

На правах рукописи

РИХВАНОВ
Евгений Геннадьевич

**МИТОХОНДРИЯ КАК КРИТИЧЕСКОЕ ЗВЕНО
В ОТВЕТЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ И ДРОЖЖЕВОЙ КЛЕТКИ
НА ТЕПЛОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Иркутск – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный консультант:

доктор биологических наук,
профессор

Войников Виктор Кириллович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Константинов Юрий Михайлович

доктор биологических наук,
профессор

Щербаков Дмитрий Юрьевич

доктор биологических наук Тимофеева Ольга Арнольдовна

Ведущая организация:

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Защита диссертации состоится « 11 » сентября 2012 г. в 10 час. на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952) 510754; e-mail: mat-mod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан « 10 » июня 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 003.047.01,
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Митохондрии являются энергетическими станциями, которые обеспечивают клетку энергией. Кроме производства АТФ, эти органеллы могут регулировать экспрессию ядерных генов в ходе процесса, известного как ретроградная регуляция (Rhoads et al., 2006). Предполагается, что важную роль в этом процессе играет способность митохондрий генерировать активные формы кислорода (АФК) и модулировать содержание ионов Ca^{2+} в цитозоле (Юрина, Одинцова, 2010).

Твердо установлено, что митохондрии принимают активное участие в инициации программированной гибели клеток (ПГК) (Wang, Youle, 2009). Гибель клеток в процессе ПГК также зависит от усиления митохондриальной продукции АФК (Perrone et al., 2008) и нарушения гомеостаза внутриклеточного кальция (Szabadkai, Duchon, 2008). Известно, что тепловой шок инициирует ПГК в клетках животных и растений (Gabal, Sherman, 2002; Reape, McCabe, 2010). Развитие ПГК наблюдается в клетках дрожжей после действия самых различных воздействий (Skulachev, 2002; Гордеева и др., 2004), но неизвестно, происходит ли подобное событие в дрожжевой клетке после теплового шока.

Усиление генерации АФК при повышении температуры вносит существенный вклад в активацию гибели растительной (Suzuki, Mittler, 2006) и дрожжевой клетки (Davidson et al., 1996). При этом механизм, в результате которого усиливается генерация АФК, остается неизвестным. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле стимулирует генерацию АФК (Гордеева и др., 2003). Поэтому можно предполагать, что митохондрии дрожжей и растений, генерируя АФК, участвуя в регуляции уровня Ca^{2+} , играют важную роль в активации гибели клетки при тепловом шоке, а сам процесс происходит программируемым образом.

Чтобы защитить себя от повреждающего воздействия теплового шока, клетка синтезирует белки теплового шока (БТШ) (Richter et al., 2010). Считается, что БТШ, действуя в качестве молекулярных шаперонов, восстанавливают поврежденные при нагревании белки или, если это невозможно, способствуют их деградации в результате протеолиза (Kubota et al., 2009). В то же время известно, что БТШ, модулируя конформационное состояние определенных белков, могут подавлять либо, наоборот, активировать развитие ПГК в клетках животных (Arya et al., 2007). Выполняют ли подобную функцию БТШ растений и дрожжей, во многом остается неизвестным.

Другой важный вопрос, на который до сих пор нет четкого ответа, как активируется экспрессия БТШ? Классическая модель регуляции экспрессии генов БТШ, основанная на появлении в клетке денатурированных белков (Voellmy, Voellmann, 2007), не объясняет, почему агенты, которые не вызывают появления денатурированных белков, тем не менее, активируют экспрессию генов БТШ (Finka et al., 2011). С другой стороны, есть основания полагать, что усиление генерации АФК и повышение уровня кальция в цитозоле может как непосредственно, так и косвенным образом оказывать значительное влияние на экспрессию генов БТШ у растений (Saidi et al., 2011).

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что усиление продукции АФК и повышение уровня кальция в цитозоле, с одной стороны, регулируют запуск механизма гибели, а с другой стороны, активируют экспрессию стрессовых генов, которые защищают клетку от гибели (Креславский и др., 2012). По-

сколькимитохондрии являются одним из источников АФК (Blokhina, Fagerstedt, 2010) и активно влияют на концентрацию кальция в клетке (Медведев, 2005), можно предполагать, что эти органеллы, модулируя содержание этих вторичных мессенджеров, определяют жизнь и смерть дрожжевой и растительной клетки после теплового воздействия.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение роли митохондрий растительной и дрожжевой клетки в запуске программы гибели и активации экспрессии генов белков теплового шока в ответ на тепловое воздействие.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить зависимость между способностью дрожжей расти при температурах выше оптимальной и способностью выдерживать кратковременное повреждающее действие теплового шока.

2. Сравнить базовую термотолерантность дрожжей, различающихся по типу энергетического метаболизма.

3. Изучить эффект нарушения функционирования дыхательной цепи на изменение базовой термотолерантности и генерацию активных форм кислорода (АФК) при тепловом шоке в клетках дрожжей.

4. Установить зависимость между продукцией АФК в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Arabidopsis thaliana* при тепловом шоке и гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны.

5. Выявить признаки развития программированной гибели клеток (ПГК) после действия теплового шока различной интенсивности в клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana*.

6. Определить эффект повышения уровня белков теплового шока (БТШ) на развитие признаков ПГК в клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana* после действия теплового шока.

7. Изучить зависимость между действием митохондриальных ингибиторов и разобщителей на развитие индуцированной термотолерантности, экспрессию генов белков теплового шока и изменение потенциала на внутренней митохондриальной мембране в клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana*.

8. Изучить механизм повышения уровня кальция в цитозоле *S. cerevisiae* при тепловом стрессе и установить связь между этим явлением и функционированием митохондрий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дрожжи реализуют различные стратегии адаптации, чтобы существовать в условиях длительного повышения температуры и выдерживать повреждающее воздействие кратковременного теплового шока.

2. Механизмы гибели клеток дрожжей и растений при тепловом шоке существенно различаются в зависимости от интенсивности теплового воздействия. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны при умеренном тепловом шоке сопровождается повышением митохондриальной продукции активных форм кислорода, что является одной из причин гибели.

3. При умеренном тепловом шоке гибель клеток дрожжей и растений имеет признаки программированной гибели, которая подавляется в результате повышения количества БТШ.

4. Митохондрии растительной и дрожжевой клетки играют активную роль в развитии индуцированной термотолерантности к повреждающему тепловому шо-

ку. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны при мягком тепловом стрессе является необходимым условием для экспрессии генов БТШ.

Научная новизна работы. В результате сравнения способности различных видов дрожжей, а также мутантов *S. cerevisiae* переносить повреждающее действие теплового шока и расти при температуре выше оптимальной продемонстрировано, что между этими двумя явлениями отсутствует зависимость. Клетки дрожжей, неспособные поддерживать рост при повышенной температуре, могут лучше сохранять жизнеспособность после кратковременного жесткого теплового шока.

Впервые проведено сравнение термотолерантности видов дрожжей, различающихся по типу энергетического метаболизма. Показано, что способность дрожжей переживать повреждающее действие теплового шока зависит от того, какой энергетический метаболизм, бродильный или окислительный, используют дрожжи. Активация окислительного энергетического метаболизма в клетках *S. cerevisiae* сопровождается увеличением конститутивного синтеза Hsp104p и повышением термотолерантности.

Впервые показано, что повышение температуры вызывает гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны в клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana*, что сопровождается усилением продукции АФК и снижением жизнеспособности. В клетках *S. cerevisiae* гиперполяризация и значительное усиление продукции АФК наблюдаются при умеренном (45°C), но не при жестком тепловом шоке (50°C).

Анализ изучения параметров снижения жизнеспособности при умеренном тепловом шоке позволил впервые показать, что гибель дрожжей *S. cerevisiae* и *A. thaliana* имеет признаки программированной гибели клеток (ПГК): гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны, повышение продукции АФК, развитие процесса во времени и выход цитохрома *c* и Hsp60p из митохондрий. Гибель клеток *S. cerevisiae* при умеренном тепловом шоке подавляется в результате мутации *petite* и обработки циклогексимидом.

Изучение распределения цитоплазматического белка Hsp101p *A. thaliana* между митохондриальной и цитоплазматической фракциями белков впервые позволило показать, что Hsp101p при тепловом стрессе локализуется преимущественно в митохондриальной фракции белков. Гомологичный ему белок Hsp104p *S. cerevisiae* также обнаруживается в митохондриальной фракции клеток дрожжей.

Впервые показано, что повышение количества БТШ в результате предварительного теплового стресса ингибирует все наблюдаемые признаки развития ПГК в клетках растений и дрожжей, включая выход митохондриальных белков из митохондрий, повышение продукции АФК, а также снижает длительность гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны.

Установлено, что гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны является необходимым условием для активации экспрессии БТШ при тепловом стрессе. Агенты, которые при данных экспериментальных условиях подавляют гиперполяризацию, одновременно подавляют тепловую активацию экспрессии генов БТШ.

Изучен механизм повышения уровня кальция в цитозоле *S. cerevisiae* при тепловом стрессе. Повышение концентрации Ca^{2+} при повышении температуры происходит за счет функционирования низкоаффинной и высокоаффинной (Mid1p и Scl1p) систем транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану.

Впервые показано, что отсутствие белков Mid1p и Scl1p, регулирующих транспорт кальция через плазматическую мембрану, приводит к снижению потен-

циала на внутренней митохондриальной мембране и к подавлению дыхательной активности в клетках *S. cerevisiae*.

Научно-практическая значимость. Результаты, полученные в данной работе, позволили впервые доказать, что митохондрии растительной и дрожжевой клетки, модулируя продукцию активных форм кислорода (АФК) и участвуя в гомеостазе внутриклеточного кальция, определяют судьбу растительной и дрожжевой клетки при тепловом воздействии. В ответ на повышение температуры в клетке повышается потенциал на внутренней митохондриальной мембране, что в зависимости от интенсивности воздействия, либо запускает механизм гибели, либо активирует экспрессию белков теплового шока (БТШ), защищающих клетку от гибели. Способность митохондриальных ингибиторов и разобщителей, модулируя потенциал на внутренней митохондриальной мембране, ингибировать активацию экспрессии генов БТШ растений и дрожжей при тепловом стрессе, указывает, что обнаружен новый, ранее неизвестный, механизм, с помощью которого митохондрии регулируют экспрессию генов БТШ в ответ на стрессовое воздействие.

Изучение роли митохондрий в продукции АФК имеет огромное значение в связи с участием АФК в развитии многих заболеваний человека, таких как инсульт, инфаркт, нейродегенеративные заболевания. Понимание механизма образования АФК митохондриями может помочь в разработке новых терапевтических подходов и лекарственных средств для борьбы с этими заболеваниями. Описанный в работе феномен синергического действия теплового шока и митохондриальных ингибиторов на снижение жизнеспособности дрожжей может быть использован для разработки новых способов борьбы с патогенными микроорганизмами и лечения раковых опухолей, устойчивых к химиотерапии. В условиях глобального потепления и загрязнения окружающей среды антропогенными соединениями, влияющими на активность митохондрий, результаты диссертации могут быть использованы для оценки экологических и экономических рисков. Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по генетике, экологии и физиологии растений, использоваться в профильных научно-исследовательских институтах РАН, РАМН и РАСХН.

Апробация работы. Результаты исследования по теме диссертации были представлены на международной конференции «Environmental stress, genetic adaptation and evolution» (Франция, 1998), Международном конгрессе FEBS «Special Meeting 2003 on Signal Transduction» (Бельгия, 2003), XXXII Международном конгрессе FEBS «Molecular machine» (Австрия, 2007), Съезде общества физиологов растений России (1999, 2003, 2011), Съезде Русского ботанического общества (Санкт-Петербург, 1998), Международной конференции "Российская биоэнергетика: от молекул к клетке" (Москва, 2005), Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010), IX Международной конференции «Биология клеток *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008), Международной конференции «Проблемы современного картофелеводства» (Минск, 2008), Всероссийской научной конференции «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006), Всероссийской научной конференции «Стрессовые белки растений» (Иркутск, 2004), Всероссийской научной конференции «Структура и экспрессия митохондриального генома растений» (Иркутск, 2006), Всероссийской научной конференции «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2007), Всероссийской конференции «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды» (Иркутск, 2009), Научной конференции

«Сохранение биологического разнообразия геотермальных рефугиев Байкальской Сибири» (Иркутск, 1999).

Публикации. По материалам диссертации опубликована одна монография и 26 статей в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, приложения, а также списка литературы (785 источников, в том числе 27 российских и 748 иностранных). Работа изложена на 371 странице, содержит 71 рисунок и 1 таблицу.

Личное участие автора в получении научных результатов. Автор являлся руководителем проектов РФФИ № 02-04-48275-а и РФФИ № 07-04-01177-а, а также исполнителем проектов РФФИ № 07-04-01055-а и № 10-04-00921-а, при поддержке которых выполнялась данная работа. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, в статистической обработке и интерпретации полученных результатов, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали дрожжи *Rhodotorula rubra* и *Debaryomyces vanriijiae*, выделенные из горячих источников республики Бурятия, а также лабораторные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans*. Для проведения экспериментов дрожжи выращивали при 30°C на термостатируемой качалке на среде YEPD (с глюкозой), либо на среде YEPGal (с галактозой), либо на среде YEPЕ (с этанолом) до достижения логарифмической или стационарной фазы роста. Для изучения люминесценции экворина использовали минимальную среду SC (Sherman, 1991).

В работе также использовали гетеротрофные культуры клеток растений: а) культуру клеток *A. thaliana* (L.) Heynh (раса Columbia), полученную д.б.н. К.З. Гамбургом; б) культуру клеток сахарного тростника *Saccharum officinarum* (сорт РОJ2878), полученную в ИФР РАН, предоставленную к.б.н. В.Н. Шмаковым. Растительные культуры выращивали в темноте на термостатируемой качалке при 26°C на среде МС (Murashige, Scoog, 1962). Для экспериментов использовали культуру клеток, находящуюся в логарифмической фазе роста.

Определение жизнеспособности дрожжей проводили либо по количеству образовавшихся колониеобразующих единиц (КОЕ), либо с помощью окраски пропидий иодидом (ПИ, 10 мкг/мл), который окрашивает мертвые клетки, и флуоресцеин диацетатом (ФДА, 50 мкМ), который окрашивает живые клетки. Жизнеспособность растительных культур определяли по восстановлению 2,3,5 – трифенилтетразолиум хлорида (ТТХ) (Еникеев и др., 1995). Адекватность определения жизнеспособности по восстановлению ТТХ подтверждали измерением жизнеспособности по отрастанию каллуса (Rikhvanov et al., 2007). Определение дыхательной активности дрожжей и растительных культур проводили полярографически, используя платиновый электрод закрытого типа (электрод Кларка) (Rikhvanov et al., 2005; 2007).

