

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТРЕССОРНЫХ ФАКТОРОВ НА СОСТАВ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ И ОСМОЛИТОВ *ASPERGILLUS NIGER*

© 2020 г. Е. А. Януцевич^{а, *}, О. А. Данилова^а, В. М. Терёшина^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ

“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: e.a.ianutsevich@gmail.com

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 17.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

Исследован адаптивный ответ (изменение состава осмолитов и мембранных липидов) мицелиального гриба *Aspergillus niger* на комбинированное действие окислительного и теплового (или осмотического) шоков. Установлено, что окислительный шок не вызывал значительных изменений в составе осмолитов. Впервые показано, что комбинация окислительного шока с другими стрессорами подавляет характерные для них защитные реакции, такие как накопление трегалозы (при тепловом шоке) и полиолов (при осмотическом шоке). В составе мембранных липидов была обнаружена общая закономерность для всех изученных стрессорных факторов – повышение доли небислойных фосфатидных кислот, более выраженное для комбинированных стрессорных воздействий. При этом не происходило существенного изменения степени ненасыщенности мембранных фосфолипидов. Таким образом, изученные комбинированные шоки не приводили к аддитивному ответу и снижали количество осмолитов по сравнению с индивидуальными стрессорами, что ослабляло защитные реакции гриба.

Ключевые слова: *Aspergillus niger*, тепловой шок, осмотический шок, окислительный шок, осмолиты, трегалоза, фосфатидные кислоты

DOI: 10.31857/S0026365620040175

В природных условиях в динамично меняющейся среде организмы подвергаются действию различных стрессорных факторов и их комбинаций. Так, алкалофильный микромицет *Sodiomyces tronii* выделен из почвы литорали содового озера Магади в Кении, где он периодически подвергается комбинированному воздействию осмотического фактора, высокого рН, инсоляции и повышенной температуры (Grum-Grzhimaylo, 2015). Патогенный гриб *Candida albicans* в организме человека подвергается комбинированному воздействию ионного и окислительного шока в почках, а при фагоцитозе – воздействию окислительного шока, активных форм кислорода и азота (Brown et al., 2014). Подробное изучение ответов грибов на отдельные стрессоры позволило подойти к исследованию ответа на комбинированные стрессорные воздействия, что важно как с теоретической точки зрения, так и для разработки способов борьбы с патогенными грибами. Для разработки лекарственных средств особое значение имеют данные о том, что комбинация окислительного шока с тепловым или осмотическим обладает киллерным эффектом в отношении *C. albicans*

(Kaloriti et al., 2012; Brown et al., 2014). Выявлена взаимосвязь между толерантностью грибов к совокупности стрессоров и их потенциальной патогенностью (Gostinčar et al., 2018). Исследование комбинированных воздействий важно и при разработке биотехнологий, так как грибы-продуценты в процессе ферментации могут подвергаться действию различных стрессоров и их комбинаций (Vries de et al., 2017; Orosz et al., 2018).

Ключевым звеном адаптации является защита мембран и макромолекул клетки от стрессорных воздействий, включающая как синтез протекторных осмолитов, так и изменение состава мембранных липидов. Осмолиты представляют собой низкомолекулярные органические соединения, защищающие клетки от воздействия неблагоприятных факторов. Ранее полагали, что осмолиты являются только совместимыми соединениями (compatible solutes), не нарушающими метаболические процессы даже в высоких концентрациях (Brown, Simpson, 1972). По современным представлениям, осмолиты являются не только совместимыми, но и цитопротекторными и нейтра-

лизующими соединениями (Yancey, 2005; Yancey, Siebenaller, 2015). У грибов осмолиты представлены различными полиолами и трегалозой, иногда также аминокислотой пролином (Jennings, 1985), но их функции недостаточно изучены.

Представления об участии мембранных липидов в ответе на стрессорные воздействия были существенно расширены за последнее время. Жидкостно-мозаичная модель строения мембран была значительно усовершенствована и дополнена (Singer, Nicolson, 1972; Nicolson, 2014). Получены новые данные о роли мембранных липидов в восприятии внешних сигналов, регуляции активности ферментов и экспрессии генов, внутриклеточном транспорте белков, эндо- и экзоцитозе, вирулентности (Koosijman et al., 2003; McMahon, Gallop, 2005; Rella et al., 2016; Ernst et al., 2016; Welte, Gould, 2017). Показана гетерогенная структура мембран, включающая разнообразные микродомены: рафты, кавеолы, эйзосомы, участки небислойных липидов, устойчивые к обработке детергентами (Vigh et al., 2005; Douglas, Konopka, 2014; Carquin et al., 2016).

Ранее нами были изучены ответы на индивидуальные стрессорные воздействия: тепловой шок (ТШ), холодовой шок (ХШ), осмотический шок (ОШ) и окислительный шок (ОкШ) (Герёшина и соавт., 2010; Януцевич и соавт., 2016), а также комбинацию ТШ и ОШ у мезофильного мицелиального гриба *A. niger* (Ianutsevich, Tereshina, 2019). Изменения осмолитного состава были различными в зависимости от вида стрессора – при ТШ происходило накопление трегалозы, при ОШ – глицерина, ОкШ не вызывал заметных изменений в составе осмолитов, а комбинация ТШ и ОШ вызывала новый эффект – накопление маннита. При этом в составе мембранных липидов наблюдалась универсальная реакция – повышение доли фосфатидных кислот; а степень насыщенности мембранных фосфолипидов при этом менялась незначительно. Исследование ответов на индивидуальные стрессоры сделало возможным изучение ответа на комбинированные воздействия шоков.

