

<https://doi.org/10.17816/ecogen17359-73>

## КИЛЛЕР-ТОКСИНЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: СИНТЕЗ, МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

© Е.В. Самбук, Д.М. Музаев, А.М. Румянцев, М.В. Падкина

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Самбук Е.В., Музаев Д.М., Румянцев А.М., Падкина М.В. Киллер-токсины дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: синтез, механизмы действия и практическое использование // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 3. – С. 59–73. <https://doi.org/10.17816/ecogen17359-73>.

Поступила: 23.11.2018

Одобрена: 28.05.2019

Принята: 20.09.2019

✿ Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, секретирующие токсины различной природы, являются уникальной моделью для изучения молекулярных механизмов антагонистических взаимоотношений сосуществующих микроорганизмов. Синтез дрожжевых токсинов можно рассматривать как пример аллелопатии и экологической конкуренции. Выяснение роли аллелопатии в формировании микробных сообществ представляет большой интерес для современной экологии. Дрожжевые токсины широко используются в медицине, пищевой промышленности и биотехнологии. В обзоре рассмотрены природа экзотоксинов, механизмы наследования и взаимодействия вируса и клеток дрожжей, а также перспективы их практического применения.

✿ **Ключевые слова:** цитоплазматическая наследственность; киллер-токсины дрожжей; аллелопатия.

## SACCHAROMYCES CEREVISIAE KILLER TOXINS: SYNTHESIS, MECHANISMS OF ACTION AND PRACTICAL USE

© E.V. Sambuk, D.M. Muzaev, A.M. Romyantsev, M.V. Padkina

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

*Cite this article as:* Sambuk EV, Muzaev DM, Romyantsev AM, Padkina MV.*Saccharomyces cerevisiae* killer toxins: synthesis, mechanisms of action and practical use.*Ecological genetics.* 2019;17(3):59-73. <https://doi.org/10.17816/ecogen17359-73>.

Received: 23.11.2018

Revised: 28.05.2019

Accepted: 20.09.2019

✿ Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a unique model for studying the molecular mechanisms of exotoxin-mediated antagonistic relationships between coexisting microorganisms. The synthesis of yeast toxins can be considered as an example of allelopathy and environmental competition. The elucidation of the role of allelopathy in the formation of microbial communities is of great interest for modern ecology. Yeast toxins are widely used in medicine, the food industry and biotechnology. The review examines the nature of exotoxins, the mechanisms of inheritance and interaction of the virus and yeast cells, as well as the prospects for their practical application.

✿ **Keywords:** cytoplasmic heredity; yeast killer toxins; allelopathy.

### ВВЕДЕНИЕ

В процессе формирования микробных сообществ реализуются различные типы взаимодействий между организмами. Важную роль в этом играют антагонистические отношения, позволяющие особям одного вида уничтожать или подавлять рост представителей других видов. При этом часто реализуются так называемые бесконтактные способы борьбы. Выделение в окружающую среду различных соединений, в том числе и токсичных, известно как аллелопатия и широко распространено в природе. Оно встречается у простейших, губок, мицелиальных грибов и растений. Роль аллелопатии в формировании экологических микробных сообществ пока изучена недостаточно [1], хотя экскреция токсичных соединений (бактерицинов и микоцинов) в окружающую

среду часто встречается среди бактерий [2] и дрожжей [3, 4]. Бактерицины и микоцины эффективны в борьбе как с представителями родственных, так и отдаленных видов. Они широко распространены в природных популяциях [1].

Удобной моделью для изучения действия экзотоксинов на молекулярном уровне являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Впервые дрожжи-киллеры были обнаружены в 1963 г. Бивэном и Маковер [цит. по 5]. Именно тогда выяснили, что такие дрожжи синтезируют экзотоксины, так называемые киллер-факторы. Эти факторы взаимодействуют с рецепторами, расположенными в клеточной стенке чувствительных дрожжей. Экзотоксины имеют разнообразное строение и являются либо простыми белками, либо гликопротеинами [6].

Дрожжи-киллеры не чувствительны к собственному токсину, но чувствительны к киллер-факторам других дрожжей-убийц. Киллерная активность может быть направлена не только на представителей своего вида, но и против широкого спектра эукариотических и прокариотических организмов [7]. Такие свойства киллер-токсинов представляют огромный интерес для биотехнологии, медицины, молекулярной биологии и экологии. В настоящее время киллер-факторы обнаружены у различных видов дрожжей, но, так как лучше всего они изучены у дрожжей *S. cerevisiae*, наибольшее внимание в обзоре уделено токсинам этого вида. В обзоре рассмотрены молекулярные механизмы действия киллер-факторов дрожжей, синтез которых обусловлен РНК-содержащими вирусами, механизмы возникновения иммунности, а также экологические и эволюционные аспекты этого явления.

### КАК ДРОЖЖИ СТАНОВЯТСЯ УБИЙЦАМИ И МОЖНО ЛИ «ПЕРЕВОСПИТАТЬ» КИЛЛЕРА?

Киллер-фенотип может быть обусловлен несколькими причинами. В цитоплазме клетки дрожжей могут находиться вирусы, содержащие двунитевую РНК (днРНК), кроме того, обнаружены хромосомные гены *KHR* и *KHS*, кодирующие экзотоксины с молекулярной массой 20 и 75 кДа соответственно, которые обладают слабой киллерной активностью в отношении *Candida glabrata* и *S. cerevisiae* [8–10]. У дрожжей *S. cerevisiae* были выделены четыре группы штаммов-киллеров: K1, K2, K28 и Klus, киллерная активность которых обусловлена днРНК. Для классификации использовали такие показатели, как особенности структуры киллер-токсинов, их генетические детерминаты, наличие или отсутствие перекрестного иммунитета [6]. Все эти штаммы-киллеры содержат в цитоплазме вирусоподобные частицы. Вирусы, обеспечивающие фенотип «киллер», принадлежат семейству *Totiviridae*, классу Миковирусов. Один из этих вирусов — вирус-помощник L-A, другой — вирус-сателлит M. Сателлитные днРНК M (M1, M2, M28 и Mlus) кодируют различные токсины K1, K2, K28 и Klus. Вирусы L-A и M имеют собственную оболочку [11, 12]. Синтез оболочки обоих вирусов обеспечивает вирус L-A. Для синтеза эффективного киллер-токсина и формирования иммунитета клетки-хозяина необходимы оба вируса. Токсины способны убивать чувствительные клетки, но штаммы-киллеры устойчивы к собственному токсину и токсинам родственных групп. В процессе изучения штаммов-киллеров были выявлены так называемые нейтральные штаммы. Они не убивали чувствительные клетки, но сами были устойчивыми к киллер-фактору [13]. Таким образом, почкующиеся дрожжи содержат в цитоплазме вирусоподобные частицы и их функционирование дает в определенных условиях селективное преимущество клетке-хозяину.

Вирусная днРНК никогда не появляется в цитоплазме, и передача вируса у дрожжей возможна лишь в процессе почкования от материнской клетки к дочерней или при скрещивании, цитодукции, а также спорообразовании [5, 14]. Таким образом, в естественной среде обитания чувствительные дрожжи могут стать киллерами только в результате скрещивания со штаммом-киллером, а это крайне редкое в природных условиях событие. Зато «перевоспитать» киллера можно достаточно легко. В ранних работах было показано, что потеря инфекционности штаммов-киллеров происходит под воздействием как физических (высокая температура, ультрафиолетовое излучение), так и химических агентов (5-фторурацил, акридин оранжевый, этилметансульфонат и др.) [15].

### СТРУКТУРА ВИРУСОВ-КИЛЛЕРОВ И ИХ ПОМОЩНИКОВ

Для эффективного синтеза вирусных токсинов необходимо совместное функционирование вирусов двух типов: вирусов-помощников L-A и киллеров M1, M2, M28 и Mlus [6]. Миковирусы L-A представляют собой самореплицирующиеся вирусы-помощники, кодирующие белок капсида (Gag) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (транскриптаза), которая экспрессируется как химерный белок (Gag-Pol). Вирус-сателлит M содержит исключительно информацию о киллер-токсине и использует белки капсида L-A и полимеразу Gag-Pol. Следовательно, присутствие вируса L-A критично для поддержания и репликации обоих миковирусов, тогда как вирус M отвечает только за развитие киллер-фенотипа и аутоиммунитета [16].

Вирусы L-A представляют собой изометрические частицы диаметром 39 нм и содержат геном, состоящий из днРНК, полная нуклеотидная последовательность которого определена и составляет 4579 п. о. [17]. В структуре капсида имеются поры, сквозь которые проникают нуклеотиды и освобождается вирусная мРНК. В зрелой вирусной частице находится одна молекула днРНК и связанная с ней транскриптаза. Процесс синтеза (+) цепи РНК подробно рассмотрен в обзоре [6]. В ходе экспериментов *in vitro* было показано, что транскриптаза синтезирует (+) цепь РНК с неспаренным аденином на 3'-конце. В инфицированной клетке (+) цепь выходит из вирусной частицы и служит матрицей для трансляции вирусных белков капсида на рибосомах в цитоплазме, затем (+) цепь РНК упаковывается в субвирусные частицы, в которых она транскрибируется и образует (–) цепь РНК, формируя днРНК. Транскрипция генома днРНК происходит внутри вириона, таким образом, днРНК генома вируса никогда не экспонируется в цитоплазму.