Для изучения эффекта агентов на базовую термотолерантность клетки обрабатывали указанными в тексте концентрациями и сразу же их подвергали тепловому воздействию. После окончания действия теплового шока клетки отмывали от ингибиторов и определяли жизнеспособность (Rikhvanov et al., 2002). Для изучения

действия ингибиторов на развитие индуцированной термотолерантности и экспрессию БТШ клетки дрожжей и растений обрабатывали исследуемыми агентами при обычной температуре инкубации или при тепловом стрессе. Затем клетки отмывали и, либо анализировали изменения в экспрессии БТШ, либо подвергали действию теплового шока и анализировали жизнеспособность (Rikhvanov et al., 2005; 2007).

Для выделения общей белковой фракции клетки ресуспендировали в буфере для выделения белка, замораживали жидким азотом и растирали с кварцевым песком. Для получения митохондриальной и цитоплазматической фракций растительные клетки и протопласты дрожжей разрушали в гомогенизаторе Даунса. Белковую фракцию отделяли от клеточных компонентов центрифугированием, белок осаждали холодным ацетоном и растворяли в буфере для образца. После разделения белков путем SDS-электрофореза проводили вестерн-блоттинг с соответствующими антителами (Rikhvanov et al., 2005; 2007).

Для ОТ-ПЦР-анализа тотальную РНК выделяли с помощью набора SV Total RNA Isolation System («Promega», USA). Для синтеза первой цепи кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК, праймер oligo(dT)18, набор РЕВЕРТА («АмплиСенс», Москва). Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ проводили, используя кДНК в качестве матрицы и специфичные праймеры. Равные объемы ПЦР-продуктов разделяли в 1,5% агарозном геле.

Микроскопический анализ клеток проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений «AxioVision Rel.4.6». Определение потенциала на внутренней митохондриальной мембране клеток *A. thaliana* проводили с использованием 5-10 мкМ потенциал-зависимого катионного красителя JC-1. Для дрожжей использовали 1-5 мкМ потенциал-зависимого катионного красителя метилового эфира тетраметилродамина (TMRM). Для определения АФК использовали 1-50 мкМ дихлорфлуоресцеин диацетата (H₂DCF DA).

Для изучения уровня внутриклеточного кальция использовали штаммы *S. cerevisiae*, трансформированные плазмидой с геном апоэжворина. Для восстановления функционального экворина добавляли 1 мкМ целентеразина и инкубировали при 30°C в течение 60 мин в темноте. Люминесценцию после теплового стресса измеряли с временным интервалом в одну секунду с помощью люминометра LumiCounter 2500 (Microtech-Nichion Co., Funabashi, Japan). Условия теплового стресса в ячейке люминометра создавали, как описано (Torrecilla et al., 2000).

Эксперименты повторяли не менее 3 раз. Полученные экспериментальные данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Excel: рассчитаны средние арифметические величины и их ошибки. Представлены только результаты, попавшие в доверительный интервал 95% по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Скорость роста и базовая термотолерантность дрожжей

Для изучения зависимости между способностью к росту при повышении температуры и способностью выдерживать кратковременный повреждающий тепловой шок использовали три вида дрожжей: *R. rubra*, *S. cerevisiae* и *D. vanriijiae*. Вид *D. vanriijiae* имел самую высокую максимальную температуру роста. Самую

низкую максимальную температуру роста имел вид *R. rubra*. Рост *R. rubra* полностью подавлялся при 38°C (рис. 1а).

Определение способности дрожжей, выращенных при 30°C, выдерживать кратковременный тепловой шок (45°C, 60 мин) показало, что лучше всего сохраняли жизнеспособность клетки *R. rubra*, а хуже всего – *D. vanriijiae* (рис. 1б). Таким образом, вид *R. rubra* имеет самую низкую максимальную температуру роста (рис. 1а), но лучше других видов сохраняет жизнеспособность после теплового шока 45°C (рис. 1б). Наоборот, вид *D. vanriijiae* имеет самую высокую максимальную температуру роста (рис. 1а), но погибает быстрее, чем остальные виды дрожжей после обработки 45°C (рис. 1б). Следовательно, способность дрожжей к росту при повышении температуры и способность выдерживать кратковременный повреждающий тепловой шок определяются различными механизмами. Предлагается под термином «термотолерантность» понимать способность организма выдерживать повреждающий тепловой шок, а под термином «теплолюбивость» – способность к росту при температурах выше оптимальной.

Измерение скорости роста при обычной температуре инкубации показало, что вид *R. rubra* имел самую низкую скорость роста при 30°C (рис. 1в) и, в то же время, самую высокую базовую термотолерантность (рис. 1б). Вид *D. vanriijiae* отличался самой высокой скоростью роста при 30°C (рис. 1в) и одновременно, самой низкой термотолерантностью (рис. 1б). Следовательно, в соответствии с работой (Lu et al., 2009), наблюдается обратная зависимость между скоростью роста дрожжей при обычной температуре инкубации и термотолерантностью изучаемых видов дрожжей. Чем медленнее скорость роста, тем выше термотолерантность.

Митохондрии и термотолерантность дрожжей

Для изучения термотолерантности дрожжей в зависимости от типа энергетического метаболизма использовали дрожжи *D. vanriijiae* и *S. cerevisiae*. Вид *D. vanriijiae* является облигатным аэробом, а вид *S. cerevisiae* – факультативным анаэробом. Клетки дрожжей выращивали на среде с глюкозой и галактозой

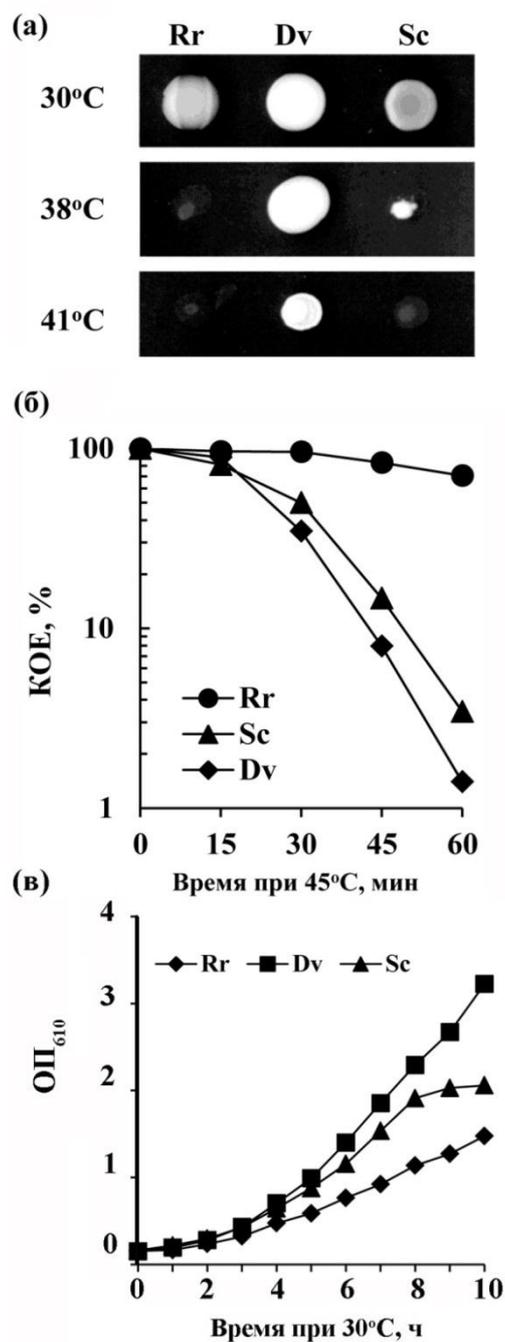


Рис. 1. Теплолюбивость (а), термотолерантность (б) и рост при 30°C (в) дрожжей *R. rubra* (Rr), *D. vanriijiae* (Dv) и *S. cerevisiae* (Sc). Дрожжи выращивали на среде с глюкозой при 30°C, затем либо (а) высевали на твердую среду и инкубировали 48 часов при 30, 38 и 41°C, либо (б) определяли жизнеспособность после теплового шока 45°C, либо (в) анализировали скорость роста при 30°C, n=3.

и обрабатывали при 45°C (60 мин). Клетки *D. vanrijiae* утилизируют как глюкозу, так и галактозу за счет окислительного фосфорилирования. Не было обнаружено различий в термотолерантности этого вида при росте на галактозе или глюкозе (рис. 2а). Клетки *S. cerevisiae* на среде с глюкозой получают энергию преимущественно за счет сбраживания, а на среде с галактозой за счет окислительного фосфорилирования. Оказалось, что на среде с галактозой клетки этого вида лучше переживали тепловой шок, чем на среде с глюкозой (рис. 2б). Следовательно, дрожжи, использующие окислительный метаболизм, отличаются повышенной термотолерантностью.

Поскольку термотолерантность *S. cerevisiae* зависит от синтеза Hsp104p (Richter et al., 2010), было измерено содержание Hsp104p в клетках *S. cerevisiae*, выращенных на разных источниках углерода. Как видно на рис. 3, на среде с галактозой при 26°C и при 30°C уровень конститутивного синтеза Hsp104p в клетках *S. cerevisiae* был выше, чем на среде с глюкозой. Повышение температуры до 37°C индуцировало синтез Hsp104p примерно в одинаковой степени во всех вариантах эксперимента. Следовательно, повышенная термотолерантность клеток *S. cerevisiae*, использующих окислительный метаболизм (рис. 2а), сопровождается повышением конститутивного синтеза Hsp104p (рис. 3). Очевидно, высокий уровень конститутивного синтеза Hsp104p является одним из факторов повышения базовой термотолерантности дрожжей, использующих окислительный энергетический метаболизм.

Чтобы вычленить роль митохондрий в термотолерантности дрожжей, клетки выращивали на среде с глюкозой или галактозой, обрабатывали ингибитором IV комплекса дыхательной цепи азидом натрия и подвергали тепловому

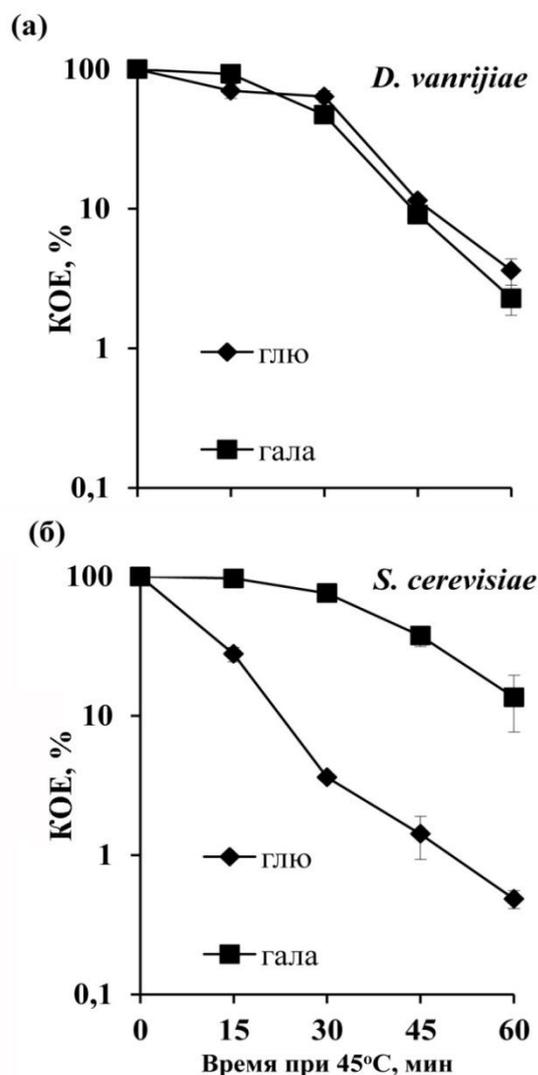


Рис. 2. Зависимость базовой термотолерантности от типа энергетического метаболизма дрожжей.

Дрожжи *D. vanrijiae* (а) и *S. cerevisiae*, штамм W303-1В (б) выращивали на среде с глюкозой (глю) или галактозой (гала) и инкубировали при 45°C, n=4-6, m±S.E.



Рис. 3. Синтез Hsp104p в зависимости от типа энергетического метаболизма *S. cerevisiae*. Клетки штамма W303-1В выращивали на среде с глюкозой или галактозой при 26 или 30°C и определяли синтез Hsp104p после теплового стресса 37°C (30 мин), n=3, типичный эксперимент.

воздействию при 45°C. Исследуемые виды дрожжей различным образом реагировали на добавление азида. Азид резко снижал термотолерантность клеток облигатного аэроба *D. vanriijiae* как на среде с глюкозой, так и на среде с галактозой (рис. 4). В то же время, эффект азида на термотолерантность факультативного анаэроба *S. cerevisiae* значительно различался в зависимости от того, на какой среде выращивали клетки. На среде с глюкозой азид существенно защищал клетки *S. cerevisiae* от гибели, а на среде с галактозой защитного эффекта не наблюдалось. В этих условиях азид даже несколько снижал термотолерантность *S. cerevisiae* (рис. 4). Сходные результаты были получены при использовании других митохондриальных ингибиторов – цианида и малоната (представлено в диссертации). Таким образом, эффект азид натрия, а также других митохондриальных ингибиторов на термотолерантность дрожжей зависит от типа энергетического метаболизма. В условиях броидильного метаболизма азид повышает термотолерантность дрожжей, а в условиях окислительного метаболизма, наоборот, снижает.