Цель работы – изучить изменения состава осмолитов и мембранных липидов *A. niger* в условиях комбинированного действия ОкШ и ТШ, а также ОкШ и ОШ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе использовали аскомицетный гриб *Aspergillus niger* van Tieghem 1867 ВКМ F-34 (*Aspergillaceae*, *Eurotiomycetes*, *Ascomycota*).

Условия культивирования. Гриб выращивали при оптимальной температуре (29–30°C) в течение 5–6 сут на скошенном сусло-агаре 7°Б. Хранили при

комнатной температуре и пересевали один раз в месяц. Для посева в жидкую среду использовали споровую суспензию, которую вносили до конечной концентрации 5×10^5 – 10^6 спор/мл среды. Выращивание гриба в глубинной культуре проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды Блюменталля–Роземана (Blumenthal, Roseman, 1957) на электромагнитной термостатированной качалке КЭ-12-250Т со скоростью вращения 150 об/мин при оптимальной температуре 29–30°C в течение 24 ч (трофофаза). Для создания теплового шока часть колб переносили, сохраняя те же условия аэрации, в условия с температурой 40–41°C и продолжали культивировать в течение 3 ч. Для создания окислительного шока вносили H_2O_2 (“Sigma”, США) до конечной концентрации в среде 50 мМ и инкубировали 3 ч. Для создания осмотического шока в среду вносили NaCl до конечной концентрации 0.75 М и продолжали инкубирование в течение 3 ч. Контрольные варианты выращивали такое же время при оптимальных условиях. При исследовании комбинированных шоков в качестве вариантов сравнения использовали контроль и отдельные ТШ, ОкШ, ОШ. Комбинированное действие ОкШ и ТШ изучали в варианте (H_2O_2 50 мМ и ТШ), а комбинированное действие ОкШ и ОШ в варианте (H_2O_2 50 мМ и NaCl 0.75 М); инкубирование продолжали также в течение 3 ч.

Анализ мембранных липидов и углеводов цитозоля проводили, как описано ранее (Януцевич и соавт., 2016).

Статистическая обработка. Опыты проводили в трехкратной повторности, на графиках отображены средние значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование состава растворимых углеводов и полиолов цитозоля показало, что в контрольном варианте, выращенном при оптимальных условиях, количество углеводов достигало 9% от сухой массы, маннит был доминирующим компонентом, составляя около 70% от суммы сахаров, доля глицерина достигала 20%, при этом трегалоза и полиолы (эритрит, арабит) присутствовали в минорных количествах (рис. 1). По сравнению с контрольным вариантом, в результате воздействия ОкШ состав углеводов и полиолов практически не изменялся. В результате воздействия ТШ в полтора раза возрастало количество углеводов и полиолов за счет роста уровня трегалозы до 10% от сухой массы, в результате чего она становилась преобладающим компонентом, достигая 70% от суммы сахаров. При этом количество маннита оставалось практически неизменным, а уровень всех полиолов снижался до следовых количеств. ОШ, вызванный 0.75 М NaCl, по сравне-

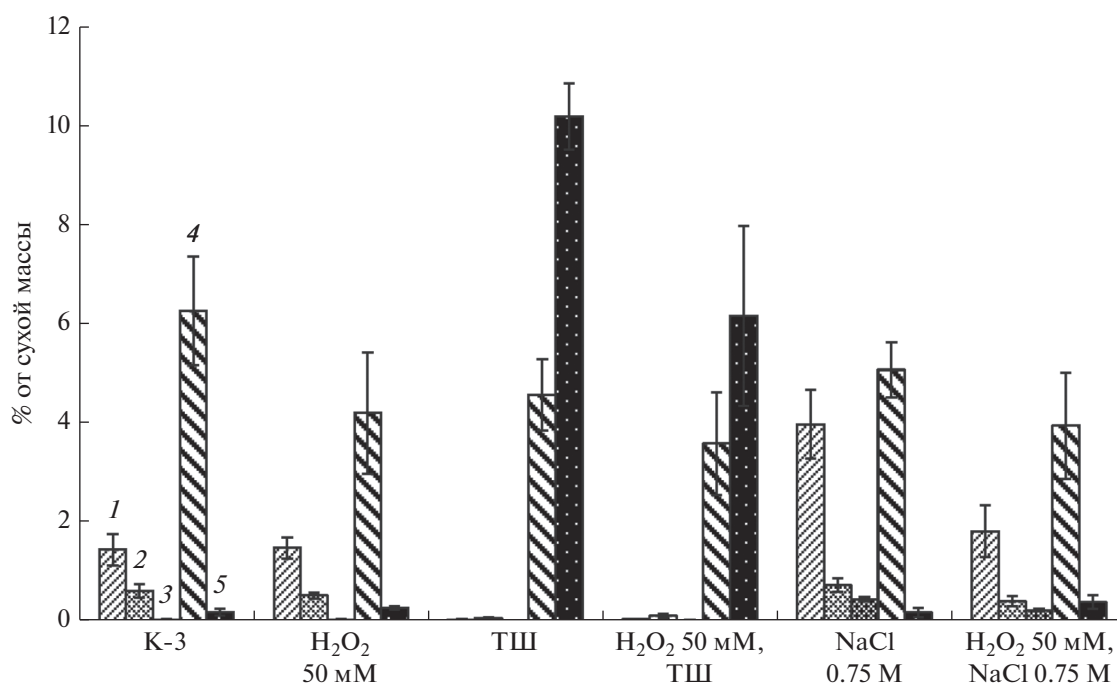


Рис. 1. Состав основных растворимых углеводов и полиолов цитозоля мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия окислительного, теплового и осмотического шоков, а также их комбинаций в течение 3 ч. К – контроль, ТШ – тепловой шок. (1) глицерин; (2) эритрит; (3) арабит; (4) маннит; (5) трегалоза.

