

УЧАСТИЕ ВНУТРЕННЕЙ И ВНЕШНИХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ NADH ДЕГИДРОГЕНАЗ В ОТВЕТЕ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ТЕПЛОВОЙ ШОК

И.В. Федосеева, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов,
А.В. Федяева, Н.Н. Варакина, Е.Г. Рихванов
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: fedoseeva@sifibr.irk.ru

Мягкий тепловой стресс индуцирует синтез белков теплового шока (БТШ) и развитие устойчивости к жесткому тепловому шоку. Это явление известно как индуцированная термотолерантность. Ранее было показано, что митохондрии участвуют в активации экспрессии БТШ (Рихванов и др., 2014). Продукция АФК рассматривается как вероятный триггер синтеза БТШ, а митохондрии могут быть его основным источником (Рихванов и др., 2014). Ранее нами было показано, что внутренняя и внешние митохондриальные NADH–дегидрогеназы дрожжей участвуют в повышении продукции АФК (Fedoseeva et al., 2017). В клетках дрожжей функционируют две внешние NADH–дегидрогеназы (*Nde1p* и *Nde2p*) и одна внутренняя (*Ndi1p*). Поэтому целью настоящей работы являлось изучение роли этих ферментов в ответе дрожжевой клетки на тепловое воздействие. Для этого сравнивали термотолерантность, индуцированную термотолерантность, индукцию синтеза *Hsp104p* и продукцию АФК в клетках дрожжей с нарушением функционирования митохондриальных NADH–дегидрогеназ.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (родительский тип, РТ) и мутанты, в которых отсутствуют внешние (*nde1Δ* и *nde2Δ*) и внутренняя (*ndi1Δ*) NADH–дегидрогеназы. Эксперименты выполняли по методикам, опубликованным ранее (Fedoseeva et al., 2017).

Результаты

При выращивании дрожжей в качестве источника углерода использовали глюкозу (репрессированный дыхательный метаболизм) или галактозу (активный дыхательный метаболизм). Глюкоза подавляет дыхательный метаболизм митохондрий, в том числе, активность митохондриальных NADH–дегидрогеназ. Галактоза – слабо ферментируемый сахар и, соответственно, активирует NADH–дегидрогеназы. Сравнение базовой термотолерантности на среде с глюкозой показало, что клетки *ndi1Δ* мутанта отличаются повышенной устойчивостью к тепловому воздействию. У мутанта *nde2Δ* также незначительно повышалась термотолерантность. Различий между *nde1Δ* мутантом и РТ не было обнаружено. При активации дыхательного метаболизма на среде с галактозой различий по термотолерантности не наблюдалось. Таким образом, делеция гена *NDI* и в меньшей степени *NDE2* повышает термотолерантность в условиях репрессированного дыхательного метаболизма. Этот эффект подавляется при активации дыхательного метаболизма.

На следующем этапе изучали эффект делеций изучаемых генов на развитие индуцированной термотолерантности. Для этого клетки, выращенные при 30 °С на среде с глюкозой или галактозой, обрабатывали при 39 °С и подвергали жесткому тепловому воздействию 50 °С. Как и ожидалось, предварительная обработка 39 °С повышала устойчивость клеток при последующем жестком тепловом воздействии. На среде с глюкозой утрата *NDE1* не влияла на развитие индуцированной термотолерантности, а делеция генов *NDE2* и *NDI*, напротив, ее стимулировала (рис. 1, а). Другие результаты были получены при использовании галактозы (см. рис. 1, а). Не было обнаружено различий между клетками мутантов *nde2Δ* и *ndi1Δ* и РТ. Интересно отметить, что отсутствие гена *NDE1* снижало развитие индуцированной термотолерантности.

Синтез Hsp104p повышается при мягком тепловом воздействии 39 °С (рис. 1, б). Несмотря на то, что утрата изучаемых генов по-разному влияла на индуцированную термотолерантность (см. рис. 1, а), не было обнаружено значительных различий по уровню синтеза Hsp104p в клетках РТ и мутантов как при инкубации клеток на среде с глюкозой, так и с галактозой (см. рис. 1, б).

