

## АДФ/АТФ ТРАНСЛОКАТОР И РЕАКЦИЯ КЛЕТКИ НА СТРЕССОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Е.Г. Рихванов, И.В. Федосеева, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева,  
А.В. Федяева, А.В. Степанов, Г.Б. Боровский  
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,  
Иркутск, e-mail: eugene@sifibr.irk.ru

Митохондрия является основным источником получения энергии в клетке, но кроме своей непосредственной функции митохондрии могут регулировать экспрессию ядерных генов в результате процесса, известного как ретроградная регуляция. Ранее было показано, что мягкое тепловое воздействие приводит к повышению митохондриального мембранного потенциала в клетках дрожжей и растений (Rikhvanov et al., 2005; 2007), и это событие является сигналом, запускающим синтез белков теплового шока (БТШ). Однако остался неизвестным механизм повышения  $mt\Delta\psi$  при тепловом воздействии. Теоретически повышение  $mt\Delta\psi$  может наблюдаться в клетке в двух случаях: при повышении уровня NADH или недостатке АДФ. Уровень АДФ в митохондриях контролирует митохондриальный АДФ/АТФ транслокатор, который в клетках *Saccharomyces cerevisiae* кодируется ядерными генами *AAC1*, *AAC2* и *AAC3*. Поэтому целью настоящей работы являлось изучение роли этих белков в термотолерантности дрожжевой клетки, активации экспрессии БТШ, продукции АФК и изменении  $mt\Delta\psi$  при тепловом воздействии.

### Методы

В работе использовали штаммы *Saccharomyces cerevisiae* W303-1В и изогенные ему мутанты, несущие делеции в генах, кодирующих АДФ/АТФ транслокатор: *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ*. В качестве дополнительного контроля использовали мутант *petite*, лишенный митохондриальной ДНК. Выращивание дрожжей, определение термотолерантности, SDS-электрофорез, иммуноблоттинг, определение уровня АФК и значения  $mt\Delta\psi$  проводили согласно ранее опубликованным методикам (Fedoseeva et al., 2017).

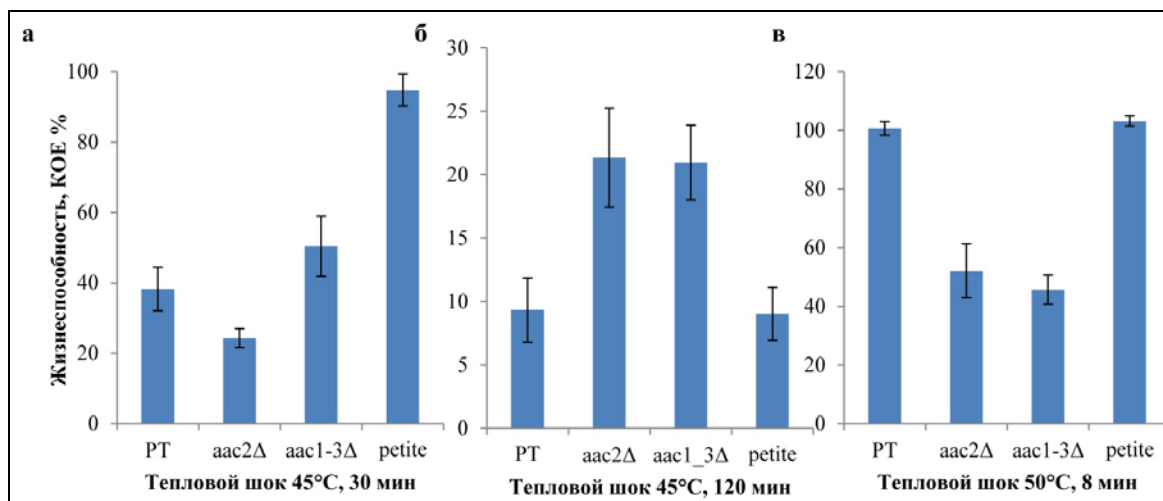
### Результаты и обсуждение

Энергетический метаболизм *S. cerevisiae* легко контролируется. В процессе логарифмического роста на глюкозе способность митохондрий дрожжей производить АТФ репрессируется, клетки получают энергию, главным образом, за счет гликолиза. В стационарной фазе энергетический метаболизм активируется. В этих условиях происходит истощение в среде глюкозы, и клетки утилизируют образовавшийся в среде инкубации этанол в ходе митохондриального окислительного фосфорилирования. Поэтому, чтобы установить роль АДФ/АТФ транслокатора в реакции дрожжей на тепловое воздействие использовали клетки, находящиеся в логарифмической и стационарной фазах роста.