нию с контрольным вариантом, приводил к увеличению общего количества полиолов мицелия за счет роста уровня глицерина с 1.5 до 4% от сухой массы и арабита, при этом содержание маннита и эритрита оставалось практически неизменным. Глицерин становился доминирующим компонентом, наряду с маннитом; их доли составляли, соответственно, 40 и 50% от суммы.

Комбинированное действие ОкШ и ТШ, по сравнению с контрольным вариантом, вызывало небольшое снижение уровня маннита, которое не отмечалось в случае отдельно действующих шоков (рис. 1). При этом наблюдался в полтора раза меньший уровень трегалозы, по сравнению с ТШ, а содержание глицерина и эритрита падало до следовых количеств, как при ТШ. Таким образом, комбинация ОкШ и ТШ вызывала ответную реакцию, более характерную для отдельно действующего ТШ, но при этом менее выраженную.

Комбинированное воздействие ОкШ и ОШ, по сравнению с контрольным вариантом, приводило к уменьшению суммарного количества полиолов за счет снижения уровня маннита с 6 до 4% от сухой массы (рис. 1). Количество трегалозы оставалось низким. Однако комбинация ОкШ и ОШ, по сравнению с ОШ, не приводила к росту уровня глицерина. Таким образом, ответ на комбинацию ОкШ и ОШ аналогичен контрольному варианту со сниженным уровнем маннита.

Для исследования роли мембранных липидов в адаптивном ответе гриба на комбинированные воздействия был изучен их состав. При оптимальных условиях мембранные липиды *A. niger* были представлены, в основном, фосфолипидами (до 88% от суммы) и стеринами (Ст) (около 10–11%), тогда как сфинголипиды (СЛ) можно отнести к минорным соединениям (1–2%). В составе мембранных липидов доминировали фосфатидилэтаноламины (ФЭ), фосфатидилхолины (ФХ) и фосфатидные кислоты (ФК), в небольшом количестве присутствовали также кардиолипиды (КЛ), а в минорном количестве – фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозиты (ФИ), лизофосфатидилэтаноламины (ЛФЭ) и лизофосфатидилхолины (ЛФХ) (рис. 2).

В изменении состава мембранных липидов под влиянием стрессоров наблюдалась общая закономерность: во всех вариантах опыта происходило увеличение доли фосфатидных кислот (рис. 2). При этом в вариантах ТШ и комбинации ОкШ и ТШ снижались доли фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов, а в вариантах ОШ, ОкШ и комбинации ОкШ и ОШ снижения долей ФЭ и ФХ не наблюдалось. Относительное содержание сфинголипидов и стерина оставалось практически неизменным во всех вариантах опыта.