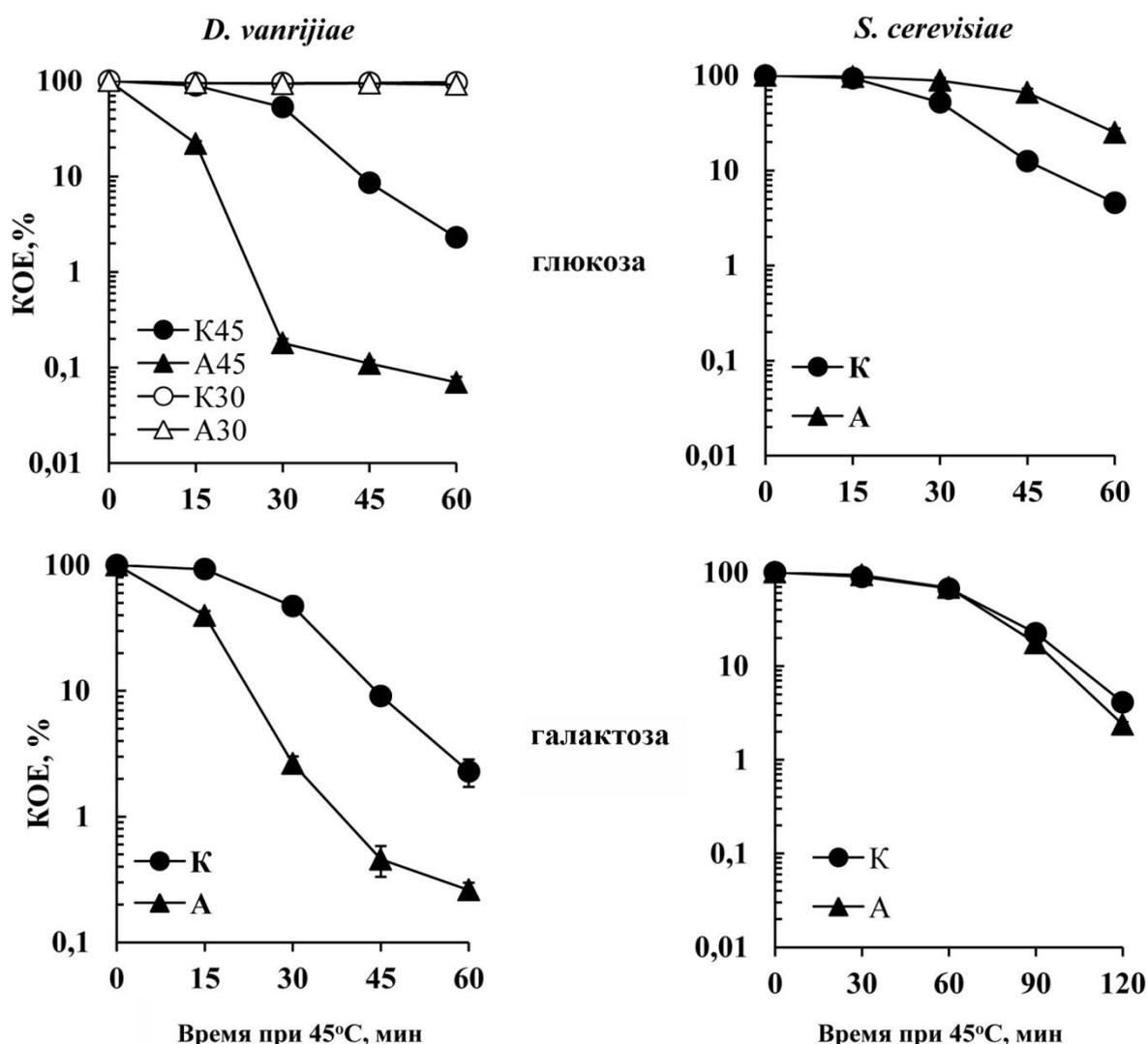


Рис. 4. Действие азид натрия на термотолерантность дрожжей на среде с глюкозой и галактозой.

Дрожжи *D. vanriijiae* и *S. cerevisiae*, штамм Ψ -74-D694, выращивали на среде с глюкозой и галактозой, инкубировали при 30°C или при 45°C в отсутствии (К) или присутствии 0,15 мМ NaN_3 (А). Жизнеспособность определяли по образованию КОЕ, $n=4-8$, $m \pm S.E.$

Противоположный эффект азида на термотолерантность дрожжей в зависимости от типа энергетического метаболизма позволил предположить, что митохондрии могут являться одной из причин гибели дрожжей. Чтобы проверить это предположение, провели сравнение термотолерантности клеток родительского типа *S. cerevisiae* и мутанта *petite*. Мутанты *petite* не могут дышать в результате утраты митохондриальной ДНК (Tzagoloff, Myers, 1986). Мутант *petite* гораздо лучше переживал обработку 45°C, чем родительский тип. Однако при температуре 50°C такой разницы не наблюдалось. Напротив, после теплового шока 50°C клетки мутанта *petite* были менее термотолерантными, чем клетки родительского типа (рис. 5).

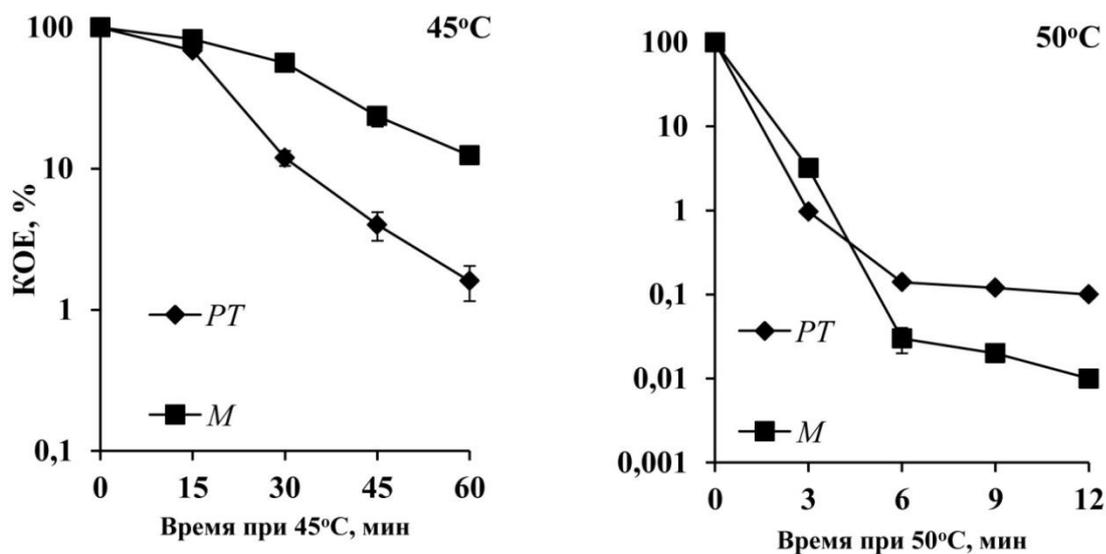


Рис. 5. Влияние мутации дыхательной недостаточности (мутации *petite*) на термотолерантность *S. cerevisiae*.

Клетки штамма родительского типа, штамм W303-1В (PT) и мутанта дыхательной недостаточности (M) выращивали на среде с глюкозой и инкубировали при 45°C и 50°C. Жизнеспособность определяли по образованию КОЕ, n=4, m±S.E.

При повышении температуры у растений и дрожжей наблюдается усиление генерации АФК (Davidson et al., 1996; Saidi et al., 2011). Для измерения продукции АФК клетки родительского типа *S. cerevisiae* и *petite* мутанта подвергали действию теплового шока при 45°C. Продукцию АФК измеряли по интенсивности флуоресценции DCF. Тепловой шок при 45°C приводил к резкому усилению генерации АФК в клетках родительского типа. Усиление генерации АФК наблюдалось также и у *petite* мутанта, но в значительно меньшей степени (рис. 6). Следовательно, мутация *petite* подавляет генерацию АФК при тепловом шоке, что сопровождается повышением термотолерантности (рис. 5).

Далее изучили, как обработка азидом и протонифором ДНФ повлияет на генерацию АФК при тепловом шоке при 45°C. Усиление генерации АФК происходило независимо от типа энергетического метаболизма *S. cerevisiae*. Повышение флуоресценции DCF наблюдалось в клетках дрожжей, выращенных на глюкозе и этаноле (рис. 7). Обработка азидом и ДНФ подавляла генерацию АФК у дрожжей, выращенных на среде с глюкозой. Наоборот, азид и ДНФ стимулировали продукцию АФК при тепловом шоке в клетках, выращенных на несбраживаемом источнике углерода – этаноле (рис. 7). Таким образом, механизм образования АФК у дрожжей различается в зависимости от типа энергетического метаболизма. Поскольку нару-

шение функционирования митохондрий в результате мутации *petite* или обработки азидом и ДНФ подавляет или стимулирует генерацию АФК при тепловом шоке, очевидно, что одним из источников АФК являются митохондрии. Подавление азидом генерации АФК на среде с глюкозой сопровождалось повышением термотолерантности и, наоборот, стимуляция азидом генерации АФК в условиях окислительного энергетического метаболизма приводила к снижению термотолерантности (рис. 4). Следовательно, митохондриальная продукция АФК вносит существенный вклад в гибель клетки при тепловом шоке 45°C.

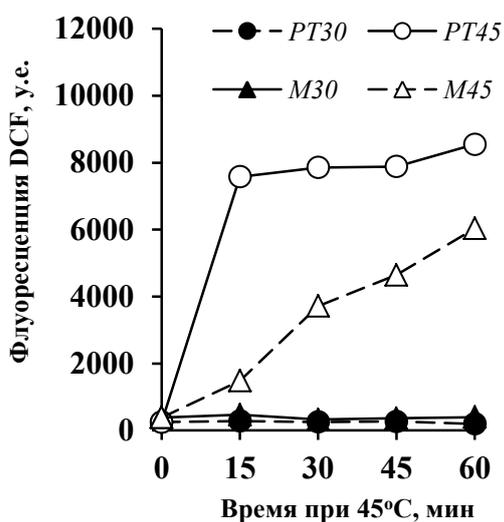


Рис. 6. Генерация АФК при тепловом шоке в клетках родительского типа *S. cerevisiae* и мутанта *petite*.

Клетки родительского типа, *PT* (W303-1B) и мутанта *petite* (*M*) выращивали на среде с глюкозой, инкубировали при 30 или 45°C в присутствии 40 мкМ H₂DCF DA. Представлены данные типичного эксперимента, n=3.

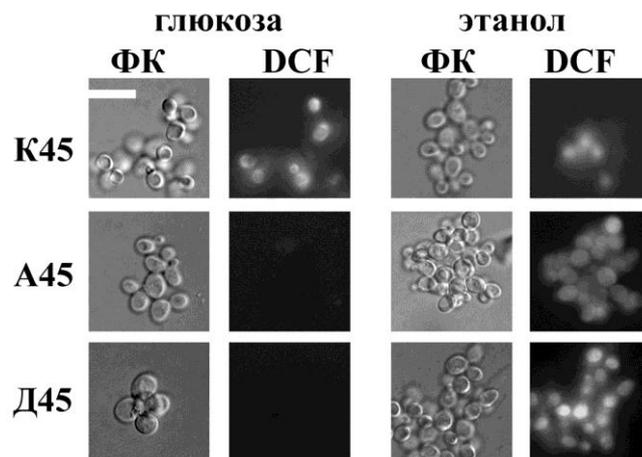


Рис. 7. Эффект азиды и ДНФ на генерацию АФК в клетках *S. cerevisiae* при тепловом шоке.

Клетки *S. cerevisiae* (штамм Ψ-74-D694) выращивали на среде с глюкозой или этанолом, обрабатывали 0,15 мМ NaN₃ (А) или 1 мМ ДНФ (Д) и инкубировали при 45°C (30 мин) в присутствии 50 мкМ H₂DCF DA, n=3. ФК – фазовый контраст. Масштабная линейка – 10 мкм.

Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны, связь с продукцией АФК

Согласно гипотезе В.П. Скулачева (Skulachev, 1998), генерация АФК митохондриями происходит при повышении потенциала на внутренней митохондриальной мембране (мТДψ). Чтобы изучить изменение мТДψ в клетках дрожжей, использовали флуоресцентный краситель TMRM. Этот краситель накапливается в митохондриях в зависимости от мТДψ (Scaduto, Grotyohann, 1999). Повышение температуры до 39°C приводило к увеличению флуоресценции TMRM в клетках *S. cerevisiae*, растущих на глюкозе. Еще более значительное увеличение наблюдалось при 45°C (рис. 8). В клетках *S. cerevisiae*, растущих на этаноле, значительная флуоресценция TMRM наблюдалась и в контроле (30°C), а повышение температуры до 39°C приводило к еще большему увеличению. Следовательно, повышение флуоресценции TMRM при повышении температуры происходит независимо от типа энергетического метаболизма.

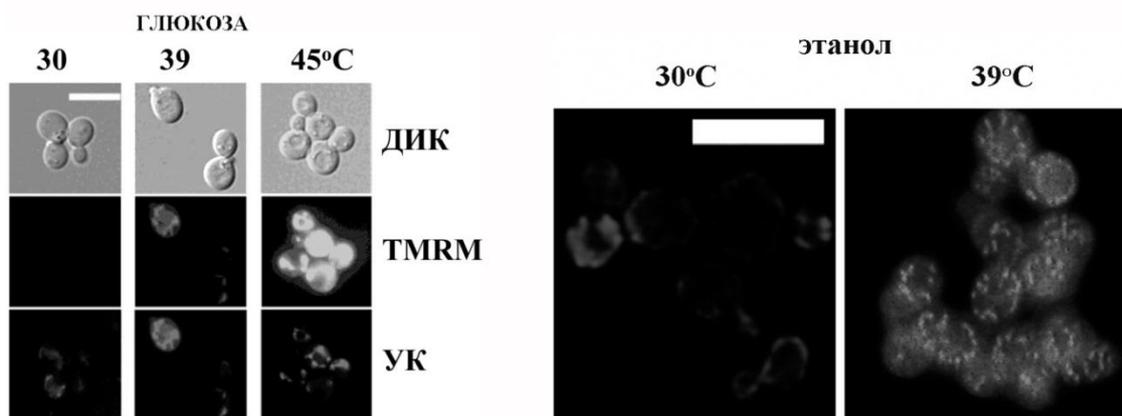


Рис. 8. Умеренный тепловой шок вызывает гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны в клетках *S. cerevisiae*.

Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой или с этанолом и обрабатывали в присутствии 1 мкМ TMRM при 30, 39 и 45°C (10 мин). ДИК – дифференциально-интерференционный контраст, УК – улучшенный контраст. Масштабная линейка – 10 мкм.

Чтобы подтвердить, что наблюдаемое нами повышение флуоресценции TMRM при тепловом шоке отражает реальное изменение мТД ψ , использовали FCCP (карбонилцианид-л-трифторметоксифенилгидразон), агент, который снижает митохондриальный потенциал. Добавление FCCP при 45°C приводило к полному гашению флуоресценции, однако при 50°C подавляющий эффект FCCP отсутствовал (рис. 9). Полученные данные указывают, что при 50°C TMRM накапливается в дрожжах в результате неспецифичного поступления в клетки, а при 45°C его флуоресценция зависит от повышения мТД ψ .

