olkkonen, V.M. (2016) OSBP-related protein family: mediators of lipid

- transport and signaling at membrane contact sites, *Intern. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **321**, 299–340, doi: org/10.1016/bs.ircmb.2015.09.006.
35. Tong, J., Manik, M.K., Yang, H., and Im, Y.J. (2016) Structural insights into nonvesicular lipid transport by the oxysterol binding protein homologue family, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 928–939, doi: org/10.1016/j.bbali.2016.01.008.
 36. Raychaudhuri, S., Im, Y.J., Hurley, J.H., and Prinz, W.A. (2006) Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides, *J. Cell Biol.*, **173**, 107–119, doi: org/10.1083/jcb.200510084.
 37. De Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastra, B., Bourguet, W., Antonny B., and Drin, G. (2011) Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers, *J. Cell Biol.*, **195**, 965–978, doi: org/10.1083/jcb.201104062.
 38. Loewen, C.J.R., Roy, A., and Levine, T.P. (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Op1p binds VAP, *EMBO J.*, **22**, 2025–2035, doi: org/10.1093/emboj/cdg201.
 39. Levine, T.P., and Munro, S. (2002) Targeting of Golgi-specific pleckstrin homology domains involves both PtdIns 4-kinase-dependent and -independent components, *Curr. Biol.*, **12**, 695–704.
 40. Raychaudhuri, S., and Prinz, W.A. (2010) The diverse functions of oxysterol-binding proteins, *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **26**, 157–177, doi: org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113334.
 41. Maeda, K., Anand, K., Chiapparino, A., Kumar, A., Poletto, M., Kaksonen, M., and Gavin, A.C. (2013) Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins, *Nature*, **501**, 257–261, doi: org/10.1038/nature12430.
 42. Moser von Filseck, J., Copic, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C.L., Bourguet, W., and Drin, G. (2015) Intracellular transport. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate, *Science*, **349**, 432–436, doi: org/10.1126/science.aab1346.
 43. Tian, S., Ohta, A., Horiuchi, H., and Fukuda, R. (2018) Oxysterol-binding protein homologs mediate sterol transport from the endoplasmic reticulum to mitochondria in yeast, *J. Biol. Chem.*, **293**, 5636–5648, doi: org/10.1074/jbc.RA117.000596.
 44. Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., et al. (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3957–3961.
 45. Woods, R.A. (1971) Nystatin-resistant mutants of yeast: alterations in sterol content, *J. Bacteriol.*, **108**, 69–73.
 46. Beh, C.T., Cool, L., Phillips, J., and Rine, J. (2001) Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues, *Genetics*, **157**, 1117–1140.
 47. Gatta, A.T., Wong, L.H., Sere, Y.Y., Calderon-Norena, D.M., Cockcroft, S., Menon, A.K., and Levine, T.P. (2015) A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport, *eLife*, **4**, doi: org/10.7554/eLife.07253.
 48. Horenkamp, F.A., Valverde, D.P., Nunnari, J., and Reinisch, K.M. (2018) Molecular basis for sterol transport by StART-like lipid transfer domains, *EMBO J.*, **37**, doi: org/10.15252/embj.201798002.
 49. Murley, A., Sarsam, R.D., Toulmay, A., Yamada, J., Prinz, W.A., and Nunnari, J. (2015) Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER-mitochondria and ER-vacuole contacts, *J. Cell Biol.*, **209**, 539–548, doi: org/10.1083/jcb.201502033.
 50. Wong, L.H., and Levine, T.P. (2016) Lipid transfer proteins do their thing anchored at membrane contact sites... but what is their thing? *Biochem. Soc. Trans.*, **44**, 517–527, doi: org/10.1042/BST20150275.
 51. Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L., Tate, J., and Punta, M. (2014) Pfam: the protein families database, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 222–230, doi: org/10.1093/nar/gkt1223.
 52. Knorre, D.A., Ojovan, S.M., Saprunova, V.B., Sokolov, S.S., Bakeeva, L.E., and Severin, F.F. (2008) Mitochondrial matrix fragmentation as a protection mechanism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **73**, 1254–1259.
 53. Altmann, K., and Westermann, B. (2005) Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5410–5417, doi: org/10.1091/mbc.e05-07-0678.
 54. Pozniakovskiy, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., and Severin, F.F. (2005) Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast, *J. Cell Biol.*, **168**, 257–269, doi: org/10.1083/jcb.200408145.
 55. Sokolov, S., Knorre, D., Smirnova, E., Markova, O., Pozniakovskiy, A., Skulachev, V., and Severin, F. (2006) Ysp2 mediates death of yeast induced by amiodarone or intracellular acidification, *Bioch. Biophys. Acta*, **1757**, 1366–1370, doi: org/10.1016/j.bbabi.2006.07.005.
 56. Francois, I.E.J.A., Bink, A., Vandercappellen, J., Ayscough, K.R., Toulmay, A., Schneiter, R., van Gysegheem, E., van den Mooter, G., Borgers, M., Vandenbosch, D., Coenye, T., Cammue, B.P., and Thevissen, K. (2009) Membrane rafts are involved in intracellular miconazole accumulation in yeast cells, *J. Biol. Chem.*, **284**, 32680–32685, doi: org/10.1074/jbc.M109.014571.
 57. Dos Santos, S.C., and Sa-Correia, I. (2011) A genome-wide screen identifies yeast genes required for protection against or enhanced cytotoxicity of the antimalarial drug quinine, *Mol. Gen. Genom.*, **286**, 333–346, doi: org/10.1007/s00438-011-0649-5.
 58. Murley, A., Yamada, J., Niles, B.J., Toulmay, A., Prinz, W.A., Powers, T., and Nunnari, J. (2017) Sterol transporters at membrane contact sites regulate TORC1 and TORC2 signaling, *J. Cell Biol.*, **216**, 2679–2689, doi: org/10.1083/jcb.201610032.
 59. Lees, N.D., Skaggs, B., Kirsch, D.R., and Bard, M. (1995) Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* – a review, *Lipids*, **30**, 221–226.
 60. Munn, A.L., Heese-Peck, A., Stevenson, B.J., Pichler, H., and Riezman, H. (1999) Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast, *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3943–3957, doi: org/10.1091/mbc.10.11.3943.
 61. Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., et al. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Nature*, **418**, 387–391, doi: org/10.1038/nature00935.
 62. Jakubkova, M., Dzugasova, V., Truban, D., Abelovska, L., Bhatia-Kissova, I., Valachovic, M., Klobucnikova, V., Zeiselova, L., Griac, P., Nosek, J., and Tomaska, L. (2016) Identification of yeast mutants exhibiting altered sensitivity to valinomycin and nigericin demonstrate pleiotropic effects of ionophores on cellular processes, *PLoS One*, **11**, e0164175, doi: org/10.1371/journal.pone.0164175.
 63. Liu, G., Chen, Y., Faergeman, N.J., and Nielsen, J. (2017) Elimination of the last reactions in ergosterol biosynthesis alters the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple stresses, *FEMS Yeast Res.*, **17**, doi: org/10.1093/femsyr/fox063.

