

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LYPOLYTICA* ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ

***Е.С. ПЕТРАКОВ¹, М.А. ГУСЕВА², Е.Ю. ЭПОВА², Ю.К. КУДЫКИНА²,
А.Н. ОВЧАРОВА¹, А.Б. ШЕВЕЛЕВ², А.С. УШАКОВ¹***

*¹ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных,
г. Боровск, Россия*

*²Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова,
г. Москва, Россия*

Введение. Бурное развитие методов получения и применения наночастиц в последние годы привело к возникновению проблемы биобезопасности используемых наноматериалов. Появилось целое направление – нанотоксикология, нацеленное на изучение взаимодействия наноструктур с биологическими системами, в частности, с целью выявления связи между физическими и химическими свойствами наноматериалов (размер, форма, свойства поверхности, адгезивность) и индукцией токсического ответа в биологических структурах. Токсичность наносистем включает в себя физиологические, физико–химические и молекулярные аспекты. В экспериментах на позвоночных

животных и членистоногих показано, что наночастицы могут проникать в неизменном виде через гематоэнцефалический, плацентарный барьеры, кожу, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, накапливаться в костном мозге, центральной и периферической нервной системах, органах желудочно-кишечного тракта. Для них характерен длительный период полувыведения (Lopes, 2013).

Имеющиеся данные о токсикологических характеристиках наночастиц позволяют утверждать, что их поступление в организм может вызывать как острую, так и отложенную токсичность, причем механизм интоксикации часто остается неясным. Степень выраженности этого эффекта зависит от дозы (Donaldson, Stone, 2003; Elder, 2007).

Токсичность наночастиц определяется не только их размером, но и формой. Наночастицы разветвленной и веретенообразной формы обладают более высокой цитотоксичностью по сравнению с частицами сферической формы. Развитие нанотехнологий, пророст числа коммерческих продуктов на основе наночастиц сопровождается существенным отставанием в разработке регламентов безопасности их производства и применения. В этой области имеются трудности следующего характера:

- неоднозначность определения дозировки наночастиц;
- отсутствие данных о качественной идентичности проявлений токсичности наночастиц разной формы и размеров;
- низкая воспроизводимость результатов, полученных в разных лабораториях;
- сложность экстраполяции данных, полученных *in vitro*;
- необходимость оснащения лабораторий принципиально новым дорогостоящим и сложным оборудованием для проведения большинства стандартных тестов.

Решение задачи по созданию универсальной концепции токсичности наночастиц в значительной мере сдерживается отсутствием достаточно быстрых, общедоступных и воспроизводимых методов токсикологической экспертизы, пригодных для решения задач нанотоксикологии. Предложенный в ряде работ (Хрульнова, 2010; Manukhov, 2011) метод оценки токсичности наночастиц с помощью бактериальных культур, обладающих способностью к хемилюминесценции за счёт собственных (морские психрофильные бактерии рода *Aliivibrio* наземные патогенные бактерии рода *Photobacterium*) или рекомбинантных штаммов *E. coli* с искусственно введенными генами люцифераз (*lux*-опероны), выгодно отличается от классических токсикологических методов высокой чувствительностью и скоростью анализа, шириной спектра испытываемых агентов, простотой требований к аппаратному обеспечению. Однако работа с этими психрофильными объектами требует высокого уровня микробиологической культуры. Для наращивания препаратов бактерий, используемых для биолоуминесцентного анализа, требуется несколько суток, и они не подлежат длительному хранению. Кроме того, они обладают чрезмерной чувствительностью ко многим токсикантам, что требует предварительного выделения нужной фракции наночастиц из исследуемого препарата.

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* в отличие от *E. coli* и, тем более, – от бактерий родов *Aliivibrio* и *Photobacterium*, обладают исключительно высоким уровнем устойчивости к любым стресс-факторам химической и иной природы. В работе (Гусева, 2011) показано, что адаптация *Y. lipolytica* к неблагоприятным условиям среды связана с набуханием митохондрий и резкой интенсификацией работы дыхательной цепи. Таким образом, воздействие на клетки *Y. lipolytica* токсикантов любой природы, включая наночастицы, вызывает у них типовую реакцию, проявляющуюся в увеличении выброса активных форм кислорода и пропорциональному росту активности ферментных систем их инактивации (супероксиддисмутаза и др.). В присутствии люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион или гидразид-3-аминофталево́й кислоты) этот процесс сопровождается выделением лучистой энергии широкого спектра (Mueller, Arnhold, 1995), которая может быть аккумулирована цветным флуоресцентным белком и детектирована в качестве сигнала биолоуминесценции.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы подтвердить сформулированную авторами оригинальную гипотезу о возрастании уровня люминесценции рекомбинантного белка EYFP при воздействии наночастиц на клетки *Y. lipolytica* и предложить методику получения рабочего элемента биосенсора для биолоуминесцентной детекции наночастиц на основе культуры этих дрожжей.