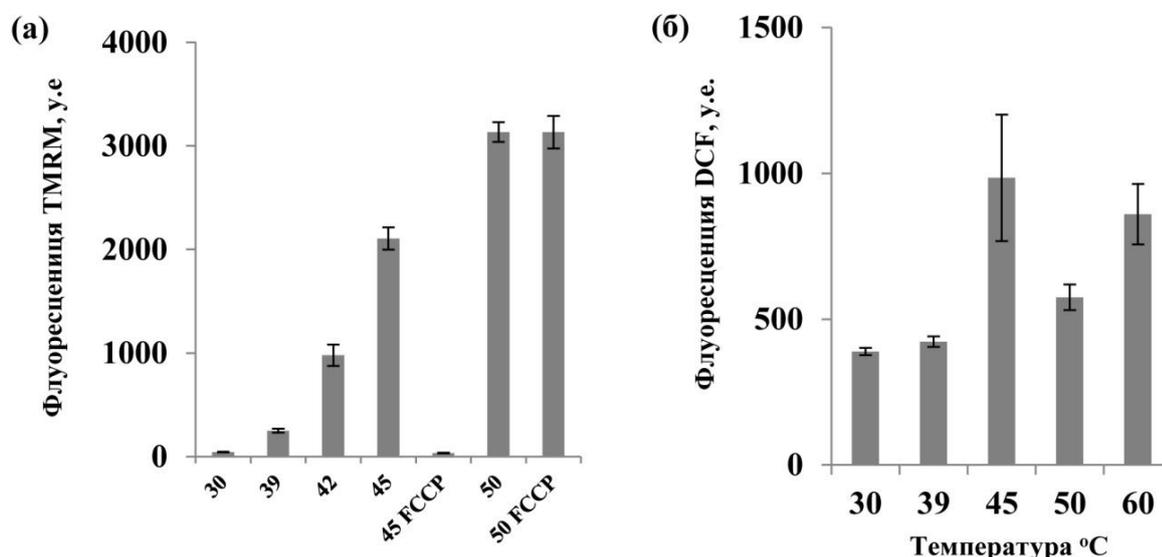


Рис. 9. Сравнение интенсивности гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны и генерации АФК в клетках *S. cerevisiae* при тепловом шоке.

Клетки *S. cerevisiae* (штамм Ψ -74-D694) выращивали на среде с глюкозой и инкубировали при указанных температурах в течение 10 (TMRM) и 30 мин (H_2DCF DA) в присутствии 1 мкМ TMRM или 50 мкМ H_2DCF DA. (а) Обсчет интенсивности флуоресценции TMRM в отсутствии или присутствии 20 мкМ FCCP, $n=4$, $m \pm S.E.$ (б) Обсчет интенсивности флуоресценции H_2DCF DA, $n=3$, $m \pm S.E.$

Сравнение продукции АФК и значения мтΔψ (рис. 9) показало, что наиболее высокий уровень продукции АФК наблюдался в клетках дрожжей при температуре 45°C. Одновременно при этой температуре наблюдалось наиболее высокое значение мтΔψ. При температуре 50°C уровень продукции АФК был незначителен. В этих условиях повышения мтΔψ не происходит, поскольку FCCP не подавляет флуоресценцию TMRM (рис. 9).

В обычных условиях митохондрии являются основным источником АФК в гетеротрофной культуре растений (Blokina, Fagerstedt, 2010). Чтобы изучить изменение митохондриального потенциала в клетках арабидопсиса, использовали другой потенциал-зависимый зонд JC-1. В митохондриях с высоким значением потенциала JC-1 образует агрегаты, флуоресцирующие в красном свете (Dressler et al., 2006). Сравнение уровня образования АФК в клетках *A. thaliana* и мтΔψ при тепловом шоке показало, что наблюдается линейная зависимость между этими показателями. Повышение мтΔψ сопровождается усилением продукции АФК (рис. 10). Зависимость между образованием АФК и повышением мтΔψ при тепловом шоке в клетках дрожжей и растений указывает на причинно-следственную связь между этими явлениями.

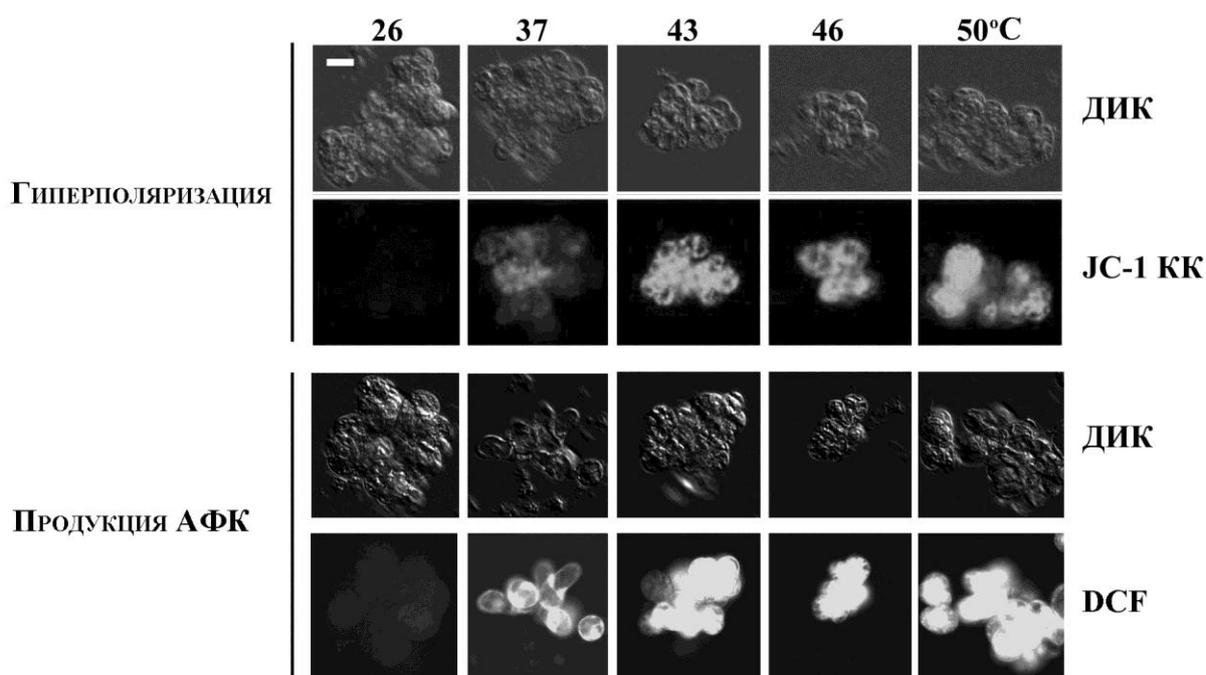


Рис. 10. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны и продукция АФК в клетках *A. thaliana* при тепловом шоке.

Клетки *A. thaliana* инкубировали при 26, 37, 39, 43, 46 или 50°C в присутствии 10 мкМ JC-1 или 1 мкМ H₂DCF DA (10 мин). ДИК – дифференциально-интерференционный контраст, КК – красный канал. Масштабная линейка – 20 мкм. Представлен результат типичного эксперимента, n=3.

Механизмы гибели клетки при тепловом шоке

Способность мутации *petite* защищать клетки от гибели (рис. 5) и усиление генерации АФК (рис. 9) указывает, что гибель клеток *S. cerevisiae* при 45°C имеет признаки программированной гибели клеток (ПГК). Развитие ПГК требует активного белкового синтеза, а ингибитор белкового синтеза циклогексимид (ЦГ) подав-

ляет развитие ПГК в клетках млекопитающих и дрожжей (Skulachev, 2002). Чтобы изучить эффект ЦГ на жизнеспособность, клетки *S. cerevisiae* обрабатывали этим агентом в течение 30 мин при 30°C и определяли жизнеспособность после теплового шока 45°C. Обработка ЦГ значительно повышала термотолерантность клеток дрожжей к тепловому воздействию 45°C (рис. 11а), но этого не наблюдалось при 50°C (рис. 11б).

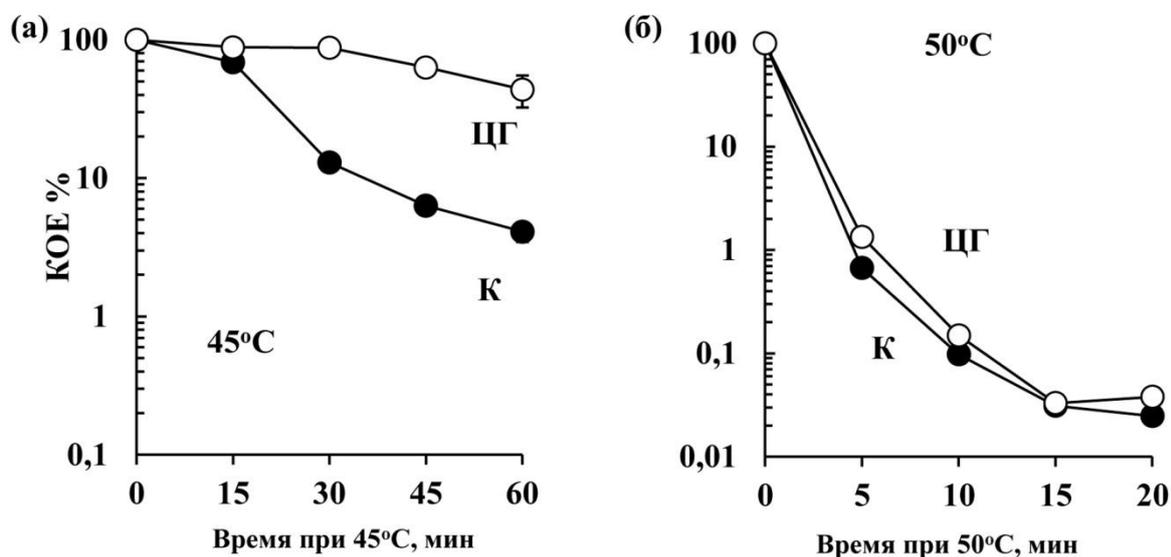


Рис. 11. Эффект циклогексимида на термотолерантность *S. cerevisiae*.

Клетки штамма W303-1В выращивали на среде с глюкозой, обрабатывали при 30°C (30 мин) в присутствии 20 мкг/мл циклогексимида (ЦГ) или без него (К) и подвергали тепловому воздействию при 45°C или 50°C, n=4-6, m±S.E.

Таким образом, способность ЦГ повышать термотолерантность указывает, что гибель клеток дрожжей зависит от синтеза белков *de novo*, а развитие гибели при умеренном тепловом шоке происходит программируемым образом. Различный эффект ЦГ на термотолерантность клеток *S. cerevisiae* при 45 и 50°C свидетельствует, что механизмы гибели клетки существенно различаются в зависимости от интенсивности теплового воздействия. Этот вывод подтверждает результаты, демонстрирующие различный эффект мутации *petite* на термотолерантность *S. cerevisiae* при жестком и умеренном тепловом шоке (рис. 5).

Развитие ПГК в клетках растений после теплового шока не приводит к мгновенной гибели. Большая часть клеток остается живой сразу же после теплового воздействия. Гибель наступает во время инкубации при обычной температуре (Locato et al., 2009). Чтобы изучить динамику гибели *S. cerevisiae*, клетки обрабатывали при 45°C (30 мин) и спустя 0-96 ч инкубации при 30°C проводили подсчет живых и мертвых клеток путем окрашивания ФДА и ПИ. Сразу же после окончания теплового шока 45°C все 100% клеток окрашивались как живые (рис. 12). Появление мертвых клеток наблюдалось спустя 8 ч инкубации при 30°C, а через 24 ч погибало 90% клеток. Через 96 ч клетки, пережившие шок, приступали к делению. Количество живых клеток после теплового шока 50°C существенно не изменялось на протяжении 48 ч инкубации при 30°C, но спустя 72 ч их число резко снижалось (рис. 12).

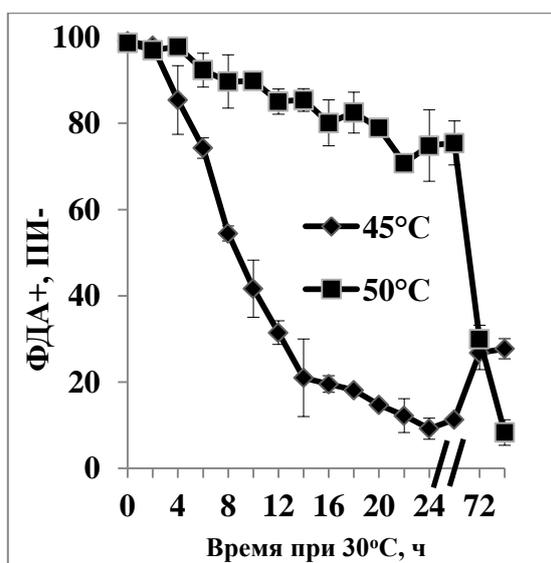


Рис. 12. Динамика снижения жизнеспособности клеток *S. cerevisiae* после теплового шока.

Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой, обрабатывали при 45 и 50°C (30 мин). Жизнеспособность определяли окрашиванием 50 мкМ ФДА и 5 мкг/мл ПИ, спустя 0-96 ч инкубации при 30°C, $n=3$, $m \pm S.E.$

Чтобы изучить динамику гибели клеток *A. thaliana*, культуру обрабатывали при 50°C (10 мин) и измеряли жизнеспособность по восстановлению ТТХ во время восстановительного периода при 26°C. Сразу же после теплового шока жизнеспособность клеток уменьшалась на 30%. Инкубация при 26°C приводила к дальнейшему снижению жизнеспособности клеток арабидопсиса (рис. 13а). Временная динамика снижения жизнеспособности в точности соответствовала степени деградации ядерной ДНК. Деградация ДНК в контрольных клетках и в клетках, отобранных сразу же после теплового шока 50°C, не наблюдалась, но через 24 ч инкубации при 26°C ДНК подвергалась значительному разрушению (рис. 13б). Таким образом, гибель клеток дрожжей и арабидопсиса после теплового шока развивается во времени, что свидетельствует об активном характере процесса.