64. Contamine, V., and Picard, M. (2000) Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 281–315.
65. Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., and Beney, L. (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution*, **66**, 2961–2968, doi: org/10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x.
66. Guan, X.L., Souza, C.M., Pichler, H., Dewhurst, G., Schaad, O., Kajiwar, K., Wakabayashi, H., Ivanova, T., Castillon, G.A., Piccolis, M., Abe, F., Loewith, R., Funato, K., Wenk, M.R., and Riezman, H. (2009) Functional interactions between sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2083–2095, doi: org/10.1091/mbc.E08-11-1126.
67. Abe, F., and Hiraki, T. (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 743–752, doi: org/10.1016/j.bbame.2008.12.002.
68. Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S.C., Van Dyk, T.K., Ficke, M.B., and Golin, J. (1990) Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*, *Genetics*, **125**, 13–20.
69. Kaur, R., and Bachhawat, A.K. (1999) The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in erg mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology*, **145**, 809–818, doi: org/10.1099/13500872-145-4-809.
70. Desmoucelles, C., Pinson, B., Saint-Marc, C., and Daignan-Fornier, B. (2002) Screening the yeast «disruptome» for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid, *J. Biol. Chem.*, **277**, 27036–27044, doi: org/10.1074/jbc.M111433200.
71. Fleming, J.A., Lightcap, E.S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C.E., and Blackman, R.K. (2002) Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1461–1466, doi: org/10.1073/pnas.032516399.
72. Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A., and Arino, J. (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 43614–43624, doi: org/10.1074/jbc.M403606200.
73. Branco, M.R., Marinho, H.S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2004) Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 6501–6506.
74. Montanes, F.M., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2011) Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors, *Mol. Microbiol.*, **79**, 1008–1023, doi: org/10.1111/j.1365-2958.2010.07502.x.
75. Gazdag, Z., Mate, G., Certik, M., Turmer, K., Virag, E., Pocs, I., and Pesti, M. (2014) Butyl hydroperoxide-induced differing plasma membrane and oxidative stress processes in yeast strains BY4741 and erg5Δ, *J. Basic Microbiol.*, **54**, 50–62, doi: org/10.1002/jobm.201300925.
76. Bard, M., Lees, N.D., Burrows, L.S., and Kleinans, F.W. (1978) Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants, *J. Bacteriol.*, **135**, 1146–1148.
77. Welihinda, A.A., Beavis, A.D., and Trumbly, R.J. (1994) Mutations in *LIS1 (ERG6)* gene confer increased sodium and lithium uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1193**, 107–117, doi: org/10.1016/0005-2736(94)90339-5.
78. Kodedova, M., and Sychrova, H. (2015) Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One*, **10**, e0139306, doi: org/10.1371/journal.pone.0139306.
79. Espenshade, P.J., and Hughes, A.L. (2007) Regulation of sterol synthesis in eukaryotes, *Ann. Rev. Genet.*, **41**, 401–427, doi: org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130315.
80. Aguilera, F., Peinado, R.A., Millan, C., Ortega, J.M., and Mauricio, J.C. (2006) Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains, *Intern. J. Food Microbiol.*, **110**, 34–42, doi: org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.002.
81. Yang, H., Tong, J., Lee, C.W., Ha, S., Eom, S.H., and Im, Y.J. (2015) Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2, *Nat. Commun.*, **6**, 6129, doi: org/10.1038/ncomms7129.
82. Zavrel, M., Hoot, S.J., and White, T.C. (2013) Comparison of sterol import under aerobic and anaerobic conditions in three fungal species, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot. Cell*, **12**, 725–738, doi: org/10.1128/EC.00345-12.
83. Tiwari, R., Koffel, R., and Schneider, R. (2007) An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols and steroids from *S. cerevisiae*, *EMBO J.*, **26**, 5109–5119, doi: org/10.1038/sj.emboj.7601924.
84. Choudhary, V., Darwiche, R., Gfeller, D., Zoete, V., Michielin, O., and Schneider, R. (2014) The caveolin-binding motif of the pathogen-related yeast protein Pry1, a member of the CAP protein superfamily, is required for *in vivo* export of cholesteryl acetate, *J. Lipid Res.*, **55**, 883–894, doi: org/10.1194/jlr.M047126.
85. Korber, M., Klein, I., and Daum, G. (2017) Steryl ester synthesis, storage and hydrolysis: a contribution to sterol homeostasis, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids*, **1862**, 1534–1545, doi: org/10.1016/j.bbalip.2017.09.002.
86. Yang, H., Bard, M., Bruner, D.A., Gleeson, A., Deckelbaum, R.J., Aljinovic, G., Pohl, T.M., Rothstein R., and Sturley, S.L. (1996) Sterol esterification in yeast: a two-gene process, *Science*, **272**, 1353–1356.
87. Yu, C., Kennedy, N.J., Chang, C.C., and Rothblatt, J.A. (1996) Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA: sterol acyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 24157–24163.
88. Zweytick, D., Leitner, E., Kohlwein, S.D., Yu, C., Rothblatt, J., and Daum, G. (2000) Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1075–1082.
89. Koffel, R., and Schneider, R. (2006) Yeh1 constitutes the major steryl ester hydrolase under heme-deficient conditions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukaryot. Cell*, **5**, 1018–1025, doi: org/10.1128/EC.00002-06.
90. Georgiev, A.G., Sullivan, D.P., Kersting, M.C., Dittman, J.S., Beh, C.T., and Menon, A.K. (2011) Osh proteins regulate membrane sterol organization but are not required for sterol movement between the ER and PM, *Traffic*, **12**, 1341–1355, doi: org/10.1111/j.1600-0854.2011.01234.x.
91. Mullner, H., Deutsch, G., Leitner, E., Ingolic, E., and Daum, G. (2005) YEH2/YLR020c encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13321–13328, doi: org/10.1074/jbc.M409914200.
92. Jandrositz, A., Petschnigg, J., Zimmermann, R., Natter, K., Scholze, H., Hermetter, A., Kohlwein, S.D., and Leber, R. (2005) The lipid droplet enzyme Tgl1p hydrolyzes both steryl esters and triglycerides in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1735**, 50–58, doi: org/10.1016/j.bbalip.2005.04.005.
93. Walther, T.C., and Farese, R.V. Jr. (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, **81**, 687–714, doi: org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430.