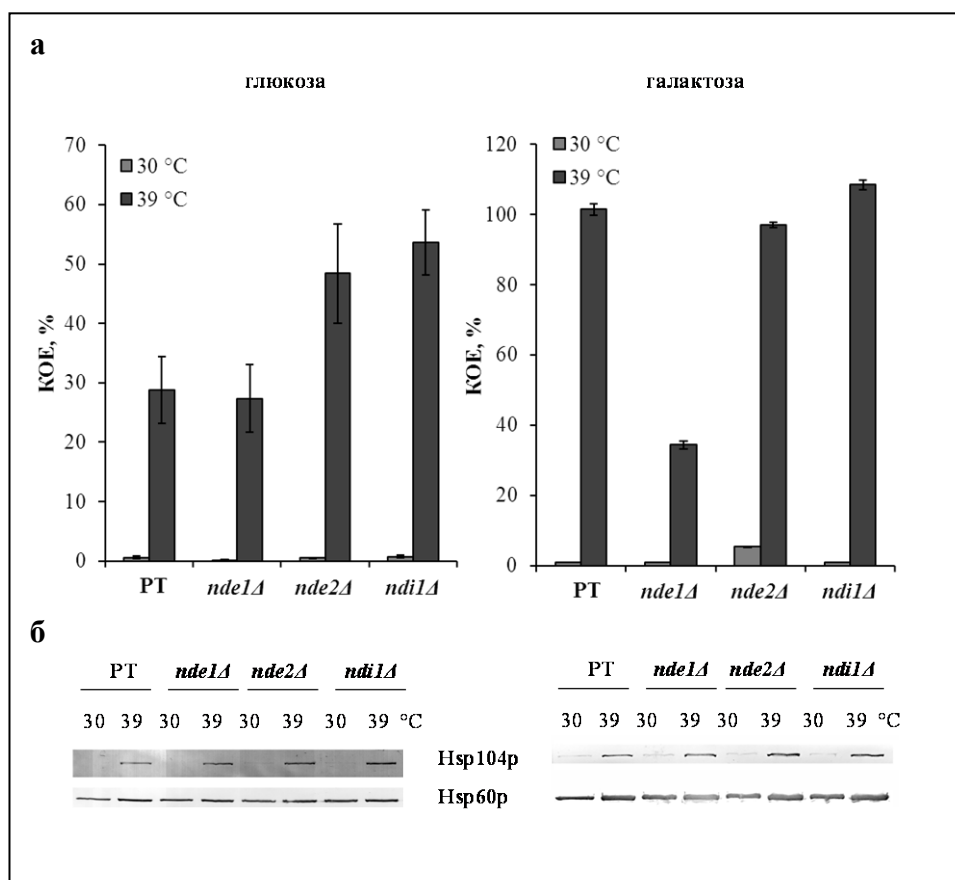


Рис. 1. Индуцированная термотолерантность (а) и индукция синтеза Hsp104p (б) в клетках мутантов *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ*.

Клетки штаммов родительского типа W303-1A (РТ) и мутантов *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ* выращивали на среде с глюкозой или галактозой инкубировали при 39 °С (30 мин) и (а) подвергали действию теплового шока 50 °С (глюкоза – 8 мин; галактоза – 16 мин), после чего определяли выживаемость с помощью подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ) спустя 24-48 ч инкубации при 30 °С, или (б) выделяли общий белок и проводили вестерн-блоттинг. Представлены данные трёх или четырёх независимых экспериментов ± SE.

Повышение продукции АФК рассматривается как индуктор экспрессии стрессовых генов (Рихванов и др., 2014). Тепловой шок 45 °С вызывал значительное усиление продукции АФК как на глюкозе, так и на галактозе (рис. 2). На среде с глюкозой не наблюдалось различий по уровню АФК. Напротив, на среде с галактозой утрата генов *NDE1* и *NDI1* снижала продукцию АФК.

Обсуждение

В условиях репрессированного дыхательного метаболизма (при выращивании на глюкозе) наблюдается снижение активности ряда митохондриальных ферментов, в том числе митохондриальных NADH–дегидрогеназ (Mailloux, 2015). Полученные результаты показывают, что, несмотря на репрессию АТФ-генерирующих функций митохондрий, Nde2p и Ndi1p играют важную роль в ответе дрожжевой клетки на тепловое воздействие. Делеция генов, кодирующих эти ферменты, не влияла на синтез Hsp104p, но повышала базовую и индуцированную термотолерантность. Утрата этих генов не приводила к достоверному снижению продукции АФК. Поэтому не наблюдалось связи

между развитием индуцированной термотолерантности, синтезом Hsp104p и усилением продукции АФК при тепловом шоке.