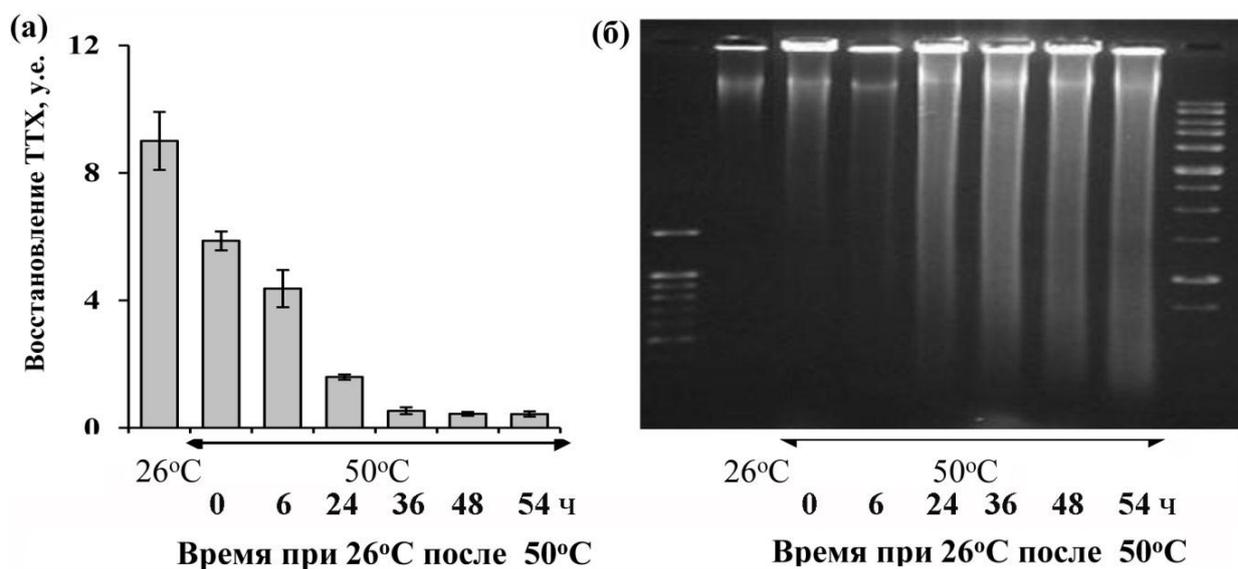


Рис. 13. Динамика снижения жизнеспособности культуры клеток *A. thaliana* после теплового шока 50°C. Клетки *A. thaliana* обрабатывали при 50°C (10 мин) и инкубировали 0-54 ч при 26°C. (а) Динамика восстановления ТТХ; $n=3$, $m \pm S.E.$ (б) динамика деградации ДНК, $n=3$.

Цитохром *c*, освобождаемый из митохондрий, действует как важный посредник в инициации ПГК (Wang, Youle, 2009). Для изучения изменения локализации цитохрома *c* при тепловом шоке, клетки *S. cerevisiae* обрабатывали при 45°C (30 мин) и выделяли митохондриальную и цитоплазматическую фракции белков. В обычных условиях инкубации (30°C) цитохром *c* регистрировался исключительно в митохондриальной фракции дрожжей и отсутствовал в цитоплазматической (рис. 14а). Тепловой шок 45°C приводил к исчезновению цитохрома *c* в митохондриальной фракции и его появлению в цитоплазматической.

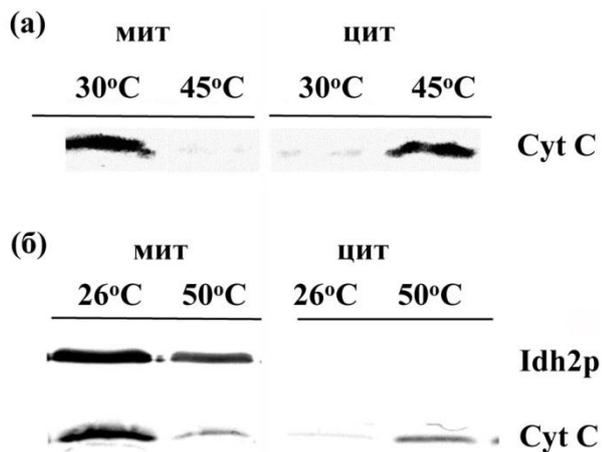


Рис. 14. Тепловой шок вызывает выход цитохрома *c* из митохондрий. (а) Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой, обрабатывали при 30 и 45°C (30 мин), $n=3$. (б) Клетки *A. thaliana* обрабатывали при 26°C и 50°C (10 мин) и дополнительно инкубировали 120 мин при 26°C, $n=3$. Митохондриальная (мит) и цитоплазматическая (цит) фракции белков.

Чтобы выяснить, индуцирует ли тепловой шок выход цитохрома *c* из митохондрий растений, клетки *A. thaliana* обрабатывали при 50°C (10 мин) и выделяли митохондриальную и цитоплазматическую фракции белков. В контроле (26°C) цитохром *c* и изоцитратдегидрогеназа (Idh2p) присутствовали исключительно в митохондриальной фракции (рис. 14б). После теплового шока наблюдалось понижение количества цитохрома *c* в митохондриальной фракции и, одновременно, его появление в цитоплазматической. В то же время Idh2p, локализованная в митохондриальном матриксе, не обнаруживалась в цитоплазматической фракции при тепловом шоке (рис. 14б).

Таким образом, процесс развития гибели клеток дрожжей и растений при тепловом шоке имеет активный характер, развивается во времени (рис. 12 и 13), сопровождается выходом цитохрома *c* из митохондрий (рис. 14), усилением продукции АФК (рис. 9 и 10). Эти признаки, а также повышение термотолерантности *S. cerevisiae* при обработке ЦГ (рис. 11) и в результате мутации *petite* (рис. 5), указывают, что гибель при тепловом шоке развивается программируемым образом.

Белки теплового шока и ПГК

Из данных, представленных выше, следует, что механизм гибели при жестком (50°C) и умеренном тепловом шоке (45°C) различается. При умеренном тепловом шоке гибель клеток дрожжей зависит от митохондриальной продукции АФК и имеет признаки ПГК. При жестком тепловом шоке, вероятно, агрегация и денатурация клеточных белков вносит основной вклад в гибель клеток. Как следует из рис. 15, несмотря на различные механизмы гибели, индукция синтеза Hsp104p во время теплового стресса при 39°C защищала клетки *S. cerevisiae* от гибели как после умеренного (45°C), так и жесткого (50°C) теплового шока. Аналогичным образом, индукция синтеза Hsp101p *A. thaliana* подавляла гибель культуры клеток арабидопсиса при тепловом шоке 50°C (представлено в диссертации). Таким образом,

можно предполагать, что гомологичные белки ScHsp104p и AtHsp101p могут ингибировать развитие ПГК в клетках дрожжей и растений при тепловом шоке.

Чтобы изучить роль БТШ в развитии ПГК, необходимо было установить, когда синтезируются БТШ и когда происходит гибель клеток. Для этого клетки *A. thaliana* подвергали тепловым воздействиям различной интенсивности и продолжительности, а затем определяли уровень синтеза БТШ и жизнеспособность. Повышение температуры до 37°C индуцировало синтез Hsp101p, Hsp17.6p (I и II) и Hsp70p. Индукции синтеза этих БТШ не наблюдалось при повышении интенсивности теплового воздействия до 39°C и выше. Напротив, количество Hsp60p возрастало пропорционально увеличению температуры обработки (рис. 16а). Тепловой шок при 37 и 39°C не влиял на жизнеспособность, но обработка при 43, 46 и 50°C прогрессивно снижала жизнеспособность клеток (рис. 16б). Таким образом, развитие гибели клеток *A. thaliana* при тепловом шоке сопровождается повышением уровня Hsp60p и ингибированием синтеза Hsp101p и Hsp17.6p (I и II).

Для установления зависимости между индукцией синтеза БТШ и жизнеспособностью клетки *S. cerevisiae* обрабатывали при 39, 42 и 45°C (30 мин), после чего определяли индукцию синтеза БТШ и оценивали жизнеспособность дрожжей. Уровень синтеза Hsp60p, Hsp70-Ssa1p, Hsp70-Ssb1p и цитохрома *c* не изменялся во всех вариантах эксперимента. Повышение температуры инкубации до 39°C вызывало значительное повышение количества Hsp104p. Тепловая обработка при 42°C приводила примерно к такой же индукции синтеза Hsp104p. Но при 45°C индукции синтеза не наблюдалось (рис. 17а). Определение жизнеспособности показало, что тепловое воздействие при 39 и 42°C не имело негативного эффекта на жизнеспособность. Тепловой шок при 45°C (30 мин) подавлял жизнеспособность

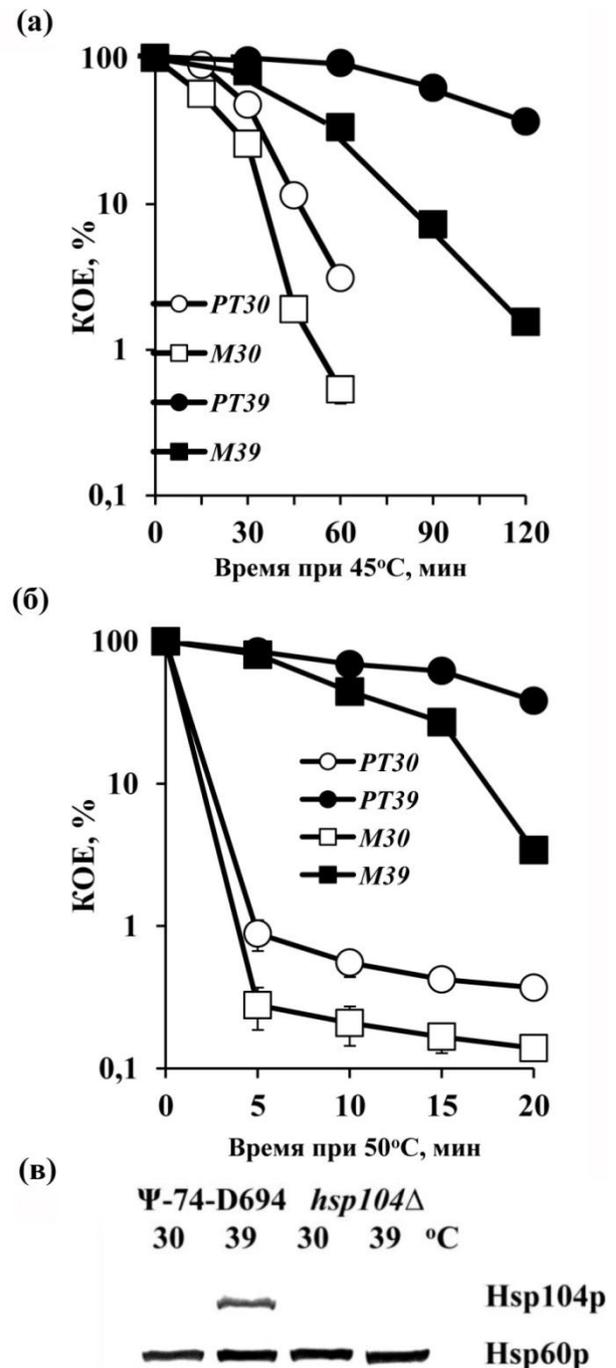


Рис. 15. Влияние Hsp104p на развитие индуцированной термотолерантности в зависимости от интенсивности теплового шока. Клетки *S. cerevisiae* родительского типа (PT, штамм Ψ -74-D694) и *hsp104\Delta* мутанта (M) выращивали на среде с глюкозой, обрабатывали при 30 или 39°C (30 мин) и подвергали тепловому шоку 45°C (а), 50°C (б) или анализировали синтез белков Hsp104p и Hsp60p (в).

(рис. 17б). Таким образом, у дрожжей, так же как и у клеток растений, когда тепловое воздействие достигает определенного значения и клетки начинают погибать, синтез Hsp104p не индуцируется.

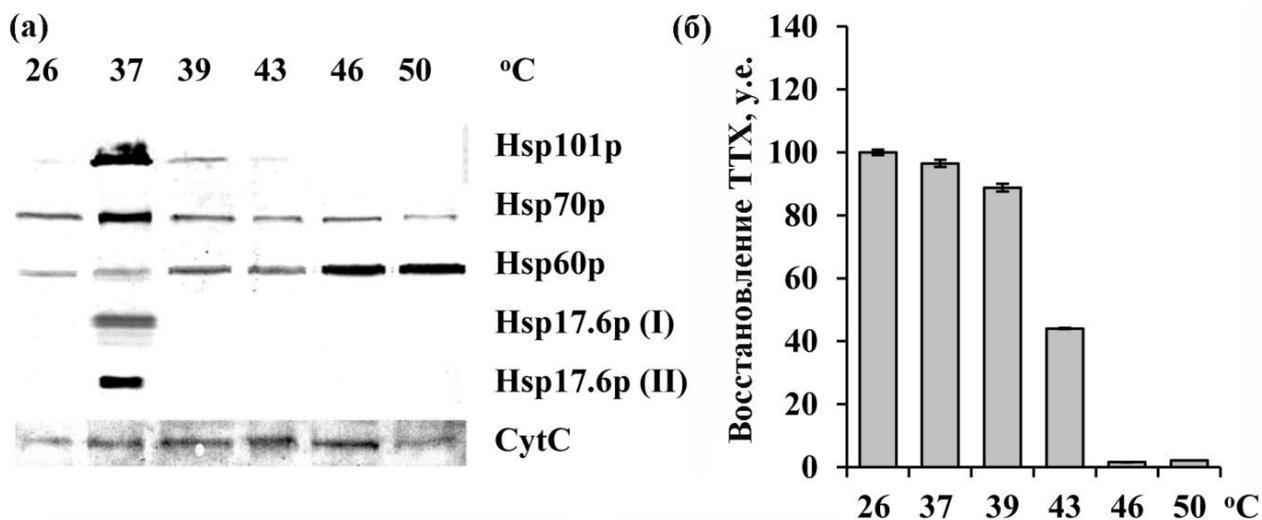


Рис. 16. Взаимосвязь между содержанием БТШ и гибелью клеток *A. thaliana* при тепловом шоке. Клетки *A. thaliana* инкубировали при 26, 37, 39°C (120 мин), 43°C (60 мин), 46°C (40 мин), 50°C (10 мин). (а) Вестерн-блоттинг суммарных белков после дополнительной инкубации при 26°C (120 мин), n=3; (б) восстановление ТТХ после дополнительной инкубации при 26°C (48 ч), рассчитываемое на г сырого веса, n=3, m±S.E.