94. Wang, C.-W. (2015) Lipid droplet dynamics in budding yeast, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 2677–2695, doi: org/10.1007/s00018-015-1903-5.
95. Ueno, K., Nagano, M., Shimizu, S., Toshima, J.Y., and Toshima, J. (2016) Lipid droplet proteins, Lds1p, Lds2p, and Rrt8p, are implicated in membrane protein transport associated with ergosterol, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **475**, 315–321, doi: org/10.1016/j.bbrc.2016.05.099.
96. Tinkelenberg, A.H., Liu, Y., Alcantara, F., Khan, S., Guo, Z., Bard, M., and Sturley, S.L. (2000) Mutations in yeast ARV1 alter intracellular sterol distribution and are complemented by human ARV1, *J. Biol. Chem.*, **275**, 40667–40670, doi: org/10.1074/jbc.C000710200.
97. Tong, F., Billheimer, J., Shechtman, C.F., Liu, Y., Crooke, R., Graham, M., Cohen, D.E., Sturley, S.L., and Rader, D.J. (2010) Decreased expression of ARV1 results in cholesterol retention in the endoplasmic reticulum and abnormal bile acid metabolism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 33632–33641, doi: org/10.1074/jbc.M110.165761.
98. Georgiev, A.G., Johansen, J., Ramanathan, V.D., Sere, Y.Y., Beh, C.T., and Menon, A.K. (2013) Arv1 regulates PM and ER membrane structure and homeostasis but is dispensable for intracellular sterol transport, *Traffic*, **14**, 912–921, doi: org/10.1111/tra.12082.
99. Heuck, A.P., Moe, P.C., and Johnson, B.B. (2010) The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins, *Sub-Cell. Biochem.*, **51**, 551–577, doi: org/10.1007/978-90-481-8622-8_20.