Материал и методы.

Препараты наночастиц. В качестве испытываемых объектов служили суспензии нанопорошков оксида меди размер 25–30 нм, меди размером 25–30 нм и кобальта 28 нм, которые были получены в Московском институте стали и сплавов. Препараты имели произвольную форму частиц, высо-

кую удельную поверхность (до 25 м²/г). Суспензию готовили на стерильном физиологическом растворе, забуференном 0.1 М Na-ацетатным буфером pH 5.0, согласно ТУ 931800-4270760-96 в ультразвуковой ванне (модель ПСБ-5735-5). Изучалось токсическое действие нанопорошков в интервале концентраций 0,01 до 10 мг/мл.

Биологические объекты. В работе использован штамм *Y. lipolytica* PO1f (MatA, leu2-270, ura3-302, хрг2-322, ахр-2), полученный из коллекции типовых штаммов CIRM-Levures (Франция), где он депонирован под номером CLIB-724. Фенотипическими особенностями этого штамма (отличающими его от дикого типа) является неспособность расти на средах, не содержащих лейцин и урацил, а также способность утилизировать сахарозу.

Среды. Поддержание штаммов и отбор трансформантов проводили на синтетической агаризованной среде YNB следующего состава (г/л): MgSO₄ – 0,5, (NH₄)₂SO₄ – 0,3, KH₂PO₄ – 2, K₂HPO₄ – 0,5, NaCl – 0,1, CaCl₂ – 0,05, глюкоза – 20, агар – 20, KOH или H₂SO₄ – по показаниям pH-метра, 2.5М трис-сукцинат (pH 5.0) – 50 мМ. В среде присутствовали также добавки:

микроэлементы (мг/мл): KI – 0.2; CuSO₄×5H₂O – 0.08; MnSO₄ 0.08; FeCl₃×6H₂O – 0.4; Na₂MoO₄×2H₂O – 0.4; ZnSO₄×7H₂O – 0.08; H₃BO₃ – 1;

витамины (мг/мл): биотин – 0.00002; фолиевая кислота – 0.02; пантотенат кальция – 0.6; инозит – 3; никотиновая кислота – 0.6; пара-аминобензойная кислота – 0.3; пиридоксин-HCl – 0.6; рибофлавин – 0.3; тиамин-HCl – 0.15;

аминокислот и нуклеотидов (мкг/мл): лейцин – 60, урацил – 40. Клетки выращивали в течение 20–30 ч при +28°C.

Физиологические эксперименты. Определение биолуминесцентной активности рекомбинантных штаммов проводили на жидких средах следующего состава (pH доводили внесением 1 М серной кислоты или 1 М KOH до 5.0):

I – YNB с 1% глицерином + лейцин;

II – YNB с 1% глицерином + 1 М NaCl + лейцин;

III – YNB с 2% глюкозой и 2% протеазным пептоном (Merck);

IV – 2% глюкоза, 1% дрожжевого экстракта (Panreac) и 2% пептон.

Инокулят для проведения основного физиологического эксперимента получали на Среде III культивированием клеток в течение 24 ч. Для проведения основного физиологического эксперимента свежую среду в объеме 5 мл засеивали с начальной плотностью инокулята 10³ кое/мл, после чего выращивали в течение 16 ч при +28°C при интенсивной аэрации.

Получение интегративных репортёрных генетических конструкций на основе гена EYFP. Используемый в составе вектора pQUHT промотор HP4d, синтезированный согласно работе (Madzak, 2000), был любезно предоставлен Т.В.Юзбашевым и И.А.Лаптевым в составе вектора pUC19-HP4d.

Жёлтый флуоресцентный белок TagEYFP имеет максимум возбуждения 508 нм и эмиссии – 524 нм. Ген этого белка находится в составе конструкции pTagYFP-C (кат. номер FP131), полученной от компании ЗАО «Евроген» (Москва).

Базовые конструкции с геном EYFP получали путём ПЦР-амплификации соответствующих генов с праймерами ECFP1 (GGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA) и ECFP2 (GGAGATCTCTTGTACAGCTCGTCCATGCC) с последующей очисткой с помощью набора GeneJet Kit, расщеплением рестриктазами *VamHI* и *BglIII* и клонированием в вектор pQUHT, расщепленный по сайту *VamHI*. Полученная конструкция получила наименование pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr.