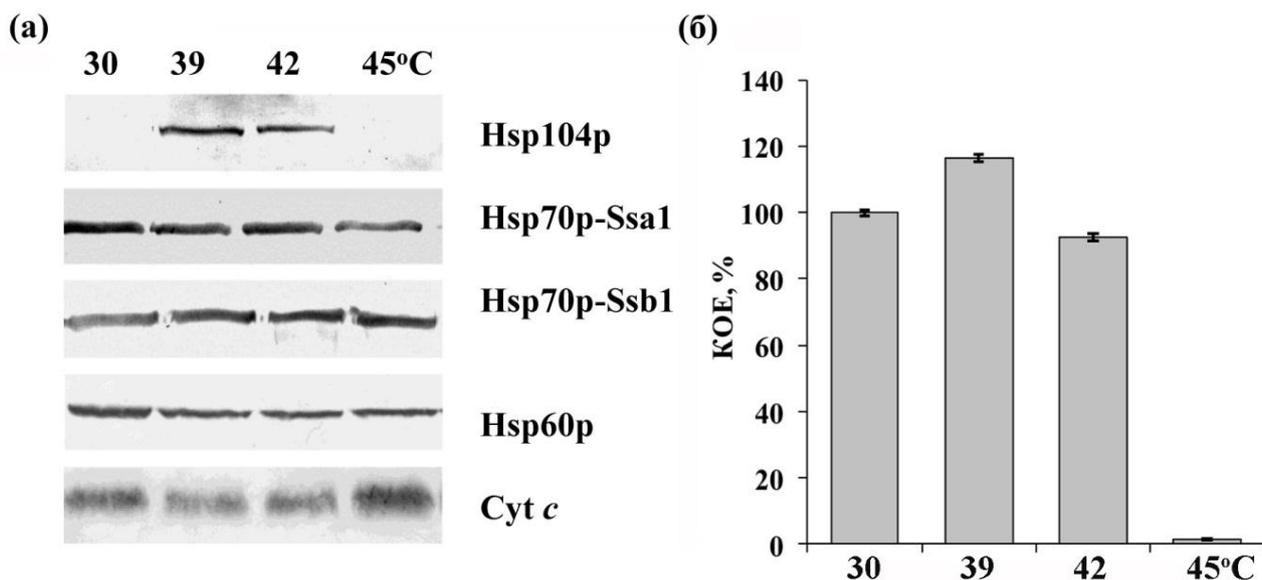


Рис. 17. Взаимосвязь между содержанием БТШ и гибелью клеток *S. cerevisiae* при тепловом шоке.

Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой, подвергали тепловому воздействию при 39, 42 и 45°C (30 мин). (а) Вестерн-блоттинг суммарных белков, n=3. (б) Жизнеспособность клеток, определяемая по количеству КОЕ, n=3, m±S.E.

Чтобы изучить, как повышение уровня БТШ повлияет на локализацию митохондриальных белков, изучали распределение цитохрома c, Hsp60p, а также других БТШ между митохондриальной и цитоплазматической фракциями белков. Клетки

A. thaliana подвергали предварительному тепловому воздействию при 37°C (120 мин), затем обрабатывали при 50°C (10 мин) и после 120 мин инкубации при 26°C выделяли митохондриальную и цитоплазматическую фракции белков. В соответствии с ранее полученными результатами (рис. 14), тепловой шок при 50°C вызывал выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль (рис. 18а). Митохондриальный шаперон Hsp60p, так же как и цитохром *c*, выходил из митохондрий в цитозоль после теплового шока.

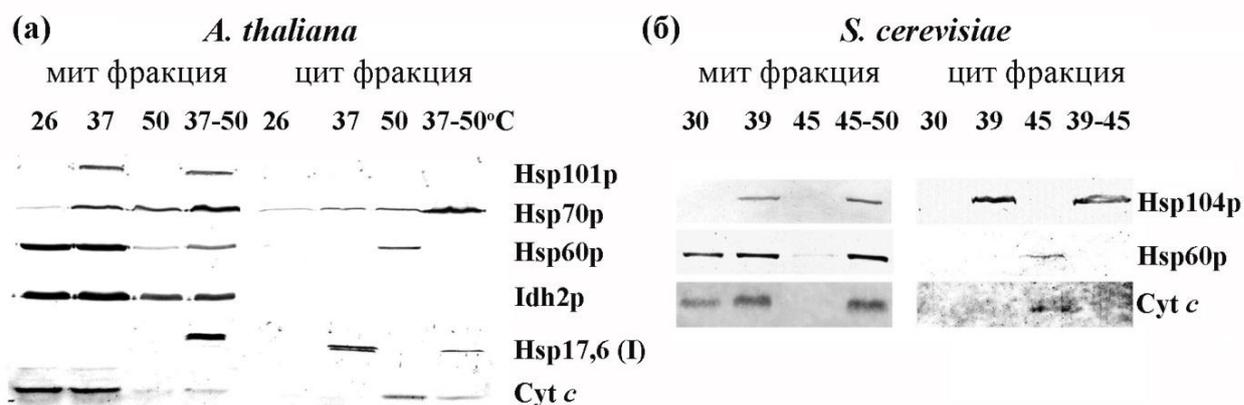


Рис. 18. Влияние предварительного теплового стресса на выход цитохрома *c* и Hsp60p из митохондрий при тепловом шоке.

(а) Клетки *A. thaliana* обрабатывали при 26 и 37°C (120 мин) и подвергали тепловому шоку 50°C (10 мин). После 120 мин инкубации при 26°C проводили выделение митохондриальной (мит) и цитоплазматической (цит) фракций белков, $n=3$. (б) Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой, обрабатывали при 30 и 39°C (30 мин), подвергали тепловому шоку 45°C (30 мин) и проводили выделение митохондриальной (мит) и цитоплазматической (цит) фракций белков, $n=3$.

Предварительный тепловой стресс при 37°C значительно ингибировал выход Hsp60p из митохондрий. Выход цитохрома *c* из митохондрий также ингибировался, но в значительно меньшей степени. Изоцитратдегидрогеназа (Idh2p) локализуется в митохондриальном матриксе. Уровень Idh2p значительно снижался при повышении температуры, но этот белок не обнаруживался в цитоплазматической фракции (рис. 18а). Полученные результаты указывают, что предварительный тепловой стресс, при котором наблюдается повышение количества БТШ, подавляет развитие ПГК в клетках арабидопсиса, блокируя выход цитохрома *c* и Hsp60p из митохондрий.

Цитоплазматические белки Hsp101p и Hsp17.6p (класс I) были обнаружены в митохондриальной фракции клеток, предварительно обработанных при 37°C, а затем подвергнутых жесткому тепловому шоку 50°C (рис. 18а). При жестком тепловом шоке эти белки образуют олигомерные комплексы с агрегированными белками (Lee et al., 2005). Вероятно, эти комплексы осаждаются вместе с митохондриями. Однако, если Hsp17.6p (класс I) оказывался в цитоплазматической фракции клеток, подвергнутых тепловому воздействию при 37°C (без последующего теплового шока при 50°C), то Hsp101p в этих же условиях обнаруживался исключительно в митохондриальной фракции (рис. 18а).

Для изучения влияния теплового стресса на выход митохондриальных белков в цитозоль, дрожжи *S. cerevisiae* обрабатывали при 39°C (30 мин), а затем подвергали повреждающему тепловому воздействию при 45°C (30 мин). Как видно на рис. 18б, тепловой шок при 45°C вызывал выход цитохрома *c* и Hsp60p из митохондрий клеток дрожжей в цитозоль, но если клетки дрожжей предварительно обрабатывали при 39°C, то появления этих белков в цитозоле не наблюдалось. Белок Hsp104p обнаруживался в митохондриальной фракции дрожжей. Но, в отличие от Hsp101p арабидопсиса, Hsp104p распределялся равномерно между митохондриальной и цитоплазматической фракциями. Таким образом, предварительный тепловой стресс, который повышает уровень БТШ, подавляет выход цитохрома *c* и Hsp60p из митохондрий. Это позволяет предполагать, что БТШ могут ингибировать развитие ПГК в клетках дрожжей и *A. thaliana*. Поскольку Hsp101p/Hsp104p обнаруживаются в митохондриальной фракции, возможно, эти белки связываются с митохондриями и модулируют их активность при повышении температуры.

Чтобы изучить, как влияет повышение уровня БТШ на продукцию АФК при умеренном тепловом шоке, клетки дрожжей инкубировали при 39°C (30 мин), затем подвергали тепловому воздействию при 45°C (30 мин). В соответствии с результатами, приведенными выше (рис. 9), повышение температуры до 39°C не вызывало заметного повышения продукции АФК по сравнению с контролем, 30°C (рис. 19а). Но тепловой шок 45°C приводил к значительному увеличению продукции АФК. Повышение продукции АФК в этих условиях теплового шока полностью блокировалось, если клетки предварительно обрабатывали при 39°C (рис. 19 а и б). Таким образом, тепловой стресс при 39°C полностью блокировал как гибель клеток (рис. 15а), так и усиление генерации АФК (рис. 19в). Поскольку тепловой стресс при 39°C приводит к синтезу Hsp104p (рис. 15в) и защищает клетки дрожжей от последующего умеренного теплового шока при 45°C (рис. 15а), полученные данные указывают на отрицательную зависимость между присутствием БТШ и генерацией АФК в клетках дрожжей при тепловом шоке.

Чтобы изучить, как повышение уровня БТШ повлияет на изменение мТДψ, клетки дрожжей инкубировали при 39°C (30 мин), затем обрабатывали 10 мин при 45°C в присутствии TMRM. Изменение интенсивности флуоресценции TMRM регистрировали сразу же после теплового шока и спустя 30, 60, 120 и 180 мин инкубации при 30°C. Как видно на рис. 20, обработка при 45°C приводила примерно к одинаковому увеличению флуоресценции TMRM в контрольных клетках и клетках, предварительно обработанных при 39°C, если измерение проводили сразу же после окончания теплового воздействия. Однако у клеток, обработанных при 45°C без предварительного теплового стресса, повышенный уровень флуоресценции TMRM сохранялся в течение 60 мин инкубации при обычной температуре, а у клеток, обработанных при 39°C, через 30 мин инкубации значение мТДψ снижалось почти до контрольного уровня (рис. 20). Следовательно, повышение уровня БТШ при 39°C не предотвращает повышения мТДψ в клетках дрожжей *S. cerevisiae* во время теплового шока при 45°C, однако приводит к быстрому его снижению во время восстановительного периода. Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать, что БТШ, синтез которых возрастает во время обработки при 39°C, способствуют восстановлению мТДψ до нормального уровня после окончания теплового шока.

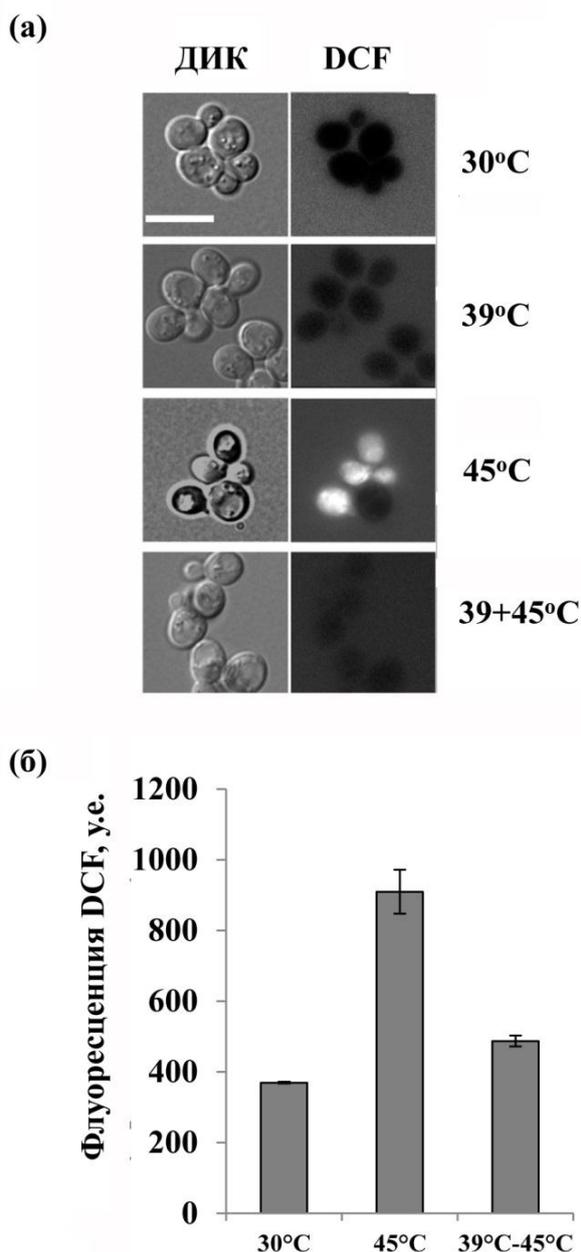


Рис. 19. Влияние предварительного теплового стресса при 39°C на продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae* при тепловом шоке 45°C.

Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой, обрабатывали при 30 или 39°C (30 мин) и подвергали тепловому шоку 45°C (30 мин) в присутствии 50 мкМ H_2DCF DA, $n=3$. (а) Микрофотографии клеток с флуоресценцией H_2DCF DA, $n=3$. (б) Количественный обсчет данных, $n=3$, $m \pm S.E.$ ДИК – дифференциально-интерференционный контраст.

Масштабная линейка – 10 мкм.