ERGOSTEROL TURNOVER IN YEAST: AN INTERPLAY OF THE BIOSYNTHESIS AND TRANSPORT

S. S. Sokolov^{1*}, N. I. Trushina², F. F. Severin¹, and D. A. Knorre^{1,3}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia;
E-mail: sviatoslav.sokolov@gmail.com*

² *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia*

³ *Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

Received October 1, 2018

Revised November 21, 2018

Accepted November 21, 2018

Sterols are an important component of biological membranes. They determine their physicochemical properties and affect the functioning of membrane proteins. Being insoluble in water, sterols cannot freely diffuse from one cell membrane to another through an aqueous phase. Therefore, the distribution of sterols across membranes of different organelles is extremely uneven. Sterol transport between membranes occurs mainly in a non-vesicular manner and is catalyzed by proteins of Lam and Osh families. In this review, we discuss the consequences of disruption of ergosterol biosynthesis and transport using as an example a model organism – baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Despite the fact that molecular mechanisms of functioning of Lam and Osh proteins are well studied, their biological roles remain unclear. This is because deletions of the individual *LAM* or *OSH* genes display virtually no physiological manifestations. At the same time, it is known that disruption of ergosterol biosynthesis sensitizes cells to a variety of stresses. However, under certain conditions, such as mild osmotic or thermal stress, a decrease in the level of ergosterol leads to an increase in the relative fitness of cells. This suggests that the cells need to possess a mechanism of rapid adjustment of the plasma membrane sterol content. We argue that the biological role of Lam proteins is, in particular, in rapid optimization of sterol composition of cell membranes in a variable environment.

Keywords: lam proteins, membrane, metabolism, Osh proteins, sterols, yeast, *YSP2*