Для изучения базовой термотолерантности дрожжи, выращенные при 30 °С на среде с глюкозой до логарифмической или стационарной фазы, обрабатывали при 45 °С. В логарифмической фазе не наблюдалось достоверных различий между термотолерантностью изучаемых мутантов и родительского типа. Термотолерантность мутанта *petite*, напротив, повышалась (рис. 1, а). Совершенно другие результаты были получены в стационарной фазе роста. В этих условиях эксперимента тройной мутант *aac1Δaac2Δaac3Δ* значительно лучше переживал летальное тепловое воздействие (рис. 1, б). Таким образом, в условиях репрессированного дыхательного метаболизма утрата АДФ/АТФ транслокатора не оказывает влияния на базовую термотолерантность, но повышает ее при активации энергетического метаболизма.

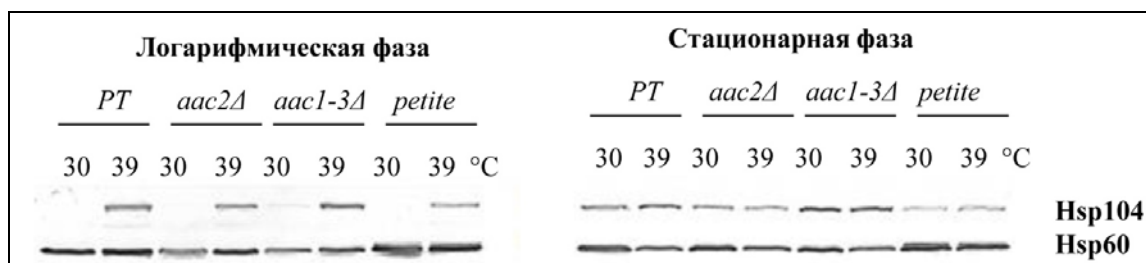
Для изучения индуцированной термотолерантности дрожжи, выращенные при 30 °С на среде с глюкозой до логарифмической фазы роста, предварительно обрабатывали при 39 °С, для индукции защитной реакции, затем подвергали жесткому тепловому

му шоку при 50 °С. Результаты показали (рис. 1, в), что несмотря на подавление глюкозой дыхательной активности митохондрий, функционирование АДФ/АТФ транслокатора имеет важное значение для развития индуцированной термотолерантности. Делеция гена *AAC2*, а также тройная делеция генов *AAC1*, *AAC2* и *AAC3* приводили к снижению способности клеток развивать индуцированную термотолерантность. В то же время, утрата мтДНК в клетках мутанта *petite* никак не влияла на этот процесс. Следовательно, даже в условиях репрессированного дыхательного метаболизма АДФ/АТФ транслокатор участвует в развитии защитной реакции дрожжей на тепловое воздействие.



**Рис. 1.** Базовая (а и б) и индуцированная (в) термотолерантность в клетках РТ и мутантов *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ*.

Клетки выращивали на среде с глюкозой до достижения логарифмической (а, в) или стационарной фазы роста (б) и подвергали действию теплового шока. Индуцированную термотолерантность (в) определяли после предварительной тепловой обработки при 39°C.



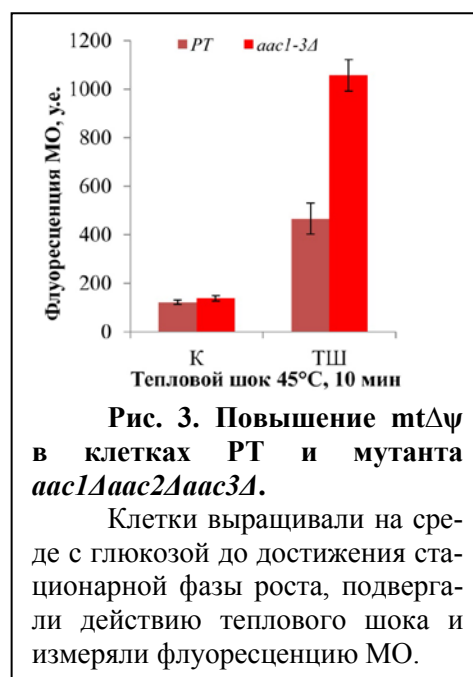
**Рис. 2.** Синтез Hsp104 и Hsp60 в клетках РТ и мутантов *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ*.

Клетки выращивали на среде с глюкозой до достижения логарифмической или стационарной фазы роста, подвергали действию теплового шока, выделяли общий белок и проводили вестерн-блоттинг.