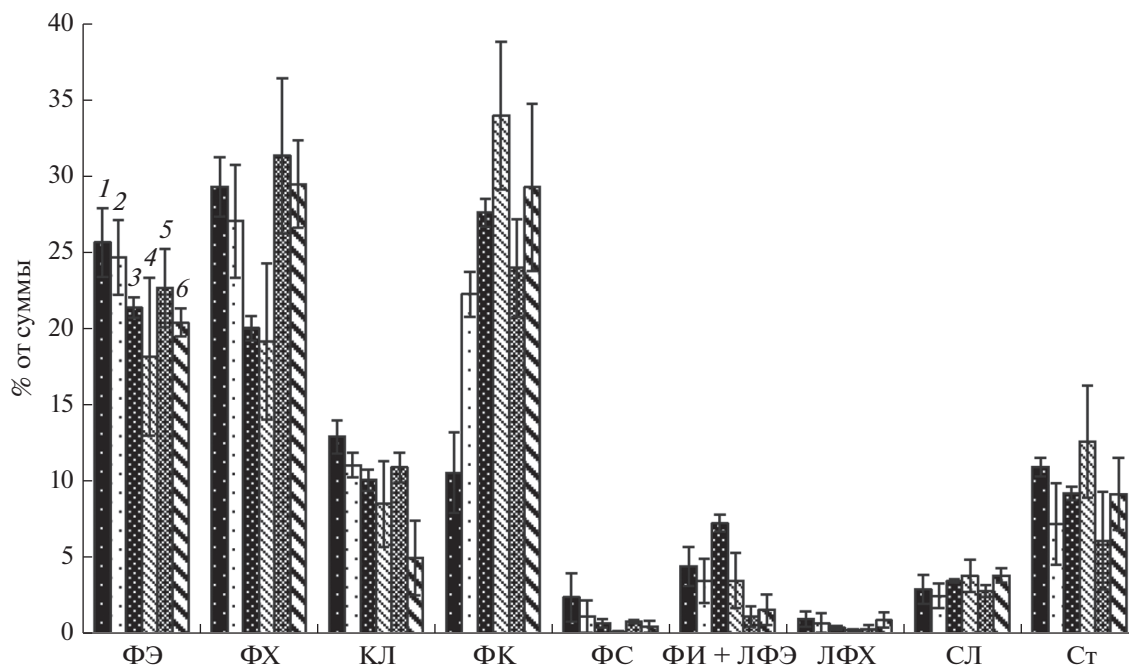


Рис. 2. Состав мембранных липидов мезофильного гриба *A. niger* в условиях действия окислительного, теплового и осмотического шоков, а также их комбинаций в течение 3 ч. ФЭ – фосфатидилэтаноламины; ФХ – фосфатидилхолины; КЛ – кардиолипиды; ФК – фосфатидные кислоты; ФС – фосфатидилсерин; ФИ – фосфатидинозиты; ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламины; ЛФХ – лизофосфатидилхолины; СЛ – сфинголипиды; Ст – стерин. (1) – контрольный вариант; (2) – H_2O_2 , 50 мМ; (3) – ТШ; (4) – H_2O_2 , 50 мМ + ТШ; (5) – NaCl 0.75 М; (6) – H_2O_2 50 мМ + NaCl 0.75 М.

Для исследования степени ненасыщенности мембранных липидов была препаративно выделена фракция полярных липидов и изучен ее жирнокислотный состав. Доминирующими жирными кислотами во всех фосфолипидах были пальмитиновая ($C_{16:0}$), олеиновая ($C_{18:1n9c}$) и линолевая ($C_{18:2n6c}$). Во всех вариантах опыта не было обнаружено значимого изменения степени нена-

сыщенности мембранных фосфолипидов, по сравнению с контрольным вариантом (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ответ грибов на любое стрессорное воздействие является комплексным и приводит к глубокой перестройке метаболизма. Тепловой шок сопровождается синтезом белков теплового шока и ферментов антиоксидантной защиты, аккумуляцией протекторного осмолита трегалозы, изменениями в составе мембранных липидов и состоянии воды, в результате чего организм приобретает термоустойчивость (Piper, 1993; Richter et al., 2010). Трегалоза является не только резервным источником углерода, но и многофункциональным цитопротектором, в особенности при тепловом шоке. Накопление трегалозы в условиях ТШ было показано для мезофильных грибов и дрожжей (Hottiger et al., 1994; Терёшина и соавт., 2010), а термофильные грибы содержат большое количество трегалозы в мицелии при оптимальной для них температуре роста (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016). Трегалоза стабилизирует мембрану, образуя многочисленные водородные связи головками фосфолипидов бислоя, предотвращает агрегацию денатурировавших в результате ТШ белков, т.е. обладает шапероноподобными

Таблица 1. Степень ненасыщенности полярных липидов *A. niger* при различных шоковых воздействиях и их комбинациях

Варианты опыта	Степень ненасыщенности
К-3	1.29 ± 0.07
H_2O_2 50 мМ	1.33 ± 0.04
ТШ	1.21 ± 0.03
H_2O_2 50 мМ, ТШ	1.22 ± 0.01
NaCl 0.75 М	1.27 ± 0.05
H_2O_2 50 мМ, NaCl 0.75 М	1.29 ± 0.06

свойствами (Singer, Lindquist, 1998; Sum et al., 2003). Предполагается, что накопление трегалозы в условиях ТШ может быть связано как с пониженной активностью трегалазы, так и с частичной деградацией маннита до глюкозо-6-фосфата (Liu et al., 2009).

Интенсивное изучение механизмов осмоадаптации проводилось в основном на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann et al., 2007). Воздействие NaCl вызывало как катионный, так и осмотический стресс у грибов и приводило к быстрой потере воды, уменьшению размеров клеток и снижению тургорного давления (Brown et al., 2014). Адаптация грибов к ОШ опосредована активацией HOG-пути, включающего фосфорилирование митоген активируемой протеинкиназы HOG1, которая вызывает экспрессию генов, кодирующих ферменты синтеза и обмена глицерина, при этом происходит переключение пути гликолиза с роста биомассы на синтез глицерина (Nikolaou et al., 2009; Petelenz-Kurdziel et al., 2013). В оптимальных условиях роста глицерин участвует в поддержании редокс-баланса, при этом его избыток выводится через канал в цитоплазматической мембране, образуемый белками акваглицеропоринами и осуществляющий контроль за транспортом воды и глицерина (Liu et al., 2016). В условиях ОШ у галофильных дрожжей *Hortaea werneckii* и *Wallemia ichthyophaga*, а также у полиэкстремофильных дрожжей *Aureobasidium pullulans* и *Aureobasidium subglaciale* в цитозоле накапливается глицерин (Kogej et al., 2007; Zajc et al., 2014; Turk, Gostinčar, 2018), а у галотолерантного мицелиального гриба *Fusarium* sp. – арабит (Смолянюк и соавт., 2013). Было показано, что как у термофильного мицелиального гриба *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* (Jepsen, Jensen, 2004), так и у дрожжей *S. cerevisiae* (Hounsa et al., 1998) наблюдается накопление трегалозы при осмотическом стрессе.