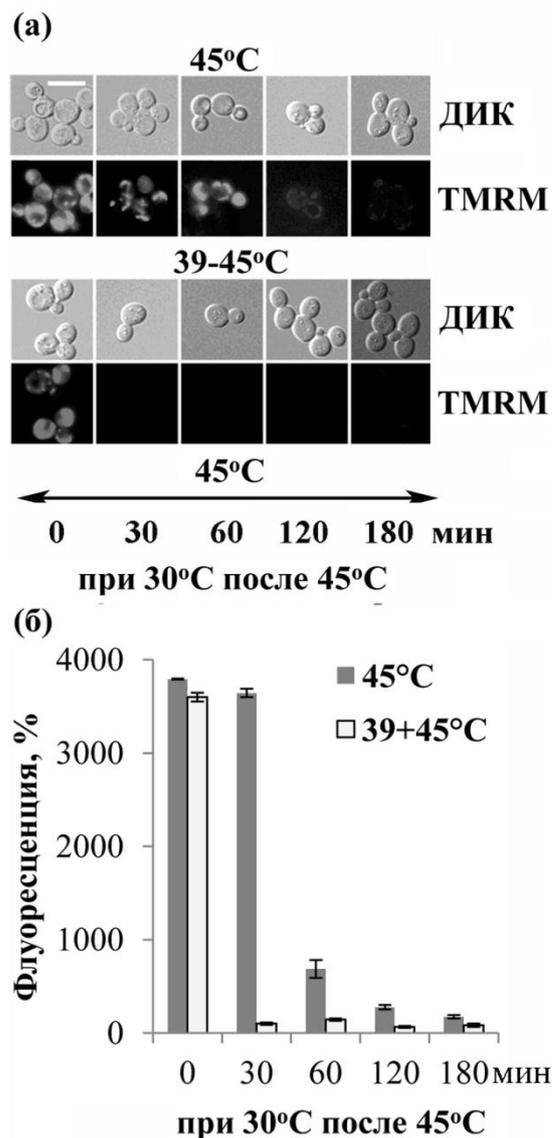


Рис. 20. Влияние предварительного теплового стресса 39°C на длительность гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны *S. cerevisiae* при тепловом шоке 45°C.

Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой, обрабатывали при 30 или 39°C (30 мин) и подвергали тепловому шоку 45°C (10 мин) в присутствии 1 мкМ TMRM. Динамику флуоресценции TMRM анализировали при 30°C спустя 0-180 мин после окончания теплового шока, $n=3$, $m \pm S.E.$ (а) Микрофотографии клеток с флуоресценцией TMRM. (б) Количественный обсчет полученных данных. ДИК – дифференциально-интерференционный контраст.

Масштабная линейка – 10 мкм.

Митохондрии регулируют экспрессию генов БТШ

Митохондриальная регуляция экспрессии гена Hsp104p *S. cerevisiae*

Конститутивный уровень синтеза Hsp104p в клетках *S. cerevisiae* возрастает в условиях окислительного энергетического метаболизма (рис. 3). Нарушение функционирования дыхательной цепи в результате мутации *petite* ингибирует индукцию синтеза Hsp104p при тепловом стрессе (Рихванов и др., 2004; представлено в диссертации). Эти факты позволили предположить существование связи между индукцией синтеза БТШ и активностью митохондрий. Чтобы подтвердить существование такой зависимости, было изучено влияние митохондриальных ингибиторов и разобщителей на индукцию синтеза БТШ и развитие индуцированной термотолерантности, используя клетки дрожжей *S. cerevisiae* и культуру клеток *A. thaliana*.

Обработка ДНФ при 30°C повышала способность клеток *S. cerevisiae* выдерживать действие теплового шока (рис. 21а), но не влияла на синтез Hsp104p (рис. 21б). Предварительный тепловой стресс при 39°C индуцировал синтез Hsp104p (рис. 21б) и более чем в 100 раз повышал термотолерантность дрожжей (рис. 21а). Присутствие ДНФ во время обработки при 39°C приводило к совершенно противоположному результату, чем при 30°C. В этом случае ДНФ ингибировал развитие индуцированной термотолерантности (рис. 21а) и подавлял индукцию синтеза Hsp104p (рис. 21б). В отличие от Hsp104p, синтез Hsp60p не изменялся во время предварительной обработки при 39°C, соответственно, не наблюдалось никаких изменений в уровне этого белка при обработке исследуемыми агентами (рис. 21б).

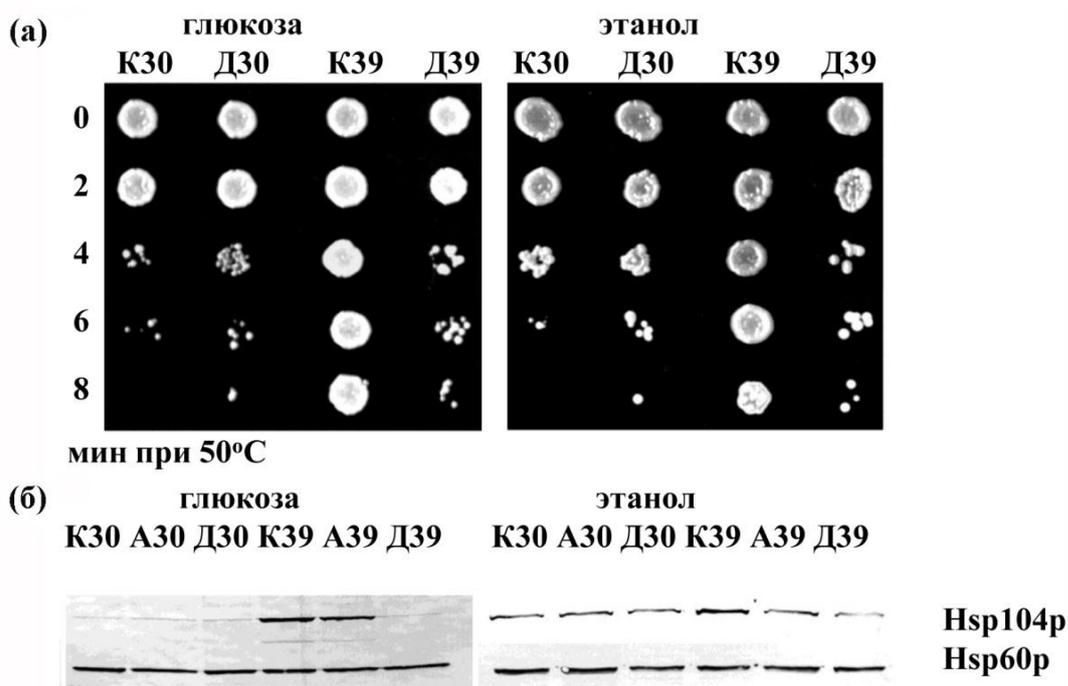


Рис. 21. Эффект азид и ДНФ на индуцированную термотолерантность и синтез Hsp104p в клетках *S. cerevisiae*.

Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой или этанолом, инкубировали при 30 или 39°C в присутствии 0,15 мМ азид или 1 мМ ДНФ. (а) Жизнеспособность клеток после теплового шока. (б) Вестерн-блоттинг суммарных белков. n=3. К – контроль, А – азид; Д – ДНФ.

Нарушение митохондриальных функций во время умеренного теплового шока (45°C) приводило к различному эффекту на термотолерантность в зависимости от окислительного или бродильного энергетического метаболизма дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 4). В данном эксперименте клетки дрожжей после обработки при 30 или 39°C отмывали от ингибиторов перед тем, как подвергнуть их жесткому тепловому шоку при 50°C. Тем не менее, необходимо было изучить, зависит ли способность ДНФ подавлять индукцию синтеза Hsp104p и развитие индуцированной термотолерантности после теплового стресса от типа энергетического метаболизма. Инкубация клеток *S. cerevisiae* на несбраживаемом источнике углерода, этаноле, приводила к повышению конститутивного синтеза Hsp104p (рис. 21б). Подавляющий эффект ДНФ на индукцию синтеза Hsp104p и развитие индуцированной термотолерантности не зависел от типа энергетического метаболизма. Этот агент ингибировал развитие индуцированной термотолерантности и индукцию синтеза Hsp104p после теплового стресса как у дрожжей, выращенных на этаноле, так и выращенных на глюкозе (рис. 21).

Полностью аналогичный результат был получен при изучении действия СССР (карбонил-цианид-3-хлоро-фенилгидразон) и азида натрия. Обработка этими агентами при обычной температуре защищала клетки дрожжей от гибели, но присутствие СССР и азида во время теплового стресса 39°C подавляло индукцию синтеза Hsp104p и развитие индуцированной термотолерантности (рис. 22 и 25, представлено в диссертации). Несколько другой результат был получен при изучении действия цианида натрия (ингибитора комплекса IV) и антимицина А (ингибитора комплекса III). На среде с этанолом антимицин А так же эффективно, как и СССР, ингибировал тепловую индукцию синтеза Hsp104p (рис. 22б) и подавлял развитие индуцированной термотолерантности (рис. 22а). Но на среде с глюкозой какого-либо отрицательного эффекта антимицина А и цианида на синтез Hsp104p и развитие индуцированной термотолерантности не наблюдалось (рис. 22). Аналогичный результат был получен при использовании мутанта *petite* (Rikhvanov et al., 2005, представлено в диссертации). Следовательно, антимицин А и цианид, в отличие от азида, ДНФ и СССР, специфически ингибируют индукцию синтеза Hsp104p при тепловом стрессе только у активно дышащих клеток, которые используют окислительное фосфорилирование.

Тепловой стресс вызывает гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны в клетках *S. cerevisiae* (рис. 9). Чтобы изучить зависимость между гиперполяризацией и индукцией синтеза Hsp104p, сравнивали способность антимицина А и СССР подавлять повышение мТΔψ при тепловом стрессе. Эти агенты снижают мТΔψ на внутренней митохондриальной мембране различным способом. Протонофор СССР, обеспечивая свободный транспорт протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, депольризует ее. Антимицин А, являясь ингибитором комплекса III, снижает мТΔψ, ингибируя транспорт электронов по дыхательной цепи (Slater, 1967).

Повышение температуры инкубации до 39°C индуцировало повышение мТΔψ в клетках *S. cerevisiae*. Антимицин А и СССР при обычной температуре инкубации (30°C) одинаково эффективно снижали мТΔψ в клетках *S. cerevisiae*, выращиваемых на среде с глюкозой и этанолом. Но эффект используемых агентов на повышение мТΔψ при 39°C резко различался. Добавление СССР подавляло повышение мТΔψ при тепловом стрессе независимо от типа энергетического метаболизма (рис. 23а). В то же время, антимицин А слабо ингибировал повышение мТΔψ

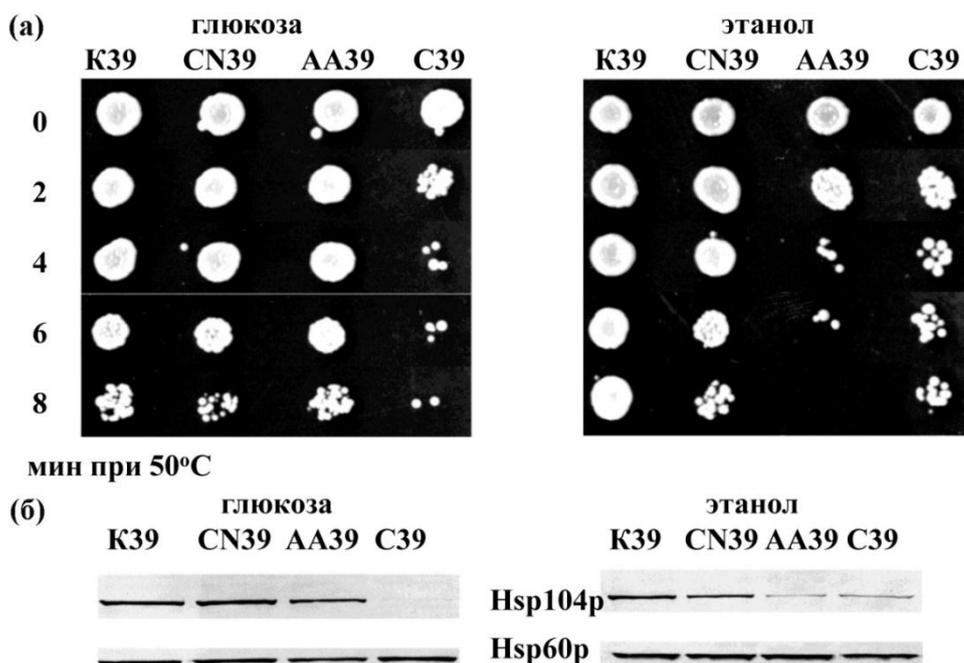


Рис. 22. Эффект цианида, антимицина А и СССР на индуцированную термотолерантность и синтез Hsp104p в клетках *S. cerevisiae*. Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой или этанолом, инкубировали при 39°C (30 мин) в присутствии 1 мМ цианида, 10 мкМ антимицина А или 20 мкМ СССР. (а) Жизнеспособность клеток, определяемая с помощью репликатора, n=3. (б) Вестерн-блоттинг суммарных белков, n=3. К – контроль, CN – цианид, AA – антимицин А, С – СССР.

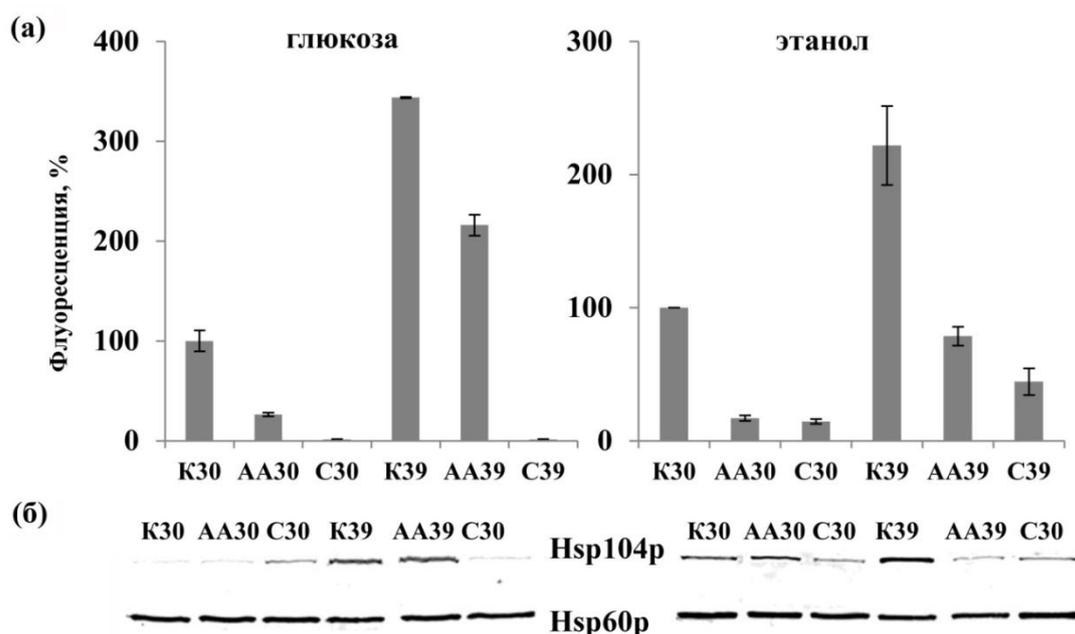


Рис. 23. Эффект антимицина А и СССР на гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны и синтез Hsp104p при тепловом стрессе в клетках *S. cerevisiae*.

