

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ТЕПЛОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ С НАРУШЕНИЕМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ

И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, fedoseeva@sifibr.irk.ru

Аннотация. Основной причиной гибели дрожжевой клетки при умеренном тепловом шоке является повышение продукции активных форм кислорода (АФК). Митохондрии вносят основной вклад в продукцию АФК при тепловом воздействии. Причиной усиления продукции АФК является повышение митохондриального мембранного потенциала (ММП). Таким образом, повышение ММП запускает программу гибели клеток дрожжей при умеренном тепловом шоке. В то же время, повышение ММП во время мягкого теплового стресса активируют защитную программу, направленную на повышение устойчивости.

Ключевые слова: митохондрии, активные формы кислорода, митохондриальный мембранный потенциал, белки теплового шока, термотолерантность

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-777-780

Долгое время митохондрии рассматривались исключительно как энергетические станции клетки, но результаты, полученные в последние десятилетия, показали, что производство энергии – не единственная функция митохондрий. Оказалось, что митохондрии активно участвуют в развитии программированной клеточной гибели и могут регулировать экспрессию ядерных генов в процессе, известном как митохондриальная ретроградная регуляция. Однако, как осуществляется коммуникация между митохондрией и остальными компартментами клетки остается к настоящему времени не известным.

Клетки *Saccharomyces cerevisiae* представляют собой уникальную модель, которая, в отличие от растений, позволяет отделить процесс окислительного фосфорилирования от других функций митохондрий. Энергетический метаболизм дрожжей можно включать и выключать, используя питательные среды с различными источниками углерода. В клетках дрожжей можно получить *petite* мутанты, у которых отсутствует митохондриальная ДНК, а, следовательно, и ряд компонентов дыхательной цепи. Но даже у таких мутантов функционируют митохондрии, поддерживается митохондриальный мембранный потенциал, и это является необходимым условием для поддержания жизнеспособности клетки. Поэтому в данной работе изучали роль в термотолерантности, используя дрожжи, находящиеся в логарифмической фазе на среде с глюкозой, в условиях с репрессированным процессом окислительного фосфорилирования. В этих условиях клетки наименее устойчивы к тепловому воздействию, параллельно происходит более значительное повышение продукции активных форм кислорода (АФК). Более того, именно в этих условиях в ответ на тепловое воздействие клетки синтезируют белки теплового шока (БТШ).

Считается, что основной причиной гибели при тепловом шоке является денатурация и агрегация клеточных белков [Kubota, 2009]. Очевидно, что усиление генерации АФК вносит существенный вклад в активацию процесса гибели при тепловом шоке как растительной [Qu et al., 2013], так и дрожжевой клетки [Mogano et al., 2012]. Однако механизм, в результате которого происходит усиление генерации АФК, изучен явно недостаточно. Более того, была неизвестна роль митохондрий дрожжей в этом процессе.

Чтобы изучить роль митохондрий в термотолерантности дрожжей изучали, как нарушение функционирования митохондрий повлияет на способность клеток дрожжей переживать действие летального теплового шока. Для этого использовали протонофоры (СССР, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, и ДНФ, 2,4-динитрофенол), агенты, снижающие митохондриальный мембранный потенциал, а также мутант *petite* [Pyatrikas et al., 2015]. Оказалось, что в обоих случаях наблюдалось значительное повышение устойчивости дрожжей к умеренному тепловому воздействию. Повышение жесткости теплового шока снижало протекторный эффект протонофоров и мутации *petite*. На основании этих результатов были сделаны выводы: во-первых, митохондрии играют важную роль в термотолерантности дрожжевой клетки, поскольку нарушение их функций повышает их термотолерантность, а, во-вторых, механизм гибели клетки различается в зависимости от силы теплового воздействия.

Отнюдь не любое нарушение функционирования митохондрий приводит к повышению термотолерантности. Митохондриальная ДНК кодирует ограниченное количество митохондриальных белков, большая их часть кодируется ядерной ДНК, синтезируется на цитоплазматических рибосомах, а затем транспортируется в органеллу. Делеции ядерных генов, кодирующие отдельные митохондриальные белки, такие как внешние NADH-дегидрогеназы и АДФ/АТФ транслокатор, не приводили к заметному снижению термотолерантности. В то же время, делеция гена *NDII*, кодирующего внутреннюю NADH-дегидрогеназу, значительно повышала термотолерантность дрожжей.