Действие окислительного шока сопровождается экспрессией генов компонентов антиоксидантной защиты, обеспечивающих детоксикацию (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза), окислительно-восстановительный гомеостаз и репарацию (глутатионредуктаза и тиоредоксин) (Alvarez-Peral et al., 2002; Morano et al., 2012; Brown et al., 2014; Nishimoto et al., 2016; Gostimskaya, Grant, 2016). Обнаружено, что маннит при ОкШ выполняет антиоксидантную функцию (Patel, Williamson, 2016), его цикл служит источником восстановительных эквивалентов НАДФН в клетке (Hult, Gatenbeck, 1978). Получены данные о том, что HOG1 MAPK путь также участвует в приобретении устойчивости к перекиси водорода (Brown et al., 2014). Проведенные ранее исследования влияния перекиси водорода (10–20 мМ) не показали изменений в составе растворимых углеводов цитозоля у *A. niger*, тогда

как добавление 50 мМ H₂O₂ приводило к небольшому снижению общего содержания углеводов и полиолов, не изменяя при этом их соотношения (Януцевич и соавт., 2016).

В настоящем исследовании наше внимание было сфокусировано на таких компонентах защиты мембран и макромолекул, как осмолитная система и изменения состава мембранных липидов. Проведенные ранее исследования ответа мезофильного гриба *A. niger* на отдельные стрессорные воздействия (ТШ, ОШ, ОкШ) (Терёшина и соавт., 2010; Януцевич и соавт., 2016), позволили поставить новую задачу – изучить ответ *A. niger* на комбинированное (одновременное) действие ОкШ и ТШ, а также ОкШ и ОШ. Ответные реакции на отдельные стрессоры были специфичны по изменению состава растворимых углеводов и полиолов цитозоля: при ТШ накапливалась трегалоза, при ОШ – глицерин, а ОкШ практически не менял состав углеводов и полиолов. Можно было предположить, что комбинированные воздействия ОкШ с ТШ или ОШ приведут либо к простому аддитивному ответу, либо к возникновению какого-либо нового эффекта.

Было установлено, что комбинированное действие ОкШ и ТШ вызывало ответную реакцию, более характерную для ТШ, а именно, накопление трегалозы в мицелии гриба, при этом количества глицерина и эритрита снижались до следов. Однако уровень трегалозы при этом был в полтора раза ниже, чем при индивидуальном ТШ. Хотя по отдельности ОкШ и ТШ не влияли на уровень маннита, их совместное действие приводило к небольшому снижению количества этого полиола по сравнению с контрольным вариантом.

Комбинированное действие ОкШ и ОШ подавляло характерное для ОШ накопление глицерина и арабита. Несмотря на то, что индивидуальные ОкШ и ОШ не приводили к снижению уровня маннита, их комбинация вызывала уменьшение его количества по сравнению с контрольным вариантом. Уровень трегалозы при этом оставался низким. Таким образом, оба варианта комбинированных шоков приводили к общему эффекту – снижению количества протекторных соединений. В литературе не обнаружено данных о том, как окислительный шок воздействует на синтез углеводов и полиолов, однако известно, что HOG1 MAPK участвует в приобретении резистентности к перекиси водорода (Brown et al., 2014), что позволяет предположить негативное влияние конкуренции регуляторных механизмов. Полученные данные также позволяют предположить, что одной из причин гибели клеток *S. albicans* под действием комбинации окислительного и теплового или осмотического шоков (Kaloriti et al., 2012) может быть снижение уровня протекторных соединений, что может

приводить к ослаблению защитных реакций и негативному влиянию на рост гриба.

В ранее проведенных исследованиях было показано, что под действием отдельных видов стрессорных воздействий на *A. niger* наблюдалась общая закономерность, а именно увеличение доли фосфатидных кислот на фоне снижения долей ФХ и ФЭ (Терёшина и соавт., 2010, 2011; Януцевич и соавт., 2016). В настоящем исследовании в составе мембранных липидов наблюдалась такая же общая закономерность во всех вариантах опыта: в ответ на отдельные ОкШ, ТШ и ОШ, а также их комбинации, происходило повышение доли небислойных ФК, по сравнению с контрольным вариантом, на фоне снижения долей других фосфолипидов. При этом снижение доли бислойных ФХ было выражено сильнее, чем небислойных ФЭ при ОкШ и комбинации ОкШ и ТШ. Увеличение доли небислойных липидов приводит к формированию участков мембран в гексагональной фазе (L₆), при этом некоторые ацильные цепи фосфолипидов становятся направленными “внутри” клетки, что облегчает связывание с ними G-белков, фосфолипаз и др. (Vigh et al., 2005).

От состава ацильных цепей зависит степень “бислойности” липидной молекулы, ее форма. Так, например, в отсутствие бислойного ФХ, в клетках дрожжей происходила перестройка молекул ФЭ, в результате чего диеновые жирные кислоты (ЖК) замещались на моноеновые, а также снижалась средняя длина цепи ЖК, что придавало молекуле ФЭ более “бислойную” структуру (Boumann et al., 2006).