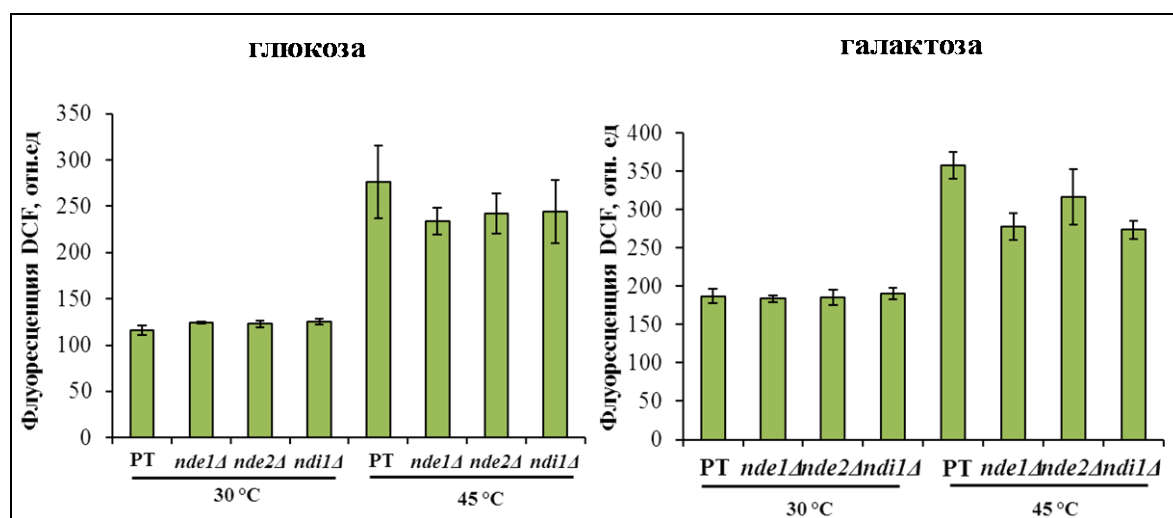


Рис. 2. Продукция АФК в клетках одиночных *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ* мутантов при тепловом шоке.

Клетки штаммов родительского типа W303-1A (PT), одиночных *nde1Δ*, *nde2Δ* и *ndi1Δ* мутантов выращивали на среде с глюкозой или галактозой и инкубировали при 45 °C. Флуоресценцию DCF (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) измеряли сразу же после окончания теплового шока 45 °C, 10 мин. Представлены данные трёх или четырёх независимых экспериментов ± SE.

Ген *NDI1* *S. cerevisiae* кодирует внутреннюю митохондриальную NADH-дегидрогеназу и является дрожжевым митохондриальным гомологом фактора, вызывающего апоптоз у млекопитающих (Li et al., 2006). Белок Ndi1p участвует в апоптозе при различных стимулах. Делеция этого гена повышает устойчивость к H₂O₂, ионам Mn и уксусной кислоте (Cui et al., 2012). Участие Ndi1p в апоптозе не зависит от его NADH-дегидрогеназной активности и определяется выходом N-конца этого белка из митохондрий в цитозоль.

Мы полагаем, что в условиях репрессированного дыхания Nde2p и Ndi1p выполняют аналогичную функцию в клетках дрожжей при тепловом шоке. Тепловое воздействие вызывает выход Ndi1p и, возможно, Nde2p из митохондрий в цитозоль, в результате смещается равновесие между защитной программой и программой клеточной гибели.

Литература

Рихванов Е.Г., Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Степанов А.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. Механизм функционирования кальциевой сигнальной системы у растений при действии теплового стресса. Роль митохондрий в этом процессе // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 155–169.

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.

Li W., Sun L., Liang Q., Wang J., Mo W., Zhou B. Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging // Mol. Biol. Cell. – 2006. – V. 17. – P. 1802–1811.

Mailloux R.J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species // Redox Biol. – 2015. – V. 4. – P. 381–398.

Fedosееva I.V., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Fedyaeva 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.