Молекула РНК вируса L-A (4579 п. о.) содержит две открытые рамки считывания (ORF — open reading frame), сайт связывания вируса и внутренний энхансер репликации. 5'-ORF (ORF1; 2043 н.) кодирует основ-

ной белок оболочки (Gag; 76 кДа), тогда как 3'-ORF (ORF2) кодирует полимеразу (Pol). ORF2 перекрывается с ORF1 на 130 нуклеотидов и экспрессируется только как 180 кДа Gag-Pol (fusion protein), формирующийся за счет сдвига рамки считывания на -1 в процессе трансляции. Репликация L-A днРНК сходна с репликацией реовирусов и проходит по консервативному механизму [18].

Вирусы-киллеры (M1, M2, M28 и Mlus) у дрожжей *S. cerevisiae* обладают собственным капсидом. Каждый вирус демонстрирует киллерную активность в отношении чувствительных штаммов и киллеров другого типа, инфицированные штаммы устойчивы к собственному токсину [6]. Интересно, что вирус Mlus, обнаруженный у винных штаммов *S. cerevisiae*, способен ингибировать киллерную активность не только штаммов своего вида, но и дрожжей других видов — *Kluyveromyces lactis* и *Candida albicans* [19]. В природных штаммах инфицированные клетки наследуют только одну копию генома вируса-киллера M-днРНК, так как сосуществование множественных геномов с различной вирусной специфичностью исключено на уровне репликации днРНК, по-видимому, вследствие конкуренции за белок оболочки и Gag-Pol [6]. Только с помощью трансформации мультикопийными плазмидами, которые содержат комплементарные ДНК (кДНК), кодирующие препротоксины K1, K2, K28, можно получить штамм с множественной устойчивостью к киллерам [20]. Несмотря на то что все вирусы-киллеры кодируются различными днРНК, различаются по размеру и их геномы не имеют существенной гомологии, они характеризуются сходной структурной организацией. Размер вирусов-киллеров вдвое меньше размера вируса L-A, вирус упакован в капсид, синтезированный вирусом-помощником. Репликативный цикл вирусов M зависит от вируса L-A. Особенности репликации подробно рассмотрены в обзоре [21].

РНК вирусов M1, M2 и M28 содержит единственную 5'-ORF, кодирующую киллер-токсин, и 3'-некодирующую область, которая играет важную роль в репликации и формировании капсида. Секвенирование 5'- и 3'-районов их (+) цепей РНК показало, что гомология существует только в пределах 6-нуклеотидной последовательности на 5'-конце, которая, возможно, имеет определенное значение для инициации синтеза (+) цепи РНК. 5'-Концы (+) цепей РНК M1, M2 и M28 содержат иницирующий кодон AUG в положении от 14-го до 16-го, от 7-го до 9-го и от 13-го до 15-го нуклеотида соответственно, который является началом каждой открытой рамки считывания киллер-токсинов [21]. Информация об этих киллер-системах была получена при клонировании кДНК и ее экспрессии в чувствительных некиллерных штаммах. Оказалось, что во всех трех системах экспрессия кДНК приводила к синтезу и киллер-токсина, и компонентов

иммунитета, следовательно, киллер-токсин и фактор, обеспечивающий иммунитет, закодированы в одной и той же ORF [16].

### ОРУЖИЕ ШТАММОВ-КИЛЛЕРОВ

Дрожжи-киллеры секретируют в окружающую среду белки, токсичные для чувствительных организмов. Токсины различаются по аминокислотной последовательности и по-разному воздействуют на клетки-мишени. В то же время механизмы синтеза, процессинга и секреции очень похожи. Как правило, токсин закодирован в одной ORF и синтезируется как один полипептид — препротоксин, содержащий потенциальные сайты для расщепления протеазами Kex2p, Kex1p и потенциальные сайты для N-гликозилирования. Сразу после синтеза препротоксин претерпевает посттрансляционные модификации, проходя через эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи, секреторные везикулы, что приводит к секреции зрелого активного токсина [6, 21].

Сейчас известны пути секреции и модификации киллер-токсинов многих видов дрожжей. Лучше всего изучен киллер-токсин K1 (19 кДа), который секретируется в виде двух негликозилированных субъединиц —  $\alpha$  (9,5 кДа) и  $\beta$  (9,0 кДа), происходящих от общего гликозилированного предшественника с молекулярной массой 42 кДа (протоксин). Субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  связаны дисульфидной связью. Токсины K2 и K28 имеют сходную организацию, в основном на уровне предшественника [22] (рис. 1).

Последовательность созревания киллер-токсина изучена для K1 и для K28 и подробно рассмотрена в обзорах [6, 21]. Общая схема представлена на рис. 1.

В случае киллер-токсина K1 с РНК вируса M1 транслируется предшественник (316 а. к.) — это препротоксин с молекулярной массой 35 кДа (M1p). Препротоксин включает N-терминальную лидерную последовательность, в ее состав входит сигнальный пептид (26 а. к.), за которым следуют субъединицы токсина: домен  $\alpha$  (102 а. к.) и домен  $\beta$  (82 а. к.), разделенные центральным доменом  $\gamma$  (86 а. к.), который несет все три потенциальных сайта N-гликозилирования.

Направляемый лидерной последовательностью или какой-то ее частью препротоксин входит в ЭПР, сигнальный пептид удаляется пептидазой, которая продуцирует протоксин, расщепляя пептидную связь после ValAla26 в соответствии с субстратной специфичностью.

В ЭПР  $\gamma$ -домен N-гликозилируется и принимает форму, которая готова для транспортировки в аппарат Гольджи для дальнейшего созревания.

В аппарате Гольджи оставшийся N-концевой сегмент от 27 до 44 а. к., вероятно, освобождается неидентифицированными протеазами дрожжей, которые расщепляют пептидную связь после ProArg44.

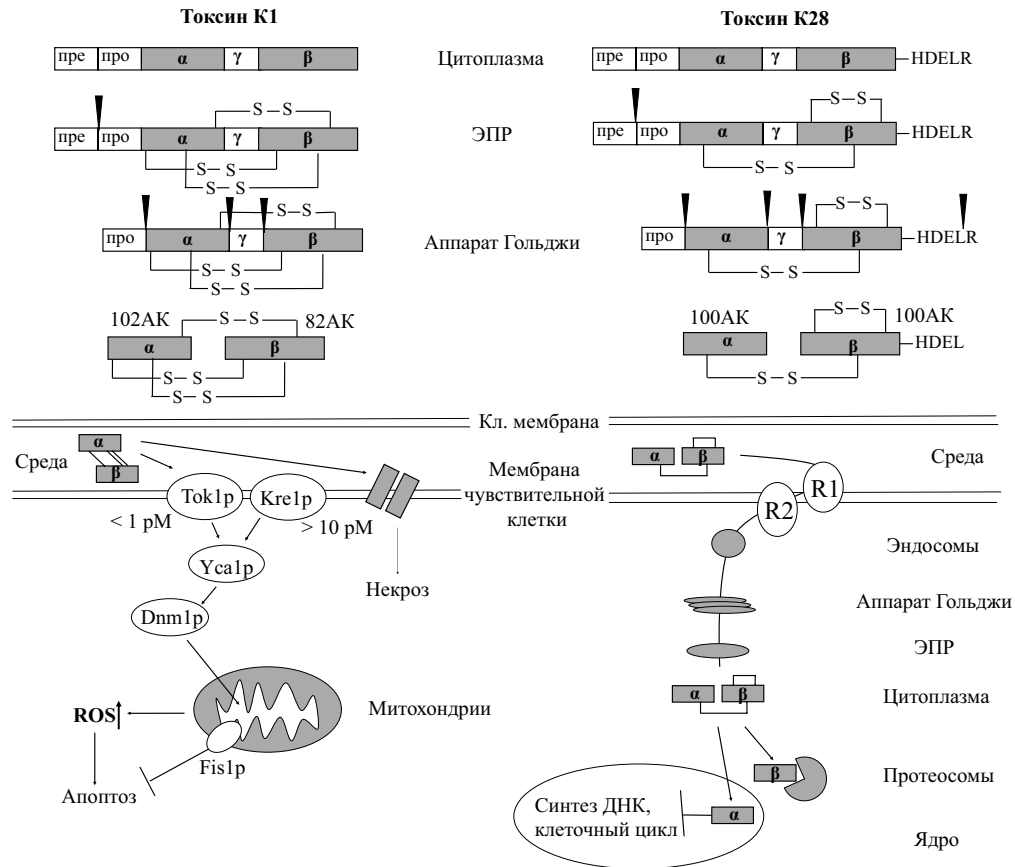


Рис. 1. Этапы созревания и механизмы действия киллер-токсинов K1 и K28. Токсины синтезируются в виде препептидов в цитоплазме, после чего транспортируются в эндоплазматический ретикулум (ЭПР). В ЭПР происходит отщепление сигнальной последовательности (пре-), образование дисульфидных связей и гликозилирование. Формирующиеся препептиды попадают в аппарат Гольджи, где происходит дальнейшее отщепление сигнальной последовательности (про-) и удаление  $\gamma$ -субъединицы. Зрелые киллер-токсины секретируются в среду. Механизмы их действия на чувствительные клетки различны. Токсин K1 в низких концентрациях запускает механизмы запрограммированной клеточной гибели. Действуя через белки Tok1, Kre1, Yca1, Dnm1, он в конечном счете приводит к увеличению уровня реактивных форм кислорода (ROS) в клетке и запуску апоптоза. При высоких концентрациях токсин K1 формирует в мембране каналы, что приводит к некрозу клеток. Токсин K28 попадает в клетку за счет эндоцитоза и, двигаясь ретроградно по секреторному пути, направляется в цитоплазму. Здесь происходит его расщепление на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы. Субъединица  $\alpha$  направляется в ядро, где ее активность блокирует синтез ДНК и деление клеток

Эндопептидаза, кодируемая геном *KEX2* (*Kex2p*), отвечает за расщепление  $\gamma$ -домена предшественника киллер-токсина после остатков ArgArg149, LysArg188 и LysArg233, что приводит к освобождению  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц токсина.