Изменение соотношения бислойных и небислойных липидов меняет профиль латерального давления в мембране, влияя на структуру и стабильность мембранных белков, их конформацию и/или функции (Renne, de Kroon, 2018). Было выдвинуто предположение о роли небислойных липидов в связывании периферических мембранных белков и влиянии на стабильность трансмембранных белковых комплексов путем изменения профиля латерального давления (van den Brink-van der Laan et al., 2004). Интересно, что у термофильных грибов при оптимальных условиях сохраняется высокий уровень небислойных ФК на протяжении всего времени роста (Ianutsevich et al., 2016). С одной стороны, ФК являются центральным метаболитом синтеза липидов, а увеличение их количества указывает на деградацию фосфолипидов в условиях ТШ в результате активизации фосфолипазы D (Rudge et al., 1998). С другой стороны, ФК являются биологически активными соединениями с сигнальной и регуляторной функцией (Wang et al., 2006; Shin, Loewen, 2011; Jang et al., 2012; Putta et al., 2016). Однако тот факт, что ФК становятся доминирующими фосфолипидами в условиях действия как индивидуальных, так и комбинаций

стрессоров, а также их преобладание в составе мембранных липидов у термофильных грибов указывает на их структурную функцию. Накопление ФК может быть связано с особой ролью этого “небислойного” фосфолипида в условиях шоков, например, с образованием везикул (Cazzolli et al., 2006) или участием в процессах эндо- и экзоцитоза, что обусловлено способностью ФК образовывать микродомены и изгибы мембран (Kooijman et al., 2003; McMahon, Gallop, 2005; Kooijman, Burger, 2009).

Еще одним способом стабилизации мембран в условиях воздействия стрессоров является изменения в составе ацильных цепей жирных кислот мембранных фосфолипидов, что влияет на вязкость липидного бислоя. В наших предыдущих работах было показано, что ТШ, ОШ, а также их комбинации не приводили к снижению степени ненасыщенности основных мембранных фосфолипидов (Терёшина и соавт., 2011; Януцевич и соавт., 2016; Ianutsevich, Tereshina, 2019). Аналогичные результаты были получены и в настоящем исследовании – ни в одном из вариантов опыта не наблюдалось значительных изменений степени ненасыщенности полярных липидов. Эти данные позволяют предположить, что данный защитный механизм не участвует в адаптации к изученным стрессорным воздействиям.

Таким образом, проведенное исследование показало, что при комбинированных воздействиях окислительного и теплового, а также окислительного и осмотического шоков, в составе осмолитов происходят изменения, характерные для ответов на отдельные ТШ и ОШ соответственно. Отмеченные эффекты являются менее выраженными, чем при отдельных шоковых воздействиях, т.е. окислительный шок оказывает негативное воздействие на адаптационные реакции. В составе мембранных липидов во всех вариантах опыта обнаружена общая закономерность – увеличение доли небислойных фосфатидных кислот. Полученные данные свидетельствуют о неаддитивности ответа на комбинированные воздействия, что указывает на интерференцию путей регуляции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке проекта РФФИ № 18-34-00230 “мол_а”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались животные или люди.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Смолянюк Е.В., Биланенко Е.Н., Терёшина В.М., Качалкин А.В., Камзолкина О.В. Влияние концентрации хлористого натрия в среде на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля гриба *Fusarium* sp. // Микробиология. 2013. V. 82. P. 595–604. <https://doi.org/10.7868/S0026365613050121>
- Smolyanyuk E.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M., Kachalkin A.V., Kamzolkina O.V. Effect of sodium chloride concentration in the medium on the composition of the membrane lipids and carbohydrates in the cytosol of the fungus *Fusarium* sp. // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 600–608. <https://doi.org/10.1134/S0026261713050111>
- Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р., Феофилова Е.П. Состав мембранных липидов и углеводов цитозоля в условиях теплового шока у *Aspergillus niger* // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 45–51.
- Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R., Feofilova E.P. Membrane lipid and cytosol carbohydrate composition in *Aspergillus niger* under heat shock // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 40–46. <https://doi.org/10.1134/S0026261710010066>
- Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р. Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // Микробиология. 2011. V. 80. P. 447–453.
- Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R. The effect of different heat influences on composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in mycelial fungi // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 455–460. <https://doi.org/10.1134/S0026261711040199>
- Януцевич Е.А., Данилова О.А., Гроза Н.В., Терёшина В.М. Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического, окислительного и холодного воздействий // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 283–292. <https://doi.org/10.7868/S0026365616030174>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Tereshina V.M. Membrane lipids and cytosol carbohydrates in *Aspergillus niger* under osmotic, oxidative, and cold impact // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 302–310. <https://doi.org/10.1134/S0026261716030152>
- Alvarez-Peral F.J., Argüelles J.-C., Zaragoza O., Pedreno Y. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans* // Microbiology (UK). 2002. V. 148. P. 2599–2606. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2599>
- Blumenthal H.J., Roseman S. Quantitative estimation of chitin in fungi // J. Bacteriol. 1957. V. 74. P. 222–224.
- Boumann H.A., Gubbens J., Koorengel M.C., Oh C.-S., Martin C.E., Heck A.J.R., Paton-Vogt J., Henry S.A., de Kruijff B., de Kroon A.I.P.M. Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote // Mol. Biol. Cell. 2006. V. 17. P. 1006–1017. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0344>
- van den Brink-van der Laan E., Killian J.A., de Kruijff B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile // Biochim. Biophys. Acta – Biomembr. 2004. V. 1666. P. 275–288. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.010>
- Brown A.D., Simpson J.R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols // J. Gen. Microbiol. 1972. V. 72. P. 589–591. <https://doi.org/10.1099/00221287-72-3-589>
- Brown A.J.P., Budge S., Kaloriti D., Tillmann A., Jacobsen M.D., Yin Z., Ene I.V., Bohovych I., Sandai D., Kastora S., Potrykus J., Ballou E.R., Childers D.S., Shahana S., Leach M.D. Stress adaptation in a pathogenic fungus // J. Exp. Biol. 2014. V. 217. P. 144–155. <https://doi.org/10.1242/jeb.088930>
- Carquin M., D'Auria L., Pollet H., Bongarzone E.R., Tyteca D. Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains // Prog. Lipid Res. 2016. V. 62. P. 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.004>
- Cazzolli R., Shemon A.N., Fang M.Q., Hughes W.E. Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid // IUBMB Life. 2006. V. 58. P. 457–461. <https://doi.org/10.1080/15216540600871142>
- Douglas L.M., Konopka J.B. Fungal membrane organization: The eisosome concept // Annu. Rev. Microbiol. 2014. V. 68. P. 377–393. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103507>
- Ernst R., Ejsing C.S., Antonny B. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 4776–4791. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.013>
- Gostimskaya I., Grant C.M. Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system // Free Radic. Biol. Med. 2016. V. 94. P. 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.015>
- Gostinčar C., Zajc J., Lenassi M., Plemenitaš A., de Hoog S., Al-Hatmi A.M.S., Gunde-Cimerman N. Fungi between extremotolerance and opportunistic pathogenicity on humans // Fungal Divers. 2018. V. 93. P. 195–213. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0414-8>
- Grum-Grzhimaylo A.A. On the biology and evolution of fungi from soda soils // PhD Thesis. 2015. <https://edepot.wur.nl/354152>.
- Hohmann S., Krantz M., Nordlander B. Yeast osmoregulation // Methods Enzymol. 2007. V. 428. P. 29–45. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)28002-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)28002-4)
- Hottiger T., De Virgilio C., Hall M.N., Boller T., Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro* // Eur. J. Biochem. 1994. V. 219. P. 187–193. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19929.x>
- Hounsa C.-G., Brandt E.V., Thevelein J., Hohmann S., Prior B.A. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress // Microbiology (UK). 1998. V. 144. P. 671–680. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-671>