Трансформацию штаммов конструкцией pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr и исходным вектором pQUHT вели по стандартной методике (Davidow, 1987), используя ~1 мкг плазмидной ДНК в одном эксперименте. Трансформанты высевали на минимальную среду YNB с добавлением лейцина, но без урацила, выращивали при 28°C в течение 40 ч. Учитывали число выросших колоний, после чего их пересевали разрезающим штрихом на чашку с минимальной средой YNB с добавлением лейцина, но без урацила, выращивали при 28°C в течение 24 ч. Отдельные колонии, полученные после вторичного пассирования на селективной среде, использовали в качестве посевного материала для засева колб. Доза засева составляла ~10³ клеток на колбу. Ферментацию вели при 28°C на средах I-IV (см. выше) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 30 мл среды, в течение 24 ч.

Полученную биомассу штаммов, несущих конструкции pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr и pQUHT, собирали центрифугированием при 6000 об/мин на центрифуге J2-21 в роторе 21 (Beckman) при +4°C, суспензировали в стерильном физиологическом растворе (0.5 объема среды

культивирования), забуференном 0.1 М Na-ацетатным буфером pH 5.0, измеряли оптическую плотность суспензии на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu) при A_{592} , и хранили при температуре +4°C не более 4 суток.

Измерение биолюминесценции. Биолюминесцентную активность штаммов измеряли с помощью биолюминометра БХЛ-07. Аликвоту клеток *Y. lipolytica*, несущих интегрированные конструкции *pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr* или *pQUHT*, в количестве 0.1 ед. A_{592} , помещали в кювету люминометра, вносили суспензию наночастиц в объеме не более 50 мкл и люминол до конечной концентрации 5×10^{-5} моль/л. В качестве калибратора использовали H_2O_2 в концентрациях от 3×10^{-9} до 3×10^{-6} моль/л, как описано ранее (Mueller, Arnhold, 1995). Общий объем реакционной смеси доводили объем до 1 мл стерильным физиологическим раствором, забуференным 0.1 М Na-ацетатным буфером pH 5.0, не допуская задержки начала измерения более чем 3 мин. Измерение интенсивности биолюминесценции каждой культуры проводили в режиме регистрации единичных всплесков в течение 5 мин. Все манипуляции проводили при комнатной температуре (18–22°C).

Результаты и обсуждение.

1. *Получение и выращивание штамма Y. lipolytica, экспрессирующего флуоресцентный белок EYFP.*

Схема конструкции *pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr*, полученной путем введения универсального гена EYFP в вектор *pQUHT*, предназначена для интеграции в геном *Y. lipolytica* по локусу гена щелочной протеазы XPR. Этот ген не является существенным для жизнеспособности дрожжей. Кроме того, в геноме типового штамма он содержится в 12 копиях. Для введения в штамм конструкция содержит типовой маркер URA3, обеспечивающий комплементацию мутации *ura3-302* в штамме PO1f, придавая ей способность расти на синтетической среде без источника урацила. Конструкция *pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr* содержит синтетический промотор HP4d, производный от природного промотора гена щелочной протеазы XPR, и терминатор гена XPR. Активации промотора HP4d способствует высокий pH (не ниже 7.0) и благоприятные условия среды – наличие простых сахаров и пептона. Таким образом, для повышения уровня продукции белка EYFP целесообразно было использовать именно эти условия. Однако для достижения поставленной цели работы – создания биосенсора наночастиц на основе EYFP, необходимо было также решить вопрос об обеспечении механизма набухания митохондрий в ответ на воздействие наночастиц на клетки. С учётом этого трансформированный штамм PO1f с конструкцией *pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr* выращивали на средах различного состава (I–IV, см. секцию *Физиологические эксперименты* в разделе *Материал и методы*).

2. *Исследование биолюминесценции штаммов Y. lipolytica и влияния на этот процесс наночастиц.*

Полученные на различных средах культуры рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* тестировались на эффективность индукции активных форм кислорода (АФК) методом люминол-зависимой биолюминесценции.

Полученные в эксперименте данные позволяют сделать следующие выводы:

1) Использование белка EYFP, вводимого в клетки *Y. lipolytica* с помощью конструкции *pQE-URA3-HP4d-ECFP-Txpr*, позволяет существенно увеличить чувствительность люминол-зависимой люминесценции по отношению к пероксиду водорода и наночастицам. При этом зависимость интенсивности люминесценции от концентрации пероксида водорода или наночастиц приобретает характер, близкий к линейному (в выбранном диапазоне концентраций – не менее 4 порядков).