Эти реакции расщепления происходят с различной скоростью или эффективностью в одних и тех же везикулах в поздних компартментах аппарата Гольджи, вероятно, для того, чтобы минимизировать образование летальных фрагментов или увеличивать продукцию фрагментов, вовлеченных в развитие иммунитета.

Субъединица  $\beta$  в дальнейшем модифицируется сериновой карбоксипептидазой, кодируемой геном *KEX1* (*Kex1p*), которая удаляет остаток аргинина на С-конце.

Наконец, зрелый токсин K1 выводится из клетки через секреторный путь дрожжей как димер, в котором обе субъединицы связаны тремя дисульфидными связями.

Зрелый токсин K28 также выводится из клетки как димер, в котором обе субъединицы связаны дисульфидной связью между цистеиновыми остатками в  $\alpha$ - (*Cys56*) и  $\beta$ - (*Cys333*) субъединицах. В  $\beta$ -субъединице имеется еще внутрицепочечная связь между остатками *Cys307* и *Cys340* [6, 39].

### РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ КИЛЛЕР-ТОКСИНОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Для того чтобы проникнуть в клетку дрожжей, любой киллер-токсин должен преодолеть два основных препятствия — клеточную стенку дрожжей и плазматическую мембрану клетки.

На первом этапе киллер-токсин взаимодействует с первичными рецепторами клеточной стенки. Первичными рецепторами для киллер-токсина K1 явля-

ются  $\beta$ -1,6-глюканы — компоненты клеточной стенки дрожжей. Было показано, что штаммы с мутациями в генах *KRE1*, *KRE2* были нечувствительны к действию токсина. Ген *KRE1* кодирует гликопротеин, участвующий в сборке  $\beta$ -глюканов у дрожжей, *KRE2* —  $\alpha$ -1,2-маннозилтрансферазу, участвующую в маннозилировании белков [23, 24].

Действие токсина K2 аналогично действию K1, и связывание токсинов K2 и K1 с клеткой дрожжей протекает сходным образом. Токсин K2 насыщает рецепторы поверхности клетки дрожжей за 10 мин. Количество токсина K2, связанного с клеткой дикого типа дрожжей, может достигать 435–460 молекул. Обнаружили, что повышенный уровень  $\beta$ -1,6-глюкана прямо коррелирует с числом молекул токсина на поверхности клетки. Кроме того, поли- $\beta$ -1,6-глюканы, такие как пустулан, а также глюканы других типов, такие как ламинарин, хитин и др., эффективно блокируют киллерную активность K2. Таким образом, первичными рецепторами токсина K2, как и токсина K1, являются  $\beta$ -1,6-глюканы [25]. Идентификация генов, вовлеченных в первичное связывание киллер-токсинов с клеточной стенкой, оказалась достаточно сложной задачей, так как это взаимодействие зависит от многих факторов, в том числе от синтеза маннопротеинов, биогенеза липидов, биосинтеза гликозилфосфоинозитольного (GPI) якоря мембранных белков [26].

Первичным рецептором киллер-токсина K28 является маннопротеин клеточной стенки (185 кДа), углеводный компонент которого играет главную роль в узнавании токсина. Удаление белковой части маннопротеина не влияло на способность рецептора связываться с киллер-токсином K28, а при гидролизе  $\alpha$ -1,6-связи углеводного компонента связывание токсина нарушалось. Для связывания экзотоксина достаточно двух маннозных остатков на внешней стороне клеточной стенки [27]. Связывание дрожжевого киллер-токсина K28 с первичным рецептором специфически блокируется поликлональными антиманнопротеиновыми антителами, которые маскируют токсин-связывающие сайты на поверхности чувствительных клеток. Мутации в генах *S. cerevisiae*, нарушающие синтез маннопротеинов, такие как *mnn1*, влияют на структуру углеводных цепей, образованных  $\alpha$ -1,3-маннотриозами, и приводят к устойчивости к токсину K28 вследствие отсутствия сайтов связывания киллер-токсина на поверхности клеточной стенки [28]. Показано, что за взаимодействие киллер-токсина K28, как и киллер-токсинов K1 и K2, с клеточной стенкой отвечает субъединица  $\beta$  [29].

Следует отметить, что первичные рецепторы специфичны в отношении разных киллер-токсинов. Более того, хитин клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* может быть рецептором для киллер-токсина *K. lactis* [30]. При этом даже на поверхности клеток одного штамма может быть две популяции рецепторов для киллер-

токсина K1, которые различаются по биохимическим характеристикам [31]. Предполагают, что связывание токсина с внешним рецептором клеточной стенки отвечает за последующее его включение в мембрану.

Способы действия киллер-токсинов разного вида (K1, K2, K28) на чувствительные клетки различаются и в соответствии с этим вторичные рецепторы тоже различаются. В случае токсинов K1 и K2 на первом этапе формируется энергонезависимая связь между молекулой токсина и 1,6- $\beta$ -D-глюкановым рецептором в клеточной стенке. После этого киллер-токсины K1 и K2 переносятся к цитоплазматической мембране. Две строго гидрофобные области вблизи C-конца  $\alpha$ -субъединицы K1 имеют альфа-спиральную структуру, разделенную коротким гидрофильным сегментом, и могут действовать как мембранопроницающий домен, который отвечает за формирование канала в плазматической мембране [32]. Для того чтобы идентифицировать вторичный рецептор киллер-токсина K1 в плазматической мембране, у чувствительных клеток дрожжей получали мутантов, устойчивых к токсину как на уровне клеток, так и уровне сферопластов. Таким образом, были получены, в частности, мутанты по гену *KRE1*, продукт которого, по-видимому, облегчает закрепление токсина и способствует образованию ионного канала [33]. Образование энергозависимого комплекса между токсином и рецептором Kre1p на плазматической мембране приводит к активации мембранных каналов TOK1, которые идентифицированы как мишени токсина K1. В конце концов повышается мембранная проницаемость для протонов, ионов калия и высокомолекулярных соединений, таких как АТФ, что вызывает гибель клетки. При этом Kre1p, являясь рецептором токсина, не имеет непосредственного отношения ни к токсичности, ни к иммунности. Об этом свидетельствуют эксперименты по изучению свойств мутантов *kre1Δ*, трансформированных плазмидой, содержащей  $\alpha$ -субъединицу K1. Синтез  $\alpha$ -субъединицы K1 в чувствительном штамме дрожжей полностью имитировал обработку клеток экзогенным токсином. Одновременная продукция протоксина приводила к выработке иммунитета у трансформантов против  $\alpha$ -субъединицы K1, несмотря на то что  $\alpha$ -субъединица не способна транспортироваться в ЭПР и, следовательно, не может взаимодействовать с предшественником токсина. Полученные результаты позволяют говорить о том, что в развитии иммунитета к K1 может принимать участие неидентифицированный белок-эффектор [34].

В целом токсин K2 оказывает такой же эффект, как и K1. Делеция гена *KRE1* нарушает взаимодействие с плазматической мембраной не только токсина K1, но и K2, это свидетельствует о том, что белок Kre1 является рецептором для обоих токсинов. Однако мутации в других генах (*GDA1*, *SAC1*, *LUV1*, *KRE23*, *SAC2*, *KRE21*, *ERG4*) по-разному влияли на чувствительность

клеток к K1 и K2. Различаются и факторы, мутации в которых приводят к устойчивости и гиперчувствительности к токсинам. Семьдесят процентов эффекторов K2 отличаются от эффекторов K1 и K28, кроме того, при действии K2 не происходит выхода АТФ из клетки. Таким образом, по-видимому, в процессе эволюции каждый киллер-вирус вырабатывает свой способ воздействия на чувствительные клетки [35, 36].