- Hult K., Gatenbeck S. Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternata* // Eur. J. Biochem. 1978. V. 88. P. 607–612.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12487.x>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // Microbiology (UK). 2016. V. 162. P. 989–999.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000279>
- Ianutsevich E.A., Tereshina V.M. Combinatorial impact of osmotic and heat shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger* // Microbiology (UK). 2019. V. 165. P. 554–562.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000796>
- Jang J.H., Lee C.S., Hwang D., Ryu S.H. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners // Prog. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 71–81.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.003>
- Jennings D.H. Polyol metabolism in fungi // Advances in Microbial Physiology / Eds. Rose A.H., Tempest D.W. London: Academic Press, 1985. P. 149–193.
[https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60292-1)
- Jepsen H.F., Jensen B. Accumulation of trehalose in the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* in response to heat or salt stress // Soil Biol. Biochem. 2004. V. 36. P. 1669–1674.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.010>
- Kaloriti D., Tillmann A., Cook E., Jacobsen M., You T., Leonard M., Ames L., Barahona M., Chandrasekaran K., Coghill G., Goodman D., Gow N.A.R., Grebogi C., Ho H.-L., Ingram P., McDonagh A., de Moura A.P.S., Wei Pang, Putnam M., Radmaneshfar E., Romano M.C., Silk D., Stark J., Stumpf M., Thiel M., Thorne T., Usher J., Zhikang Yin, Haynes K. Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species // Med. Mycol. 2012. V. 50. P. 699–709.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2012.672770>
- Kogej T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A.A., Galinski E.A., Gunde-Cimerman N. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization // Microbiology (UK). 2007. V. 153. P. 4261–4273.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>
- Kooijman E.E., Chupin V., de Kruijff B., Burger K.N.J. Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid // Traffic. 2003. V. 4. P. 162–174.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x>
- Kooijman E.E., Burger K.N.J. Biophysics and function of phosphatidic acid: A molecular perspective // Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids. 2009. V. 1791. P. 881–888.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.04.001>
- Liu K., Tsujimoto H., Huang Y., Rasgon J.L., Agre P. Aquaglyceroporin function in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* // Biol. Cell. 2016. V. 108. P. 294–305.
<https://doi.org/10.1111/boc.201600030>
- Liu Q., Ying S.H., Feng M.G., Jiang X.H. Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress // Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 2009. V. 95. P. 65–75.
<https://doi.org/10.1007/s10482-008-9288-1>
- McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling // Nature. 2005. V. 438. P. 590–596.
<https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Morano K.A., Grant C.M., Moyer-Rowley W.S. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2012. V. 190. P. 1157–1195.
<https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Nicolson G.L. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // Biochim. Biophys. Acta – Biomembr. 2014. V. 1838. P. 1451–1466.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>
- Nikolaou E., Agriafioti I., Stumpf M., Quinn J., Stansfield I., Brown A.J. Phylogenetic diversity of stress signaling pathways in fungi // BMC Evol. Biol. 2009. V. 9. P. 44.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-44>
- Nishimoto T., Watanabe T., Furuta M., Kataoka M., Kishida M. Roles of catalase and trehalose in the protection from hydrogen peroxide toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* // Biocontrol Sci. 2016. V. 21. P. 179–182.
<https://doi.org/10.4265/bio.21.179>
- Orosz E., Van De Wiele N., Emri T., Zhou M., Robert V., De Vries R.P., Pócsi I. Fungal Stress Database (FSD) – A repository of fungal stress physiological data // Database. 2018. V. 2018. P. 1–6.
<https://doi.org/10.1093/database/bay009>
- Patel T.K., Williamson J.D. Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 486–497.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.006>
- Petelenz-Kurdziel E., Kuehn C., Nordlander B., Klein D., Hong K.-K., Jacobson T., Dahl P., Schaber J., Nielsen J., Hohmann S., Klipp E. Quantitative analysis of glycerol accumulation, glycolysis and growth under hyper osmotic stress // PLoS Comput. Biol. 2013. V. 9. P. e1003084.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003084>
- Piper P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol. Rev. 1993. V. 11. P. 339–355.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00005.x>
- Putta P., Rankenberg J., Korver R.A., van Wijk R., Munnik T., Testerink C., Kooijman E.E. Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties // Biochim. Biophys. Acta – Biomembr. 2016. V. 1858. P. 2709–2716.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.014>
- Rella A., Farnoud A.M., Del Poeta M. Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence // Prog. Lipid Res. 2016. V. 61. P. 63–72.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.003>
- Renne M.F., de Kroon A.I.P.M. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes // FEBS Lett. 2018. V. 592. P. 1330–1345.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12944>
- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death // Mol. Cell. 2010. V. 40. P. 253–266.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>