2) В случае спонтанной люминол-зависимой биолюминесценции клеточной культуры в ответ на обработку наночастицами, среда, на которой культивировались дрожжи, оказывает незначительное (1,5–2 раза) влияние на амплитуду получаемого сигнала. Таким образом, изменение свойств митохондрий, включая их дыхательную цепь и систему защиты от АФК, в ходе адаптации к условиям среды не оказывает значительного влияния на чувствительность теста. Напротив, в случае биолюминесценции с участием EYFP наиболее эффективная богатая среда IV позволяет добиться увеличения чувствительности на 4 порядка по сравнению с наименее пригодной средой II (минимальная среда с избыточным содержанием соли). Вероятным объяснением этого является более высокий уровень продукции белка EYFP на среде IV.

3) Химический состав наночастиц не оказывает существенного влияния на интенсивность биолюминесценции.

Заключение. Представленные данные свидетельствуют о наличии чувствительности у выбранного объекта *Y. lipolytica* к наночастицам вне зависимости от их химического состава. Этот результат является новым, поскольку ранее опубликованные данные о токсичности наночастиц относятся к многоклеточным организмам различных таксономических групп (Lopes, 2013; Donaldson, Stone, 2003). Таким образом, *Y. lipolytica* может рассматриваться в качестве перспективного объекта для исследования молекулярных механизмов токсичности наночастиц в целом.

Практическим преимуществом предложенного метода по сравнению с классическими методами токсикологии является исключительная скорость и дешевизна: единичное измерение может быть проведено в течение 5–7 минут против нескольких недель, необходимых для проведения тестов на животных. Существуют модели портативных хемилуминометров, что позволяет проводить такие тесты в полевых условиях или в неприспособленных помещениях.

Предложенный метод имеет преимущества и по сравнению с тестом на гашение токсикантами биолюминесценции бактериальных *lux*-белков. Во-первых, предложенный нами метод основан на возбуждении, а не на тушении люминесценции, что повышает чувствительность в области низких концентраций токсикантов. Во-вторых, *Y. lipolytica*, в отличие от рекомбинантных штаммов *E. coli* и, особенно, психрофильных биолюминисцирующих бактерий, не погибает от токсикантов и не повреждается ими, а лишь адаптируется к ним за счет активации митохондриального метаболизма. Это обстоятельство позволяет варьировать время экспозиции, легко добываясь оптимальной для конкретного эксперимента чувствительности. В результате диапазон доступных для измерения концентраций токсикантов с помощью предлагаемого нами метода может достигать семи и более порядков. Это обстоятельство имеет большое значение как для теоретических работ в области раскрытия природы токсичности наночастиц, так и для практического применения.

В ходе экспериментов нами подобрана оптимальная среда для получения рабочего элемента биосенсора – клеток *Y. lipolytica*, несущих белок EYFP. Представленные в работе данные свидетельствуют о возможности воспроизводимого, быстрого получения и длительного хранения этого материала, что также выгодно отличает новый метод от тестов, основанных на использовании биолюминесцентных бактерий.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы" (Государственный контракт № 14.513.11.0126).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусева М.А., Эпова Е.Ю., Осипенкова О.В., Елагина Е.М., Шевелев А.Б. Молекулярные маркеры адаптации к росту при высоких значениях pH у экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Международный журнал экспериментального образования. 2011. 3: 63–64.
2. Хрульнова С.А., Манухов И.В., Зарубина А.П., Завильгельский Г.Б. *Aliivibrio logei*, штамм KCh1 (изоляция Камчатка): биохимические и люминесцентные характеристики, клонирование *lux*-оперона // Микробиология. 2010. 79: 349–355.
3. Davidow L.S., Kaczmarek F.S., De Zeeuw J.R., Conlon S.W., Lauth M.R., Pereira D.A., Franke A.E. The *Yarrowia lipolytica* LEU2 gene // Curr. Genet. 1987. 5: 377–383.
4. Donaldson K., Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles // Ann. Ist. Super Sanita. 2003. 39(3): 405–410.
5. Elder A.C.P. The Toxicology of Nanomaterials. Univ. of Rochester, 2007. 37pp.
6. Lopes S., Ribeiro F., Wojnarowicz J., Lojkowski W., Jurkschat K., Crossley A., Soares A.M., Loureiro S. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: Size dependent effects and dissolution // Environ. Toxicol. Chem. 2013. 10: 1002–2413.
7. Madzak C., Tréton B., Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2000. 2: 207–216.
8. Manukhov I.V., Khrul'nova S.A., Baranova A., Zavilgelsky G.B. Comparative analysis of the *lux* operons in *Aliivibrio logei* KCh1 (Kamchatka isolate) and *Aliivibrio salmonicida* // J. Bacteriol. 2011. 193(15): 3998–4001.
9. Mueller S., Arnhold J. Fast and sensitive chemiluminescence determination of H₂O₂ concentration in stimulated human neutrophils // J. Biolum. Chemilum. 1995. 10: 229–237