Действие киллер-токсина K28 отличается от действия K1 и K2. Детали проникновения токсина в чувствительную клетку, способ передачи сигнала внутри клетки, связь действия токсина с сигнальными путями клетки были изучены в работе [37]. На первом этапе токсин K28 взаимодействует с рецепторами клеточной стенки — маннопротеинами, что, по-видимому, является необходимым условием для последующего взаимодействия токсина с плазматической мембраной. Ранее в работе Шмитта с соавторами в С-конце  $\beta$ -субъединицы зрелого токсина была идентифицирована последовательность HDEL [38]. Вторичным рецептором для K28 выступает белок Erd2p, узнающий сигнальную последовательность H/KDEL. В пользу этого говорят следующие факты: и сферопласты, и клетки *erd2Δ* устойчивы к токсину; Erd2p локализован не только в мембранах раннего секреторного пути, но и в цитоплазматической мембране, где он связывает H/KDEL-белки, такие как токсин K28, GFP-KDEL и Kar2p. Интересно, что рецепторы KDEL человека полностью восстанавливают чувствительность к токсину в отсутствие эндогенного Erd2p [39].

Мутант K28, утративший последовательность HDEL на С-конце  $\beta$ -субъединицы, становится нетоксичным и теряет способность проникать в клетку. Комплекс K28/Erd2p путем эндоцитоза попадает в ранние эндосомы, а затем, используя секреторный путь и ретроградный транспорт, отправляется в цитоплазму. Показано, что связывание HDEL токсина K28 и Erd2p зависит от pH. При pH 4,7 K28 связывается с расположенным в плазматической мембране рецептором Erd2p. В связанном состоянии комплекс проходит через эндосомы и аппарат Гольджи (pH 6,0–6,2) и достигает ЭПР (pH 7,2). Регуляция этого процесса неизвестна, непонятен процесс предотвращения деградации комплекса в вакуолях. Дефекты вакуолей способствуют перемещению токсина в ЭПР [40]. Идентифицирован ряд белков, которые необходимы для антероградного и ретроградного транспорта клеточных белков и токсина K28 [41].

Как сказано выше, киллер-токсин K28 секретируется как  $\alpha/\beta$ -гетеродимер, который убивает чувствительные клетки дрожжей рецептор-опосредованным способом и блокирует синтез ДНК в ядре [42]. Мутанты дрожжей *end3* и *end4*, клетки, утратившие рецептор HDEL, и мутанты с дефектами транспорта белков от аппарата Гольджи к ЭПР (*erd1*) устойчивы к токсину, так как на фоне этих нарушений токсин не может

входить в клетку и двигаться по секреторному пути в обратном направлении. Сайт-направленный мутагенез подтверждает, что мотив HDEL  $\beta$ -субъединицы токсина обеспечивает ретроградный путь. Интересно, что у токсин-секретирующих дрожжей мотив HDEL изначально замаскирован остатком аргинина (HDEL<sub>R</sub>), отщепление этой аминокислоты осуществляет Kex1p в поздних цистернах аппарата Гольджи. Ингибирование работы Kex1p обуславливает высокий уровень секреции биологически неактивного белка, неспособного повторно входить в секреторный путь. Экспорт токсина из ЭПР в цитоплазму опосредован транслоконом Sec61p и требует наличия функциональных шаперонов ЭПР Kar2p и Spe1p [39]. После попадания в цитоплазму комплекс  $\alpha/\beta$  диссоциирует,  $\beta$ -субъединица убиквитинируется и отправляется на деградацию в протеасому. Субъединица  $\alpha$  входит в ядро и убивает клетку, вызывая необратимую остановку клеточного цикла на стадии G1/S и ингибируя синтез ДНК [42].

Судьба чувствительной клетки после взаимодействия с токсином определяется особенностями его действия. Ионофорный киллер-токсин K1 в чувствительных клетках дрожжей нарушает функцию цитоплазматической мембраны путем формирования летальных ионных каналов, а K28 вызывает гибель клетки, блокируя репликацию ДНК [42]. В отношении способа действия K28 идентифицировано два дозозависимых механизма. Низкая концентрация токсина (<1 пМ) вызывает апоптоз с типичными для апоптоза маркерами: фрагментация ДНК, конденсация хроматина, появление фосфатидилхолина на внешней стороне плазматической мембраны. Кроме того, это действие токсина зависит от дрожжевой каспазы (Yca1p) и сопровождается появлением активных форм кислорода. В лабораторных условиях удастся повысить концентрацию токсина (>10 пМ), что приводит к некрозу клеток и блокировке клеточного цикла на стадии G1/S, при этом клетки имеют почку среднего размера, одно ядро в материнской клетке и ДНК в количестве 1n. При этом, как уже упоминалось, токсин K28 нарушает синтез ДНК необратимо [42–44]. Поскольку в природных условиях клетки сталкиваются с низкой концентрацией токсина, то апоптоз — это основной механизм гибели клеток.

#### ПРИРОДА ИММУННОСТИ КЛЕТОК ШТАММА-КИЛЛЕРА

Геном вирусов M обеспечивает синтез токсина, который определяет токсичность в отношении чувствительных клеток и иммунитет в отношении собственного токсина [45]. Интересно, что на поверхности клетки штамма-киллера также есть рецепторы для токсина. Тем не менее клетка киллера обладает иммунитетом к своему токсину. Современная модель иммунитета разработана для K28. Киллер-токсин K28 попадает в собственную клетку, и за счет внутриклеточного градиента pH (от 4,5 до 7,2) у него в гетеро-

димере  $\alpha/\beta$  тиольные группы перестраиваются. Это ведет к формированию неактивных тримеров, тетрамеров, олигомеров токсина, что доказано в экспериментах *in vitro*. Формированию этих олигомеров *in vivo* препятствуют шапероны ЭПР и протеиндисульфидизомераза Pdi1p, которые удерживают зрелый токсин в гетеродимерной конформации [40]. Pdi1p дрожжей, подобно ферменту человека, обладает дисульфидизомеразной и оксидоредуктазной активностью и содержит два каталитических тиоредоксиновых домена, в активном центре которых присутствует последовательность Cys—XX—Cys, а также домен, отвечающий за белок-белковые взаимодействия. Делеционные мутанты дрожжей *pdi1* нежизнеспособны. Отсутствие Pdi1p частично может быть компенсировано суперпродукцией Eug1p и Mpd1p [46].

Процесс формирования дисульфидных связей включает серию последовательных тиол-дисульфид обменных реакций, в ходе которых образуются временные комплексы самих протеиндисульфидизомераз с процессируемыми белками. У дрожжей в замыкании связей S-S секреторных белков участвуют по меньшей мере две протеиндисульфидизомеразы — Ero1p и Pdi1p. На первом этапе Ero1p взаимодействует с Pdi1p и окисляет ее, в дальнейшем окисленная форма Pdi1p связывается с белком-субстратом и, окисляя его, инициирует образование дисульфидных связей [47]. Правильное замыкание дисульфидных связей, стабилизирующих нативную структуру, имеет решающее значение для секреции некоторых белков. Предполагают, что Pdi1p индуцирует некие дополнительные, неизвестные структурные изменения в K28, которые обеспечивают перенос токсина в цитоплазму. В отсутствие Pdi1p происходит олигомеризация гетеродимера  $\alpha/\beta$ , что может способствовать преждевременному освобождению цитотоксичной  $\alpha$ -субъединицы. В штаммах-киллерах есть механизм быстрой деградации своего киллер-токсина, проникшего в клетку-хозяина. После ретротранслокации в цитоплазму  $\alpha/\beta$  гетеродимер токсина формирует комплекс с непротессированным предшественником, который далее подвергается полиубиквитинированию и отправляется на деградацию [39].

#### ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДРОЖЖЕЙ К КИЛЛЕР-ТОКСИНАМ И ОТВЕТ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА НА КИЛЛЕР-ВИРУСЫ

Одной из первых работ, посвященных анализу влияния киллер-токсина K1 на экспрессию генов генома дрожжей *S. cerevisiae*, была работа [48]. Для изучения чувствительности к киллер-токсину K1, который связывается с  $\beta$ -глюканами клеточной стенки и формирует поры в плазматической мембране, использовали делеционные мутанты 5718 генов. Были выявлены чувствительные и устойчивые мутанты с более или менее выраженным эффектом. У некоторых устойчивых

к токсину мутантов были обнаружены плейотропные эффекты: чувствительность к детергентам, гигромицину и Calcofluor-White, флуоресцентному красителю, связывающемуся с хитином клеточной стенки. Гены, мутации в которых влияли на чувствительность к киллер-токсину K1, контролировали синтез глюканов и маннопротеинов клеточной стенки, секреторные пути, биосинтез липидов и стеролов, сигнальную трансдукцию [48].

Интересный подход был использован Сантосом с соавторами. Был изучен транскрипционный ответ клеток дрожжей *S. cerevisiae* на киллер-токсин РМКТ *Pichia membranifaciens*. Оказалось, что ответ клеток дрожжей на действие токсина очень похож на ответ клетки, адаптирующейся к ионному или осмотическому стрессу. Сигнал передавался через путь HOG (high osmolarity glycerol pathway), в ответ на действие токсина происходило фосфорилирование Hog1p, что указывает на существование общих механизмов ответа клетки на киллер-токсин и регуляции ионного гомеостаза [49].