- Rudge S.A., Morris A.J., Engebrecht J. Relocalization of phospholipase d activity mediates membrane formation during meiosis // *J. Cell Biol.* 1998. V. 140. P. 81–90. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.1.81>
- Shin J.J., Loewen C.J. Putting the pH into phosphatidic acid signaling // *BMC Biol.* 2011. V. 9. P. 85. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-85>
- Singer M.A., Lindquist S. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo* // *Mol. Cell.* 1998. V. 1. P. 639–648. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80064-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80064-7)
- Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // *Science.* 1972. V. 175. P. 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Sum A.K., Faller R., de Pablo J.J. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 2830–2844. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74706-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74706-7)
- Turk M., Gostinčar C. Glycerol metabolism genes in *Aureobasidium pullulans* and *Aureobasidium subglaciale* // *Fungal Biol.* 2018. V. 122. P. 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.005>
- Vigh L., Escribá P.V., Sonnleitner A., Sonnleitner M., Piotto S., Maresca B., Horváth I., Harwood J.L. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function // *Prog. Lipid Res.* 2005. V. 44. P. 303–344. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.08.001>
- de Vries R.P., Riley R., Wiebenga A., Aguilar-Osorio G., Amillis S., Uchima C.A., Anderluh G., Asadollahi M., Askin M., Barry K., Battaglia E., Bayram Ö., Benocci T., Braus-Stromeyer S.A., Caldana C. et al. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus* // *Genome Biol.* 2017. V. 18. Art. 28. P. 1–45. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
- Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R. Signaling functions of phosphatidic acid // *Prog. Lipid Res.* 2006. V. 45. P. 250–278. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.005>
- Welte M.A., Gould A.P. Lipid droplet functions beyond energy storage // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids.* 2017. V. 1862. P. 1260–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006>
- Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>
- Yancey P.H., Siebenaller J.F. Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective micro-molecules and their roles in marine organisms // *J. Exp. Biol.* 2015. V. 218. P. 1880–1896. <https://doi.org/10.1242/jeb.114355>
- Yanutsevich E.A., Memorskaya A.S., Groza N.V., Kochkina G.A., Tereshina V.M. Heat shock response in the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* // *Microbiology (Moscow).* 2014. V. 83. P. 498–504. <https://doi.org/10.1134/S0026261714050282>
- Zajc J., Kogej T., Galinski E.A., Ramos J., Gunde-Cimerman N. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 247–256. <https://doi.org/10.1128/AEM.02702-13>

Combinatorial Action of Different Stress Factors on the Composition of Membrane Lipids and Osmolytes of *Aspergillus niger*

E. A. Ianutsevich¹, *, O. A. Danilova¹, and V. M. Tereshina¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: e.a.ianutsevich@gmail.com

Received March 12, 2020; revised March 17, 2020; accepted March 27, 2020

Abstract—Adaptive response (changes in the composition of osmolytes and membrane lipids) of the mycelial fungus *Aspergillus niger* to combinatorial action of oxidative and heat (or osmotic) shocks was studied. Oxidative shock was found to cause no significant changes in the composition of osmolytes. A combination of oxidative shock with other stressors was shown to suppress their adaptive responses, such as accumulation of trehalose (during heat shock) and polyols (during osmotic shock). A common pattern of the changes in membrane lipids observed for all the studied stress factors was an increase in the proportion of non-bilayer phosphatidic acids, which was more pronounced in the case of combinatorial stress effects. No significant changes in the degree of unsaturation of membrane phospholipids were observed. Thus, the studied combinatorial shocks did not result in an additive response and caused a decrease in the amount of osmolytes compared with individual stressors, which weakened the adaptive response of the fungus.

Keywords: *Aspergillus niger*, heat shock, osmotic shock, oxidative shock, osmolytes, trehalose, phosphatidic acids