Известно, что мутация *petite*, а также делеция *ndi1* [Guaragnella et al., 2012] ингибируют развитие программированной клеточной гибели (ПКГ) в клетках дрожжей при различных воздействиях. Эти факты, а также протекторный эффект циклогексимида на термотолерантность [Рихванов и др., 2014], указывают, что в условиях умеренного теплового воздействия гибель дрожжей имеет программированный характер.

Другим индикатором развития ПКГ является усиление продукции активных форм кислорода (АФК) [Guaragnella et al., 2012]. Продукция АФК усиливается при различных стрессовых воздействиях, в том числе и при тепловом шоке. Действительно, умеренный тепловой шок вызывал значительное усиление продукции АФК. Добавление антиоксиданта аскорбиновой кислоты подавляло продукцию АФК и одновременно защищало клетки от гибели [Pyatrikas et al., 2015]. Таким образом, генерация АФК при умеренном тепловом воздействии является основной причиной гибели клеток дрожжей. Имеющиеся факты позволяют утверждать, что именно митохондрии продуцируют АФК при тепловом воздействии. Во-первых, нарушение митохондриальных функций, в результате обработки протонофорами СССР и ДНФ, или использования мутантов *petite*, не только защищало клетки от гибели, но и эффективно подавляло усиление продукции АФК. Во-вторых, с помощью флуоресцентной микроскопии продемонстрирована непосредственная митохондриальная локализация АФК [Pyatrikas et al., 2015; Fedoseeva et al., 2017].

Следует отметить, что зависимость между продукцией АФК и гибелью клетки при тепловом воздействии не всегда однозначна. Делеция *ndi1*, которая значительно повышала термотолерантность дрожжей, не имела никакого эффекта на продукцию АФК при тепловом шоке. Очевидно, что, как и в случае других апоптотических стимулов, эффект *Ndi1p* на термотолерантность не зависит от ее NADH дегидрогеназной активности. Показано, что обработка пероксидом водорода и уксусной кислотой вызывает выход *Ndi1p* из митохондрий в цитозоль, где этот белок и запускает программу гибели клетки [Cui et al., 2012].

Известно, что продукция АФК в изолированных митохондриях повышается в зависимости от повышения митохондриального мембранного потенциала (ММП), а добавление протонофоров подавляет оба этих процесса [Korshunov et al., 1997]. Действительно, повышение продукции АФК в клетках дрожжей при тепловом шоке сопровождалось кратковременным повышением ММП. Подавление повышения ММП и соответственно, продукции АФК наблюдалось не только при обработке протонофорами, но и при добавлении аскорбиновой кислоты. На этом основании было предположено, что повышение ММП при тепловом шоке стимулирует продукцию АФК в клетках дрожжей. Вероятно, повышение ММП является следствием нарушения активности АТФ/АДФ траслокатора. Одновременная делеция генов *AAC1*, *AAC2* и *AAC3*, кодирующих АТФ/АДФ траслокатор, приводила к значительному повышению ММП, как в контрольных условиях, так и в условиях теплового шока. Отметим, однако, что повышение ММП в клетках тройного *aac1aac2aac3Δ* мутанта не сопровождалось повышением продукции АФК. Таким образом, в ходе проведенного исследования было выявлено, что тепловое воздействие вызывает повышение ММП, что приводит к усилению продукции АФК, что, в свою очередь является причиной гибели клетки.