Как известно, дрожжевой киллер-токсин K28, а также ризин и холерный токсин принадлежат к семейству токсинов А/В, которые попадают в клетку путем эндоцитоза с последующим ретроградным переносом токсина в цитоплазму. По этой причине исследование генетического контроля ответа клетки дрожжей на токсин K28 представляет особый интерес для медицины. В результате предпринятого в 2000 г. поиска мутантов, устойчивых к токсину K28, были выявлены мутанты *sla2* и *erd2* [37]. Белок Erd2, как уже упоминалось, является интегральным белком мембраны и направляет транспорт токсина из аппарата Гольджи в ЭПР клеток-мишеней, а Sla2p является адапторным белком, который связывает актин, клатрин и процесс эндоцитоза. Sla2p вовлечен в сборку цитоскелета и поляризацию клетки, представлен в актиновых кортикальных заплатах в возникающей почке. В более поздней работе Кэрролл и др. было проанализировано более 5000 делеционных и ts-мутаций устойчивости и гиперчувствительности к токсину K28. Мутации, приводящие к устойчивости к K28, возникали в основном в генах, контролирующих биогенез клеточной стенки (33 гена), плазматической мембраны (18), эндоцитоз (21), транспорт (16), митохондрии (14), клеточный цикл (13). Мутации, приводящие к гиперчувствительности к токсину, как правило, возникали в генах, вовлеченных в формирование рибосом и трансляцию (53 гена), процессинг РНК и транспорт РНК, транскрипцию, в ионный гомеостаз и др. Было установлено, что делеции в генах, кодирующих все четыре субъединицы адаптора клатрина AP2 (*apl1Δ*, *aps2Δ*, *apl3Δ* и *apt4Δ*), приводили к устойчивости к K28. Таким образом, чувствительные клетки способны или по крайней мере пытаются противостоят действию киллер-токсинов [50].

Для того чтобы получить ответ на вопрос, как вирусы, находящиеся в клетке, влияют на экспрессию генов

хозяина, сравнили изменения транскриптома у штаммов с вирусами L-A и M1 и у штаммов без вирусов. Особое внимание уделяли генам, мутации в которых влияли на такие процессы, как антивирусная система, необходимая для деградации днРНК вирусов, контроль репликации днРНК, процессинг белка, секреция, синтез белков клеточной стенки и сигналинг, ингибирование апоптоза [51]. Оказалось, что наличие или отсутствие в клетке вирусов L-A и M незначительно влияет на экспрессию генов клетки-хозяина. Сходные результаты были получены при изучении транскриптомного профиля у штамма *S. cerevisiae*, потерявшего вирус M2 и сохранившего вирус L-A, и у штамма, который утратил оба вируса. Было идентифицировано 486 генов, экспрессия которых была изменена после изгнания вируса M2, и 715 генов, уровень экспрессии которых изменялся при потере обоих вирусов. При этом экспрессия большинства генов повышалась или понижалась не менее чем в 1,5 раза, но, как правило, не более чем в 4 раза. Транскрипция только 12 % дифференциально экспрессируемых генов у штамма без вируса M2, а также у штамма, который утратил оба вируса, изменилась в 4 раза и более. Эти гены контролировали биогенез рибосом, функции митохондрий, стресс-ответ, биосинтез липидов и аминокислот, что, вероятно, свидетельствует об изменении энергетических затрат на синтез белка и РНК у штаммов без вирусов [52].

### ЭВОЛЮЦИЯ КИЛЛЕР-СИСТЕМ

Вирус L-A необходим для поддержания сателлитного вируса M, который в своем геноме содержит лишь информацию о токсине и обеспечивает иммунитет клетке-хозяину. С эволюционной точки зрения такие отношения могут быть системой «автоселекции», то есть селекции микроорганизмов по адаптационным свойствам. Клетки-киллеры получают преимущества в силу наличия вирусов, однако эти преимущества относительны. Для того чтобы произошла гибель близлежащих клеток, концентрация клеток-киллеров должна быть на порядок выше, чем концентрация чувствительных клеток. Если токсин-кодирующие элементы предоставляют селективные преимущества клетке-хозяину, то такие отношения должны закрепиться в эволюции и широко распространиться в популяции. Однако штаммы-киллеры в природных популяциях немногочисленны, следовательно, токсин-кодирующие элементы не слишком эффективны. Возможно, лишь отсутствие системы РНК-интерференции позволяет им сохраняться, и вирусы выбирали хозяина, который по какой-то причине утратил РНК-интерференцию [53]. Оказалось, что фенотип киллеров поддерживается только в тех клетках, в которых нарушены гены *SKI*. Белки Ski2p, Ski3p, Ski8p блокируют экспрессию неполиаденнированных мРНК, таких как вирусная днРНК [54].

Известно, что эволюционно-консервативная 5'-3'-экзонуклеаза Xrn1p (Ski1p) совместно с экзосомой участвует у эукариот в деградации клеточных мРНК. Поскольку вирусные мРНК не имеют канонических последовательностей на концах молекул, таких как кэп и поли-A-хвост, они могут подвергаться деградации этими экзонуклеазами. Дрожжи используют этот механизм как инструмент защиты от вирусов. Rowley с соавторами обнаружили высокоточный механизм специфических взаимодействий между вирусом L-A и экзонуклеазой Xrn1p у различных видов дрожжей. Они показали, что под действием естественного отбора последовательность гена *XRN1* у дрожжей рода *Saccharomyces* дивергировала и значительно различается от вида к виду. Изменения последовательности гена *XRN1* обуславливают различные взаимодействия экзонуклеазы с вирусом L-A. Каждый вариант Xrn1p адаптирован к определенному вирусу. Авторы предполагают, что Xrn1p коэволюционировал с тотивирусами, увеличивая свою антивирусную активность и ограничивая размножение вирусов в дрожжах. Дальнейшие исследования показали, что Xrn1p взаимодействует с белком оболочки вирусов Gag. Этот факт свидетельствует о более сложных взаимодействиях между клеткой дрожжей и вирусом, а не о простом нуклеазном расщеплении вирусной РНК [55, 56]. Таким образом, отсутствие системы РНК-интерференции у дрожжей, по-видимому, в процессе эволюции компенсируется другими механизмами. Возможный механизм элиминации вирусов у дрожжей был предложен в работе Сузуки с соавторами. Они обнаружили прионоподобный элемент [Kil-D], наличие которого в клетке, содержащей вирус M, приводило к гипермутабельности генома вируса и его инактивации. Природа этого фактора пока не изучена [64].

В то же время роль киллерных систем в формировании видовой разнообразия в условиях отсутствия географической изоляции (симпатрическое видообразование) в пределах одной экологической ниши минимальна [21]. Особый интерес вызывает коэволюция вирусов L-A и M. При изучении нуклеотидных последовательностей днРНК L-A было выявлено по крайней мере четыре природных варианта днРНК L-A. Их анализ продемонстрировал, что они отличаются между собой примерно на 24 % [58]. При этом авторы показали, что подбор эффективных пар вирус-помощник и вирус-киллер произошел путем коэволюции и пары вирусов специфически адаптированы друг к другу. Так, в винных штаммах-киллерах K2 для размножения вируса M2 был необходим только вирус L-A-2 и никакая другая форма вируса L-A или L-A-lus не обеспечивала развитие вируса M2 на том же генетическом фоне. Геном других тотивирусов L-BC, которые часто встречаются совместно с L-A, менее вариабелен (только 10 % нуклеотидов различны). Таким образом, фенотип «киллер»



зависит от двух типов днРНК вирусов, при этом каждый вирус-помощник L-A, кодирующий белки капсида для вируса M, специфичен для своего вируса-киллера, что доказывает их коэволюцию. Взаимоотношения клетки дрожжей и микровирусов многие авторы рассматривают как разновидность симбиотических отношений. Однако нам, как и другим авторам [59], кажется спорным использование такой терминологии в этом случае, так как до настоящего времени не существует единого мнения о том, являются ли вирусы живыми существами. Кроме того, требует решения целый ряд вопросов. Каким образом шла коэволюция вируса L-A и вирусов M1, M2, M28, которые практически паразитируют на вирусе-помощнике? Почему вирусы, продуцирующие токсин, не элиминированы полностью из популяции, если они легко теряются, а восстановиться могут только в результате скрещивания, которое у дрожжей в природных условиях происходит крайне редко? Является ли преимуществом наличие в клетке вируса и связано ли это только с отсутствием РНК-интерференции у дрожжей?

#### СИСТЕМА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ И РНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ

Система РНК-интерференции — одна из важнейших систем, обеспечивающих регуляцию экспрессии генов, а также защиту клеток от чужеродных нуклеиновых кислот. В основе РНК-интерференции лежит подавление экспрессии гена на стадии транскрипции или трансляции при активном участии малых молекул РНК. Среди этих РНК можно выделить два основных класса: микроРНК (англ. microRNAs, miRNAs) и малые интерферирующие РНК (англ. siRNA, small interfering RNA).