Развитие индуцированной термотолерантности определяется активацией экспрессии генов БТШ. Действительно, в логарифмической фазе роста при 30 °С не наблюдалось синтеза Hsp104. Обработка при 39 °С значительно повышала его количество, что сопровождалось развитием индуцированной термотолерантности. Несмотря на то, что делеции *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* приводили к подавлению индуцированной термотолерантности (рис. 1, в), не было обнаружено эффекта изучаемых делеций на индукцию синтеза Hsp104 (рис. 2). Переход клеток дрожжей в стационарную фазу значительно повышал конститутивный уровень синтеза Hsp104, тепловое воздействие при 39 °С уже не приводило к увеличению его синтеза. Также как в логарифмической фазе роста, в стационарной фазе не было обнаружено эффекта делеций *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* на синтез Hsp104. В то же время, синтез Hsp104 снижался приблизительно в два раза у мутанта *petite*, как в логарифмической фазе, так и в стационарной фазе роста (см. рис. 2).

Развитие индуцированной термотолерантности определяется активацией экспрессии генов БТШ. Действительно, в логарифмической фазе роста при 30 °С не наблюдалось синтеза Hsp104. Обработка при 39 °С значительно повышала его количество, что сопровождалось развитием индуцированной термотолерантности. Несмотря на то, что делеции *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* приводили к подавлению индуцированной термотолерантности (см. рис. 1, в), не было обнаружено эффекта изучаемых делеций на индукцию синтеза Hsp104 (см. рис. 2). Переход клеток дрожжей в стационарную фазу значительно повышал конститутивный уровень синтеза Hsp104, тепловое воздействие при 39 °С уже не приводило к увеличению его синтеза. Также как в логарифмической фазе роста, в стационарной фазе не было обнаружено эффекта делеций *aac2Δ* и *aac1Δaac2Δaac3Δ* на синтез Hsp104. В то же время, синтез Hsp104 снижался приблизительно в два раза у мутанта *petite*, как в логарифмической фазе, так и в стационарной фазе роста (см. рис. 2).

Развитие индуцированной термотолерантности и синтез БТШ при тепловом воздействии сопровождаются повышением mtΔψ (Rikhvanov et al., 2005; Rikhvanov et al., 2007). По-видимому, повышение mtΔψ играет важную роль в развитии индуцированной термотолерантности и экспрессии генов БТШ, поскольку агенты, снижающие mtΔψ, подавляют оба этих процесса. Что же является причиной повышения mtΔψ? Нами было показано, что повышение mtΔψ в клетках дрожжей зависит от функционирования внешней NADH-дегидрогеназы. Делеция гена *NDE1*, кодирующего внешнюю NADH-дегидрогеназу, подавляла повышение mtΔψ (Fedoseeva et al., 2017). Этот результат позволил предположить, что при тепловом шоке повышается уровень NADH, что и является причиной повышения mtΔψ. Однако делеция *nde1Δ* снижала mtΔψ только в условиях активного дыхательного метаболизма и не влияла на этот процесс в логарифмической фазе, в условиях глюкозной репрессии дыхания (Fedoseeva et al., 2017). Поэтому было предположено, что повышение mtΔψ при тепловом воздействии может происходить также в результате ингибирования АДФ/АТФ транслокатора. АДФ/АТФ транслокатор осуществляет обмен АДФ на АТФ через внутреннюю митохондриальную мембрану. Нарушение этого процесса теоретически должно приводить к нарушению функционирования F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ синтазы и, соответственно, к повышению mtΔψ. Действительно предварительные эксперименты, проведенные с использованием клеток дрожжей в стационарной фазе, показали, что тепловой шок вызывает гораздо более значительное повышение mtΔψ клетках *aac1Δaac2Δaac3Δ*, чем в клетках родительского типа (рис. 3). Полученные результаты указывают, что подавление активности АДФ/АТФ транслокатора при тепловом воздействии одна из причин повышения mtΔψ, что, в свою очередь, является триггером для запуска экспрессии БТШ.



**Рис. 3. Повышение mtΔψ в клетках PT и мутанта *aac1Δaac2Δaac3Δ*.**

Клетки выращивали на среде с глюкозой до достижения стационарной фазы роста, подвергали действию теплового шока и измеряли флуоресценцию MO.

#### Литература

- Rikhvanov E.G., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Rachenko E.I., Knorre D.A., Voinikov V.K. Do Mitochondria regulate the heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*? // Curr. Genet. – 2005. – V. 48. – P. 44–59.
- Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., Stupnikova I.V., Stepanov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture // Plant J. – 2007. – V. 52. – P. 763–778.
- Fedoseeva I.V., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Fedyayeva A.V., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Borovskii G.B., Rikhvanov E.G. The role of flavin-containing enzymes in mitochondrial membrane hyperpolarization and ROS production in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions // Sci. Rep. – 2017. – V. 7: 2586.