На следующем этапе изучали сигнальную роль митохондрий при тепловом воздействии. Мягкое тепловое воздействие (39 °С) вызывает у всех изученных организмов активацию защитной программы (индуцированная термотолерантность), которая повышает устойчивость к последующему жесткому тепловому воздействию. Развитие этой программы определяется активацией экспрессии генов белков теплового шока (БТШ). Было предположено, что митохондрии дрожжевой клетки в процессе ретроградной регуляции активируют экспрессию генов БТШ при тепловом воздействии. Действительно, добавление протонофоров во время предварительного мягкого теплового воздействия, а также мутация *petite* подавляли развитие устойчивости к жесткому тепловому шоку. Одновременно наблюдалось подавление синтеза белка Hsp104p [Федосеева и др., 2014]. Отметим, что эффект протонофоров и мутации *petite* на активацию защитной программы при 39 °С был полностью противоположен, если клетки сразу же подвергали умеренному повреждающему тепловому воздействию (45 °С). В одном случае наблюдалось повышение устойчивости, а в другом снижение. Было предположено, что, также как и в случае развития процесса гибели, мягкое тепловое воздействие вызывает в клетке повышение ММП, и это событие стимулирует продукцию АФК, которые, в свою очередь, активируют экспрессию генов БТШ. Однако это предположение пока не нашло своего подтверждения. Делеция генов *NDE2* и *NDI1*, а также тройная делеция генов *AAC1*, *AAC2* и *AAC3* значительно влияли на индуцированную термотолерантность, однако не было обнаружено никакого эффекта этих мутаций на продукцию АФК. Не обнаружено также отрицательного эффекта аскорбиновой кислоты на развитие индуцированной термотолерантности. Таким образом, развитие индуцированной термотолерантности зависит от повышения митохондриального мембранного потенциала при мягком тепловом воздействии, но следствие этого явления осталось неизвестным.

Литература

Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Федяева А.В. Механизм гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при тепловом шоке. Влияние циклогексимида на этот процесс // Биохимия. – 2014. – Т. 79, вып. 1. – С. 22–32.

Федосеева И.В., Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Пятрикас Д.В., Степанов А.В., Федяева А.В. Мутация *petite* подавляет индукцию синтеза белка теплового шока (HSP104) *Saccharomyces cerevisiae* в стационарной фазе роста // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 3. – С. 273–281.

Cui Y, Zhao S, Wu Z, Dai P, Zhou B. Mitochondrial release of the NADH dehydrogenase Ndi1 induces apoptosis in yeast // *Mol. Biol. Cell.* – 2012. V. 23. – P. 4373–4382.

Guaragnella N, Zdravlević M, Antonacci L, Passarella S, Marra E, Giannattasio S. The role of mitochondria in yeast programmed cell death // *Front. Oncol.* – 2012. – V. 2: 70.

Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 416. – P. 15–18.

Kubota H. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival // *J. Biochem.* 2009. – V. 146, No. 5. – P. 609–616.

Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The Response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* – 2012. – V. 190. – P.1157–1195.

Pyatrikas D.V., Fedoseeva I.V., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Stepanov A.V., Fedyaeva A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K., Rikhvanov E.G. Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions // *FEMS Microbiol Lett.* – 2015. – V. 362: fnv082.

Fedoseeva I. V. The role of flavin-containing enzymes in mitochondrial membrane hyperpolarization and ROS production in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions / I. V. Fedoseeva, D. V. Pyatrikas, A. V. Stepanov, A. V. Fedyaeva, N. N. Varakina, T. M. Rusaleva, G. B. Borovskii, E. G. Rikhvanov // *Scientific Reports.* – 2017. – V. 7: 2586.

Qu AL, Ding YF, Jiang Q, Zhu C. Molecular mechanisms of the plant heat stress response // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 432. – P. 203–207.

RESPONSE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELLS ON HEAT EXPOSURE IN DISRUPTING OF THE FUNCTIONING MITOCHONDRIA

I.V. Fedoseeva, E.G. Rikhvanov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, fedoseeva@sifibr.irk.ru

Abstract. The main cause of yeast cell death in moderate heat shock is increased production of reactive oxygen species (ROS). Mitochondria make the main contribution to the production of ROS under thermal exposure. Increased mitochondrial membrane potential (MMP) is the reason for increased ROS production. Thus, increased MMP runs the program the death of yeast cells upon moderate heat shock. At the same time, the increase of MMP during mild heat stress activate a protective program aimed at increasing resistance.

Keywords: *mitochondria, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, heat shock proteins, thermotolerance*