Молекулярные механизмы РНК-интерференции, опосредованные микроРНК, были впервые детально изучены у нематоды *Caenorhabditis elegans* [60]. Показано, что микроРНК могут быть закодированы в геноме самого организма как в виде отдельных генов, так и в составе интронов других генов. Синтез микроРНК с соответствующих генов чаще всего осуществляет РНК-полимераза II. Известны другие механизмы образования микроРНК — за счет работы РНК-полимеразы III или из фрагментов РНК, вырезаемых при сплайсинге интронов [61]. Основной путь биогенеза микроРНК включает в себя несколько этапов и начинается с синтеза первичного транскрипта (pri-miRNA), содержащего одну или несколько двунитевых шпилек. На следующем этапе концы транскрипта укорачиваются с помощью комплекса, основными компонентами которого являются РНКаза III (также именуемая Drosha) и РНК-связывающий белок (DGCR8 у человека, Pasha у *C. elegans* и *D. melanogaster*) [62]. Образующиеся укороченные шпильки (pre-miРНК) экспортируются через ядерную мембрану в цитоплазму. Здесь с ними взаимодействует другая РНКаза III (Dicer), которая выреза-

ет из шпилек короткие двунитевые фрагменты. После разделения нитей геликазой образующаяся микроРНК входит в состав комплекса, называемого RISC (RNA Induced Silencing Complex). Основными компонентами подобных комплексов являются белки семейства *Argonaute*, обладающие эндонуклеазной активностью. Специфическое связывание комплекса RISC с мРНК-мишенью, которое обеспечивается микроРНК, приводит к остановке процессов трансляции на данной мРНК и реже к ее расщеплению [63].

В отличие от микроРНК, биогенез малых интерферирующих РНК связан с попаданием в клетку чужеродных нуклеиновых кислот, в первую очередь РНК-содержащих вирусов. Синтезирующаяся в процессе репликации вирусов двуцепочечная РНК разрезается на короткие фрагменты одним из компонентов системы РНК-интерференции — эндонуклеазой Dicer. Образующиеся в ходе разделения этих фрагментов малые интерферирующие РНК взаимодействуют с комплексом RISC. Мишенями комплекса в данном случае будут служить вирусные РНК, которые он будет эффективно расщеплять, препятствуя размножению вируса в клетке. Показано также участие малых интерферирующих РНК в обеспечении регуляции генов на уровне транскрипции за счет ремоделирования хроматина (в частности, у *Schizosaccharomyces pombe*). При этом исходная двуцепочечная РНК синтезируется на основе мРНК за счет работы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), закодированной в геноме *S. pombe* [63].

Система РНК-интерференции, вероятно, возникла у раннего предка эукариот и достаточно консервативна во всем царстве грибов. Однако сравнительный анализ геномов грибов различных групп показал, что все почкующиеся дрожжи утратили один или нескольких генов, кодирующих компоненты данной системы [64]. Среди проанализированных видов почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis* и *Ashbya gossypii* утратили все гены, кодирующие гомологи Argonaute, Dicer и RdRP. В то же время у представителей других видов дрожжей, таких как *Saccharomyces castellii*, *Kluyveromyces polysporus*, *Candida albicans* и *Candida tropicalis*, присутствуют гены, кодирующие белки Argonaute, тогда как генов, кодирующих гомологи Dicer, у этих видов нет. При этом введение в геном штаммов *S. cerevisiae* генов, кодирующих белки системы РНК-интерференции, приводит к ее частичному восстановлению [64]. Возможно, отсутствие РНК-интерференции у дрожжей *S. cerevisiae* позволяет существовать и функционировать в их клетках вирусам-киллерам, которые способны обеспечивать конкурентное преимущество клетки-хозяина.

У человека система РНК-интерференции участвует в регуляции по крайней мере 30 % генов [65], поэтому возможность утраты такой системы у живых орга-

низмов в ходе эволюции, как это произошло у предков почкующихся дрожжей, вызывает необычайный интерес. Отсутствие у дрожжей *S. cerevisiae* системы РНК-интерференции делает их уникальной моделью для исследования молекулярных путей передачи вирусов и их действия в клетках эукариот [66].

### РОЛЬ ШТАММОВ-КИЛЛЕРОВ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Токсичные взаимодействия, по-видимому, являются общими и экологически важными среди микробов. Экскреция антимикробных соединений, действующих против родственных или сопутствующих видов, известна у бактерий и дрожжей. В настоящее время штаммы-киллеры обнаружены у представителей разных видов дрожжей, которые отличаются условиями обитания. Идентифицировано 11 видов киллер-токсигенов, которые выделяют представители таких родов, как *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Ustilago*, *Williopsis*, занимающих различные экологические ниши [21].

Морские дрожжи *Metchnikowia bicuspidata* WCY действуют как патогены в марикультуре крабов *Portunus trituberculatus*, но могут быть убиты киллер-токсинами. В результате скрининга дрожжей, выделенных из морской воды, осадков и тины, кишок морских рыб и морских водорослей, было выявлено 17 штаммов дрожжей, которые секретируют токсин в среду и были способны убивать патогенные дрожжи. Среди них 5 штаммов отличались высокой киллерной активностью. Эти дрожжи классифицировали как *Williopsis saturnus* WC91-2, *Pichia guilliermondii* GZ1, *Pichia anomala* YF07b, *Debaryomyces hansenii* hcx-1 и *Aureobasidium pullulans* HN2.3. Киллер-токсины указанных дрожжей действовали против патогенных для краба дрожжей *M. bicuspidata* WCY. Было показано, что оптимальная температура для продукции киллер-токсина совпадает с природными условиями обитания крабов. Оптимальный диапазон pH варьировал от 4,5 до 6,0. Однако максимальный уровень синтеза токсина у проанализированных штаммов-киллеров наблюдался при разных концентрациях NaCl. Таким образом, изменение солевого баланса, pH и температуры, возможно, создает преимущества штаммам-киллерам в борьбе за экологическую нишу [67].

В сообществах дрожжей, обитающих в гниющих стеблях растений и плодах, значительную долю составляют штаммы-киллеры. Этому способствуют условия: низкий pH и высокое содержание сахаров. При формировании микробных сообществ, особенно на ранних стадиях, оружие дрожжей-киллеров обеспечивает им селективное преимущество, так как предотвращает развитие конкурентных микроорганизмов. Концентрация токсина, выделяемого штаммами в природных условиях, низка, поэтому можно предположить, что гибель чувствительных

клеток при воздействии токсина происходит в основном путем апоптоза [68].

Известно, что передача вирусов у дрожжей возможна как вертикально — при почковании, так и горизонтально — при скрещивании или цитодукции. Вирусы дрожжей никогда не выделяются во внешнюю среду. Зараженные клетки в пределах ареала переносят животные различных видов. В естественных условиях сохранению киллерных дрожжей способствует пониженная температура окружающей среды по сравнению с оптимальной температурой существования дрожжей. Интересно, что многие изоляты дрожжей-киллеров, выделенные из фруктов, очень быстро теряют киллер-фенотип, возможно, из-за культивирования в лабораторных условиях при более высокой температуре [69]. В природных сообществах штаммы-киллеры и чувствительные к ним штаммы сосуществуют, что свидетельствует о пространственном разделении локальных мест обитания и временном разделении стадий развития, несмотря на использование общего субстрата [70]. Элиминация конкурента обычно означает или его окончательную гибель, или снижение жизнеспособности чувствительного штамма за счет блокировки клеточного цикла или нарушения целостности мембраны. В борьбе между популяциями со сходными экологическими потребностями наличие токсина может быть преимуществом, и тогда штамм-киллер будет доминировать в сообществе и полностью вытеснит чувствительный штамм. Однако в природе эти штаммы успешно сосуществуют, и это требует объяснения. Продукция токсина является примером интерференционной конкуренции. Это такой тип экологических отношений, когда особи одного или разных видов непосредственно не взаимодействуют между собой, но при этом происходит активное подавление конкурентной популяции, а не просто истощение общих ограничивающих ресурсов. Активная интерференция с биохимической точки зрения позволяет токсин-продуцирующей популяции использовать большую часть общих ресурсов за счет синтеза токсина. Продукция токсина может быть решающей в борьбе между популяциями, для которых необходимы одинаковые условия существования. В определенных условиях дрожжи-киллеры могут стать доминирующими. В то же время в природе наблюдают разные исходы таких отношений: иногда доминируют штаммы-киллеры, а иногда чувствительные штаммы вытесняют киллеров [71]. Можно предположить, что каждая разновидность штаммов имеет свою нишу, которая ограничена соответствующими условиями существования. Объяснить этот случай можно при помощи правила конкурентного исключения, которое, хотя и было сформулировано Г.Ф. Гаузе для близких по экологии видов, можно применить и для этого случая. Эксперименты показывают, что, когда невозможно избежать конкуренции за основные ресурсы, более слабые конкуренты исключаются из сообщества.

В случае сосуществования чувствительных и киллер-штаммов этого не происходит, возможно, в силу адаптации чувствительных штаммов к более высокой температуре и кислотности среды. Кроме того, следует учесть, что при высокой температуре часть штаммов-киллеров теряет вирусную РНК и становится или некиллерами, или нейтральными дрожжами.

### ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ КИЛЛЕР-ТОКСИНОВ

Киллер-токсины нашли широкое применение в пищевой промышленности, в агро- и аквакультурах как биопротективный агент, а также в медицине. Дрожжи *S. cerevisiae* традиционно используют в пищевой промышленности. Впервые киллер-токсины (микоцины) были обнаружены у штаммов этого вида дрожжей, используемых в пивоварении. Дрожжи-киллеры часто встречаются среди тех штаммов, которые существуют при высокой плотности клеток и жесткой конкуренции за субстраты, например при ферментации виноградного сула и засолке оливок. В этих условиях киллер-токсин направлен против широкого спектра неродственных микроорганизмов. Дрожжи-киллеры используют в качестве стартовой культуры в виноделии для того, чтобы, размножаясь, они подавляли рост патогенных и других вредных микроорганизмов. Некоторые дрожжи, такие как *Kluyveromyces wickerhamii*, выделяют киллер-токсин против дрожжей *Dekkera* и *Brettanomyces*, которые вызывают неприятный запах у вина в процессе ферментации. В молочной промышленности дрожжи-киллеры также применяют в качестве стартовой культуры, чтобы предотвратить порчу сыра, йогурта и других молочных продуктов. Подробно использование дрожжей-киллеров в пищевой промышленности рассмотрено в обзоре [72]. Дрожжи-киллеры могут быть полезны и в аквакультуре. Киллер-токсины морских дрожжей эффективно борются с заболеваниями крабов, так как химиопрепараты негативно влияют не только на патогенные дрожжи, но и на самих крабов [67].

Киллер-факторы находят применение и в защите растений. Огромной проблемой являются заболевания цитрусовых, вызванные грибным патогеном *Geotrichum citrii-aurantii*. Поскольку химические соединения, сертифицированные для борьбы с этим патогеном, отсутствуют, потери урожая могут достигать значительных размеров. Киллер-токсины в этой ситуации могут стать альтернативным способом борьбы с данным патогеном. Среди дрожжей, выделенных с поверхности листьев и плодов цитрусовых, наиболее эффективно подавляли рост патогена штаммы *Rhodotorula minuta*, *Sporobolomyces koalae*, *Candida azyma*, *S. cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa* и *Aureobasidium pullulans*, которые синтезировали киллер-токсины. Механизм действия этих киллер-токсинов пока не изучен, но предварительные данные говорят о том, что их мишенью являются компоненты клеточной стенки *G. citrii-aurantii* [73].

Токсины, продуцируемые дрожжами, могут найти применение в медицине. При изучении киллерной активности природных изолятов дрожжей дикого типа оказалось, что от 5 до 30 % штаммов способны убивать стандартный чувствительный штамм *Candida glabrata* [70]. Глубокие знания механизмов действия киллер-токсинов позволят создать новое поколение антимикробных агентов, которые будут бороться с микробными инфекциями, устойчивыми к антибиотикам и другим стандартным лекарственным средствам. Препараты на основе киллер-токсинов могут быть полезны при лечении микозов человека и животных. Принцип действия таких препаратов заключается в гидролизе  $\beta$ -1,3-глюканов клеточной стенки патогенных дрожжей. Однако непосредственное использование киллер-токсинов может быть ограничено. Поскольку они являются гликопротеинами, то могут быть антигенами и вызывать иммунный ответ. Кроме того, рН для оптимального действия киллер-токсинов из разных источников не всегда совпадает с рН в организме, поэтому поиск природных киллер-токсинов с широким спектром действия, работающих при разных рН, продолжается.

Новым перспективным направлением в использовании киллер-токсинов является получение антиидиотипических антител. Антиидиотипические антитела воспроизводят конфигурацию антигена и могут рассматриваться как его аналоги. Так, у *Pichia anomala* была изучена биологическая активность фрагментов киллер-токсина РаКТ, который демонстрировал антимикробную активность в отношении *C. albicans*, *Pneumocystis carinii* и др. Использовать киллер-токсин непосредственно для лечения было невозможно вследствие того, что он проявлял активность в узком интервале рН и температуры, которые отличались от физиологических значений, а также был иммуногенен и токсичен. В работе были получены моноклональные антитела, способные нейтрализовать активность киллер-токсина. Это послужило основой для продукции антиидиотипических антител, которые способны конкурировать с киллер-токсином за сайты связывания и активны в отношении *C. albicans*. Эти так называемые antibiobodies (antibiotic-like antibodies) оказывали прямой фунгицидный эффект без дополнительных факторов, работали при физиологических значениях рН и температуры, не обладали иммуногенностью и токсичностью. Antibiobodies могут быть перспективным классом соединений для лечения различных заболеваний человека [74].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антагонизм широко распространен среди микроорганизмов и обусловлен продукцией различных антимикробных веществ. Способность синтезировать и секретировать белки-токсины обнаружена у многих видов дрожжей. Структура и свойства токсинов, механизм их действия могут отличаться даже в пределах одного

вида. Изучение феномена киллерной активности у модельного организма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* привело к существенному прогрессу во многих областях биологии, позволило получить важную информацию о механизмах взаимодействия вируса и клетки дрожжей, системы поддержания вируса в отдельной клетке и в популяции, решить вопросы эволюции и коэволюции биологических систем. В связи с тем что киллер-токсины напоминают естественные секретируемые белки или гликопротеины, подробный анализ их структуры и синтеза существенно расширил представления о механизмах посттрансляционной модификации эукариотических белков в процессе секреции. Анализ рецептор-опосредованного способа действия киллер-токсинов оказался эффективным средством для исследования молекулярной структуры и сборки *in vivo* клеточных стенок дрожжей. Перспективным направлением использования киллер-токсинов дрожжей является создание на их основе новых лекарственных препаратов для лечения грибковых заболеваний, вызванных патогенными штаммами дрожжей *S. albicans*. Кроме того, штаммы-киллеры и киллер-токсины дрожжей нашли применение в пищевой промышленности, где они служат эффективным средством борьбы с патогенными микроорганизмами в процессе виноделия, пивоварения и хлебопечения. Учитывая, что большинство известных на сегодняшний день видов дрожжей, обладающих киллерной активностью, подробно не исследованы, существует вероятность обнаружения новых свойств и областей применения киллер-токсинов дрожжей.

#### Благодарности

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-01057). Раздел «Система РНК-интерференции и РНК-содержащие вирусы» написан в рамках выполнения проекта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00750).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Czárán TL, Hoekstra RF. Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proc Biol Sci.* 2003;270(1522):1373-1378. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2338>.
2. Chao L, Levin BR. Structured habitats and the evolution of anticompeter toxins in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78(10):6324-6328. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6324>.
3. Cailliez JC, Cantelli C, Séguy N, et al. Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. *Mycopathologia.* 1994;126(3):173-177. <https://doi.org/10.1007/BF01103772>.
4. Marquina D, Santos A, Peinado J. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol.* 2002;5(2):65-71. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>.
5. Woods DR, Bevan EA. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* 2009;51(1):115-126. <https://doi.org/10.1099/00221287-51-1-115>.
6. Magliani W, Conti S, Gerloni M, et al. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):369-400. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.369>.
7. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol.* 2012;3:421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>.
8. Bussey H, Sacks W, Galley D, et al. Yeast killer plasmid mutations affecting toxin secretion and activity and toxin immunity function. *Mol Cell Biol.* 1982;2(4):346-354. <https://doi.org/10.1128/mcb.2.4.346>.
9. Goto K, Totuka A, Kitano K, et al. Isolation and properties of a chromosome-dependent KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem.* 2011;54(2):505-509. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.505>.
10. Goto K, Fukuda H, Kichise K, et al. Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem.* 1991;55(8):1953-1958. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.1953>.
11. Schmitt MJ, Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev.* 2002;26(3):257-276. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00099-2).
12. Wickner R. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol.* 2002;46(1):347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.46.1.347>.
13. Adler J, Wood HA, Bozarth RF. Virus-like particles from killer, neutral, and sensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol.* 1976;17(2):472-476. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-22-3-387>.
14. Bevan EA, Herring AJ, Mitchell DJ. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. *Nature.* 1973;245(5420):81-86. <https://doi.org/10.1038/245081b0>.
15. Fink GR, Styles CA. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1972;69(10):2846-2849. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.10.2846>.
16. Hanes SD, Burn VE, Sturley SL, et al. Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83(6):1675-1679. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.6.1675>.
17. Schmitt MJ, Breinig F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(3):212-221. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>.
18. Naitow H, Tang J, Canady M, et al. L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and

- mRNA decapping mechanism. *Nat Struct Biol.* 2002;9(10):725-728. <https://doi.org/10.1038/nsb844>.
19. Melvydas V, Bružauskaitė I, Gedminienė G, Šiekštelė R. A novel *Saccharomyces cerevisiae* killer strain secreting the X factor related to killer activity and inhibition of *S. cerevisiae* K1, K2 and K28 killer toxins. *Indian J Microbiol.* 2016;56(3):335-343. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0589-1>.
20. Schmitt MJ, Schernikau G. Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol.* 1997;35:281-285.
21. Tipper DJ, Schmitt MJ. Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol.* 1991;5(10):2331-2338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02078.x>.
22. Zhu H, Bussey H. Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol Cell Biol.* 1991;11(1):175-181. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.1.175>.
23. Bussey H, Saville D, Hutchins K, Palfree RG. Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1979;140(3):888-892.
24. Hutchins K, Bussey H. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 → 6)-β-d-glucan. *J Bacteriol.* 1983;154(1):161-169.
25. Schmitt MJ, Radler F. Blockage of cell wall receptors for yeast killer toxin KT28 with antimannoprotein antibodies. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(8):1615-1618. <https://doi.org/10.1128/aac.34.8.1615>.
26. Lukša J, Podoliankaitė M, Vepšaitė I, et al. Yeast β-1,6-glucan is a primary target for the *Saccharomyces cerevisiae* K2 toxin. *Eukaryot Cell.* 2015;14(4):406-414. <https://doi.org/10.1128/EC.00287-14>.
27. Servienė E, Lukša J, Orentaitė I, et al. Screening the budding yeast genome reveals unique factors affecting K2 toxin susceptibility. *PLoS One.* 2012;7(12):e50779-e50779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050779>.
28. Schmitt M, Radler F. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol.* 1987;133(12):3347-3354. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-12-3347>.
29. Giesselmann E, Becker B, Schmitt MJ. Production of fluorescent and cytotoxic K28 killer toxin variants through high cell density fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):228. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0844-0>.
30. Takita MA, Castilho-Valavicius B. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast.* 1993;9(6):589-598. <https://doi.org/10.1002/yea.320090605>.
31. Kurzweilová H, Sigler K. Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. *Arch Microbiol.* 1994;162(3):211-214. <https://doi.org/10.1007/BF00314477>.
32. Breinig F, Tipper DJ, Schmitt MJ. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell.* 2002;108(3):395-405. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00634-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00634-7).
33. Schmitt MJ, Compain P. Killer-toxin-resistant kre12 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K1 membrane receptor. *Arch Microbiol.* 1995;164(6):435-443. <https://doi.org/10.1007/s002030050286>.
34. Gier S, Schmitt MJ, Breinig F. Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating k1 mechanisms of action and immunity. *Toxins (Basel).* 2017;9(11). pii:E345. <https://doi.org/10.3390/toxins9110345>.
35. Novotna D, Flegelova H, Janderova B. Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2004;4(8):803-813. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.007>.
36. Orentaite I, Poranen MM, Oksanen HM, et al. K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2016;16(2): fow003. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow003>.
37. Eisfeld K, Riffer F, Mentges J, et al. Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol.* 2000;37(4):926-940. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02063.x>.
38. Schmitt MJ, Tipper DJ. Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology.* 1995;213(2):341-351. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0007>.
39. Becker B, Schmitt MJ. Yeast killer toxin K28: biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. *Toxins (Basel).* 2017;9(10). pii:E333. <https://doi.org/10.3390/toxins9100333>.
40. Suzuki Y, Schwartz SL, Mueller NC, et al. Cysteine residues in a yeast viral A/B toxin crucially control host cell killing via pH-triggered disulfide rearrangements. *Mol Biol Cell.* 2017;28(8):1123-1131. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-12-0842>.
41. Heiligenstein S, Eisfeld K, Sendzik T, et al. Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. *EMBO J.* 2006;25(20):4717-4727. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601350>.
42. Schmitt MJ, Tipper DJ. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1990;10(9):4807-4815. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.9.4807>.

43. Schmitt MJ, Klavehn P, Wang J, et al. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*. 1996;142(9):2655-2662. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-9-2655>.
44. Reiter J, Herker E, Madeo F, et al. Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. 2005;168(3):353-358. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408071>.
45. Skipper N. Analysis and utilization of the preprotoxin gene encoded in the M1 double-stranded RNA of yeast. *Basic Life Sci*. 1986;40:215-226. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5251-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5251-8_17).
46. Zapun A, Jakob CA, Thomas DY, et al. Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure*. 1999;7(8):173-182. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80112-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80112-9).
47. Frand AR, Kaiser CA. Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*. 1999;4(4):469-477. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80198-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80198-7).
48. Page N, Gerard-Vincent M, Menard P, et al. A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*. 2003;163(3):875-894.
49. Santos A, Del Mar Alvarez M, Mauro MS, et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *J Biol Chem*. 2005;280(51):41881-41892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507014200>.
50. Carroll SY, Stirling PC, Stimpson HE, et al. A yeast killer toxin screen provides insights into a/b toxin entry, trafficking, and killing mechanisms. *Dev Cell*. 2009;17(4):552-560. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.08.006>.
51. McBride RC, Boucher N, Park DS, et al. Yeast response to LA virus indicates coadapted global gene expression during mycoviral infection. *FEMS Yeast Res*. 2013;13(2):162-179. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12019>.
52. Lukša J, Ravoitytė B, Konovalovas A, et al. Different metabolic pathways are involved in response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M viruses. *Toxins (Basel)*. 2017;9(8). pii:E233. <https://doi.org/10.3390/toxins9080233>.
53. Masison DC, Blanc A, Ribas JC, et al. Decoying the cap- mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)- mRNA surveillance by a yeast antiviral system. *Mol Cell Biol*. 1995;15(5):2763-2771. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.5.2763>.
54. Wickner RB, Edskes HK. Yeast killer elements hold their hosts hostage. *PLoS Genet*. 2015;11(5):e1005139. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005139>.
55. Rowley PA, Ho B, Bushong S, et al. XRN1 Is a species-specific virus restriction factor in yeasts. *PLoS Pathog*. 2016;12(10):e1005890. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005890>.
56. Rowley PA. The frenemies within: viruses, retrotransposons and plasmids that naturally infect *Saccharomyces yeasts*. *Yeast*. 2017;34(7):279-292. <https://doi.org/10.1002/yea.3234>.
57. Suzuki G, Weissman JS, Tanaka M. [KIL-d] protein element confers antiviral activity via catastrophic viral mutagenesis. *Mol Cell*. 2015;60(4):651-660. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.020>.
58. Rodriguez-Cousino N, Gomez P, Esteban R. Variation and distribution of L-A helper totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts producing different killer toxins. *Toxins (Basel)*. 2017;9(10). pii:E313. <https://doi.org/10.3390/toxins9100313>.
59. Проворов Н.А. Молекулярные основы симбиогенной эволюции: от свободноживущих бактерий к органеллам // Журнал общей биологии. — 2005. — Т. 66. — № 5. — С. 371–388. [Provorov NA. Molecular basis of symbiogenic evolution: from free-living bacteria towards organelles. *Journal of general biology*. 2005;66(5):371-388. (In Russ.)]
60. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>.
61. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-86. <https://doi.org/10.1038/nature05983>.
62. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol*. 2006;342:33-47. <https://doi.org/10.1385/1-59745-123-1:33>.
63. Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1779(11):663-667. <https://doi.org/10.1016/j.bbarm.2008.08.005>.
64. Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, et al. RNAi in budding yeast. *Science*. 2009;326(5952):544-550. <https://doi.org/10.1126/science.1176945>.
65. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>.
66. Lejeune E, Allshire RC. Common ground: small RNA programming and chromatin modifications. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(3):258-265. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.03.005>.
67. Wang L, Yue L, Chi Z, et al. Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus*. *Dis Aquat Organ*. 2008;80(3):211-218. <https://doi.org/10.3354/dao01943>.
68. Dukare AS, Paul S, Nambi VE, et al. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(9):1498-513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>.

69. Starmer WT, Ganter PF, Aberdeen V, et al. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol.* 1987;33(9):783-796. <https://doi.org/10.1139/m87-134>.
70. Abranches J, Morais PB, Rosa CA, et al. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can J Microbiol.* 1997;43(4):328-336. <https://doi.org/10.1139/m97-046>.
71. Pieczynska MD, de Visser JA, Korona R. Incidence of symbiotic dsRNA “killer” viruses in wild and domesticated yeast. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(8):856-859. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12086>.
72. Muccilli S, Restuccia C. Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms.* 2015;3(4):588-611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>.
73. Ferraz LP, Cunha T, da Silva AC, Kupper KC. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiol Res.* 2016;188-189:72-79. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.012>.
74. Magliani W, Conti S, Travassos LR, et al. From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;288(1):1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01340.x>.

## ✿ Информация об авторах

**Елена Викторовна Самбук** — доцент, профессор кафедры генетики и биотехнологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN: 8281-8020. E-mail: esambuk@mail.ru.

**Дмитрий Михайлович Музаев** — инженер. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

**Андрей Михайлович Румянцев** — младший научный сотрудник. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN: 9335-1184. E-mail: rumyantsev-am@mai.ru.

**Марина Владимировна Падкина** — доцент, профессор кафедры генетики и биотехнологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN: 7709-0449. E-mail: mpadkina@mail.ru.

## ✿ Authors and affiliations

**Elena V. Sambuk** — Associate Professor, Professor of the Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 8281-8020. E-mail: esambuk@mail.ru.

**Dmitriy M. Muzaev** — engineer. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. E-mail: dmmuzaev@yandex.ru.

**Andrey M. Rumyantsev** — junior research assistant. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 9335-1184. E-mail: rumyantsev-am@mai.ru.

**Marina V. Padkina** — Associate Professor, Professor of the Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. SPIN: 7709-0449. E-mail: mpadkina@mail.ru.