Клетки штамма Ψ -74-D694 выращивали на среде с глюкозой или этанолом, инкубировали при 30 или 39°C в присутствии 10 мкМ антимицина А (AA) или 20 мкМ СССР (С). (а) Обсчет интенсивности флуоресценции TMRM, n=3, $m \pm S.E.$ (б) Вестерн-блоттинг суммарных белков, n=3.

Вестерн-блоттинг суммарных белков, n=3. (в) Микрофотографии клеток в присутствии TMRM, n=3. К – контроль; А – азид; Д – ДНФ.

при 39°C у дрожжей на среде с глюкозой, но на среде с этанолом степень ингибирования была такая же, что и в случае с СССР (рис. 23а). Агенты, способные подавлять повышение мТΔψ при тепловом стрессе, одновременно подавляли индукцию синтеза Hsp104p при тепловом стрессе. Присутствие СССР ингибировало синтез Hsp104p при 39°C у дрожжей на обеих средах, а антимицин А подавлял тепловую индукцию синтеза Hsp104p на среде с этанолом, но не имел никакого эффекта на этот процесс на среде с глюкозой (рис. 23б). Следовательно, наблюдается положительная зависимость между способностью используемых агентов подавлять повышение мТΔψ при тепловом стрессе и ингибировать тепловую индукцию синтеза Hsp104p. Поскольку азид ингибировал индуцированную термотолерантность в клетках мутанта *hsp104Δ S. cerevisiae* (представлено в диссертации), очевидно, что тепловая индукция синтеза других БТШ также подавляется у дрожжей при подавлении гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны.

Известно, что БТШ накапливаются в большом количестве в клетках *S. cerevisiae* в стационарной фазе роста (Klosinska et al., 2011). В соответствии с этими результатами, клетки штамма *S. cerevisiae* в стационарной фазе синтезировали большое количество Hsp104p (рис. 24б) без теплового стресса и отличались повышенной базовой термотолерантностью (рис. 24а). В отличие от клеток дрожжей в логарифмической фазе роста (рис. 21а), в стационарной фазе гибель наблюдалась только после 60 мин обработки при 50°C (рис. 24а). Тепловой стресс при 39°C не приводил к повышению уровня Hsp104p в клетках стационарной культуры (рис. 24б), соответственно, не наблюдалось дополнительного повышения термотолерантности (рис. 24а). Азид и ДНФ в стационарной фазе не влияли ни на уровень синтеза Hsp104p (рис. 24б), ни на термотолерантность дрожжей (рис. 24а). Следовательно, азид и ДНФ не имеют отрицательного эффекта на термотолерантность, если Hsp104p изначально присутствует в клетках в большом количестве. Поэтому подавление индуцированной термотолерантности в клетках *S. cerevisiae*, находящихся в логарифмической фазе роста (рис. 21а), определяется подавлением синтеза Hsp104p (рис. 21б), а также, вероятно, других БТШ.

В отличие от дрожжей, находящихся в логарифмической фазе, тепловой стресс 39°C не вызывал повышения флуоресценции TMRM в клетках *S. cerevisiae*, находящихся в стационарной фазе (рис. 24в). Следовательно, отсутствие повышения мТΔψ при тепловом стрессе в клетках дрожжей, находящихся в стационарной фазе, сопровождается отсутствием дополнительной индукции синтеза Hsp104p. Полученный результат подтверждает зависимость между активацией экспрессии Hsp104p при тепловом стрессе и повышением мТΔψ, а также показывает, что усиление флуоресценции TMRM в клетках дрожжей не является следствием неспецифического накопления красителя в клетке при повышении температуры.

Азид, ДНФ и СССР вызывают повышение уровня цАМФ в клетках дрожжей *S. cerevisiae* (Thevelein, de Winde, 1999), а экзогенный цАМФ подавляет индукцию синтеза БТШ при тепловом стрессе (Boy-Marcotte et al., 1998). цАМФ активирует протеинкиназу А (цАМФ-ПКА), которая у дрожжей состоит из каталитических субъединиц, кодируемых генами *TPK1*, *TPK2* и *TPK3*, и регуляторной субъединицы, кодируемой геном *BCY1* (Thevelein, de Winde, 1999). У мутанта S7-7A, несмотря на делецию генов двух каталитических субъединиц *TPK1* и *TPK2* (*TPK1 tpk2Δ tpk3Δ BCY1*), активность цАМФ-ПКА не отличается от дикого типа (Cameron et al., 1988). В клетках этого мутанта азид ингибировал индукцию синтеза Hsp104p (рис. 25б) и индуцированную термотолерантность (рис. 25а) после теплового стресса

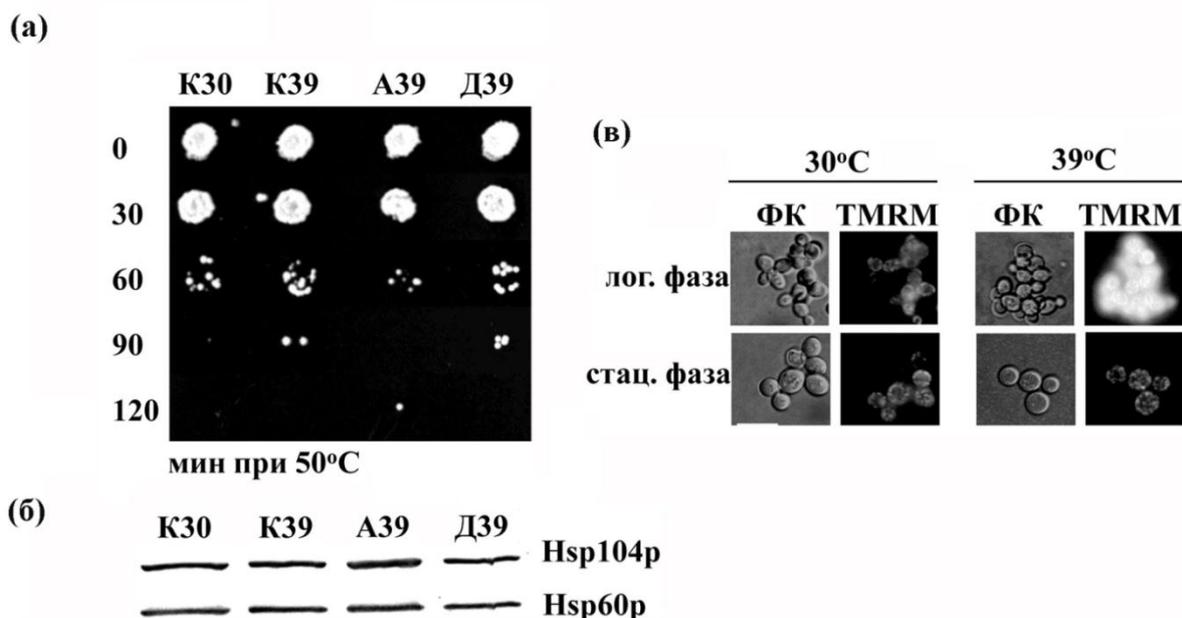


Рис. 24. Эффект азида и ДНФ на индуцированную термотолерантность, синтез Hsp104p и изменение мТДψ в стационарной культуре *S. cerevisiae*.

Клетки штамма Ψ-74-D694 выращивали на среде с этанолом 48 ч, инкубировали при 30 или 39°C (30 мин) в присутствии 0,15 мМ азида или 1 мМ ДНФ. (а) Жизнеспособность клеток после теплового шока, определяемая с помощью репликатора, n=3. (б) Вестерн-блоттинг суммарных белков, n=3. (в) Микрофотографии клеток в присутствии TMRM. К – контроль, А – азид, Д – ДНФ, ФК – фазовый контраст. Масштабная линейка – 10 мкм.

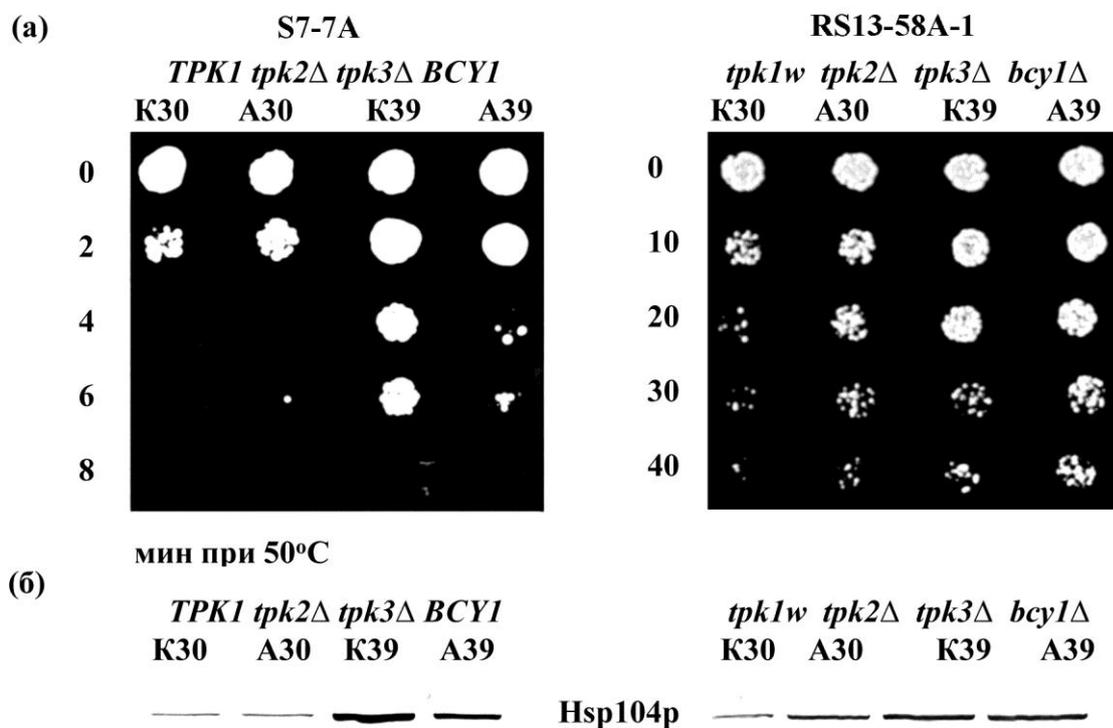


Рис. 25. Эффект азида на индуцированную термотолерантность в клетках *S. cerevisiae* с пониженной активностью цАМФ-ПКА.

Клетки мутантов S7-7A и RS13-58A-1 выращивали на среде с глюкозой, инкубировали при 30 или 39°C (30 мин) в присутствии 0,15 мМ азида. (а) Жизнеспособность клеток после теплового шока 50°C, n=3. (б) Вестерн-блоттинг суммарных белков, n=3.

39°C, так же как и в клетках штамма Ψ -74-D694. У мутанта RS13-58A-1, который отличается от S7-7A дополнительной делецией гена *BCY1* и миссенс мутацией в гене *TPK1* (*tpk1w tpk2Δ tpk3Δ bcy1Δ*), активность цАМФ-ПКА понижена (Camegon et al., 1988). В клетках мутанта с пониженной активностью цАМФ-ПКА азид не ингибировал индукцию синтеза Hsp104p и индуцированную термотолерантность после теплового стресса 39°C. В отличие от штамма S7-7A, а также других штаммов *S. cerevisiae* с нормальной активностью цАМФ-ПКА, обработка азидом при 30°C индуцировала синтез Hsp104p в клетках мутанта с пониженной активностью цАМФ-ПКА (рис. 25б).

Митохондриальная регуляция экспрессии генов БТШ *A. thaliana*

Максимальная индукция синтеза БТШ в клетках *A. thaliana* наблюдается при температурной обработке 37°C (рис. 16). Чтобы изучить эффект митохондриальных ингибиторов и разобщителей на экспрессию генов БТШ растений, культуру клеток *A. thaliana* обрабатывали азидом натрия и СССР при 26 или 37°C и определяли экспрессию генов методом полуколичественного ОТ–ПЦР анализа.

Тепловой стресс (37°C) увеличивал уровень транскриптов *HSP101* и *HSP17.6C-C1*. Азид и СССР ингибировали экспрессию *HSP101*, индуцированную тепловым стрессом. Обработка азидом и СССР при обычной температуре инкубации несколько увеличивала экспрессию *HSP17.6C-C1* (рис. 26а). Таким образом, с одной стороны, обработка митохондриальными ингибиторами и разобщителями при обычной температуре инкубации (26°C) может активировать экспрессию БТШ, а с другой стороны, эти агенты подавляют экспрессию генов БТШ, индуцированную тепловым стрессом.

Тепловой стресс (37°C, 120 мин) оказывал протекторный эффект на жизнеспособность клеток *A. thaliana* после обработки при 50°C (10 мин) (рис. 26б). Присутствие азида и СССР во время теплового стресса подавляло индуцированную термотолерантность (рис. 26б). Поскольку использованные концентрации агентов сами по себе не оказывали отрицательного влияния на жизнеспособность (представлено в диссертации), очевидно, что азид и СССР специфически подавляют защитную реакцию клеток *A. thaliana* на тепловой шок. Способность азида и СССР подавлять индуцированную термотолерантность объясняется их способностью подавлять активацию экспрессии генов БТШ при тепловом стрессе (рис. 26). Аналогичным образом, обработка ДНФ и антимицином А ингибировала экспрессию генов БТШ и индуцированную термотолерантность (представлено в диссертации).

Чтобы изучить эффект азида и СССР на изменение мТДψ, клетки *A. thaliana* инкубировали 10 мин при 26 или 37°C в присутствии JC-1 и регистрировали интенсивность флуоресценции. Тепловой стресс при 37°C увеличивал флуоресценцию JC-1 в красном канале, подтверждая, что повышение температуры вызывает повышение мТДψ. Антимицин А и СССР эффективно подавляли флуоресценцию JC-1 в красном канале при 26 и 37°C (рис. 26в). Таким образом, гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны в клетках *A. thaliana* при тепловом стрессе сопровождается активацией экспрессии генов БТШ. Способность митохондриальных ингибиторов и разобщителей подавлять развитие индуцированной термотолерантности и активацию экспрессии БТШ при тепловом стрессе коррелирует с их способностью подавлять повышение мТДψ.

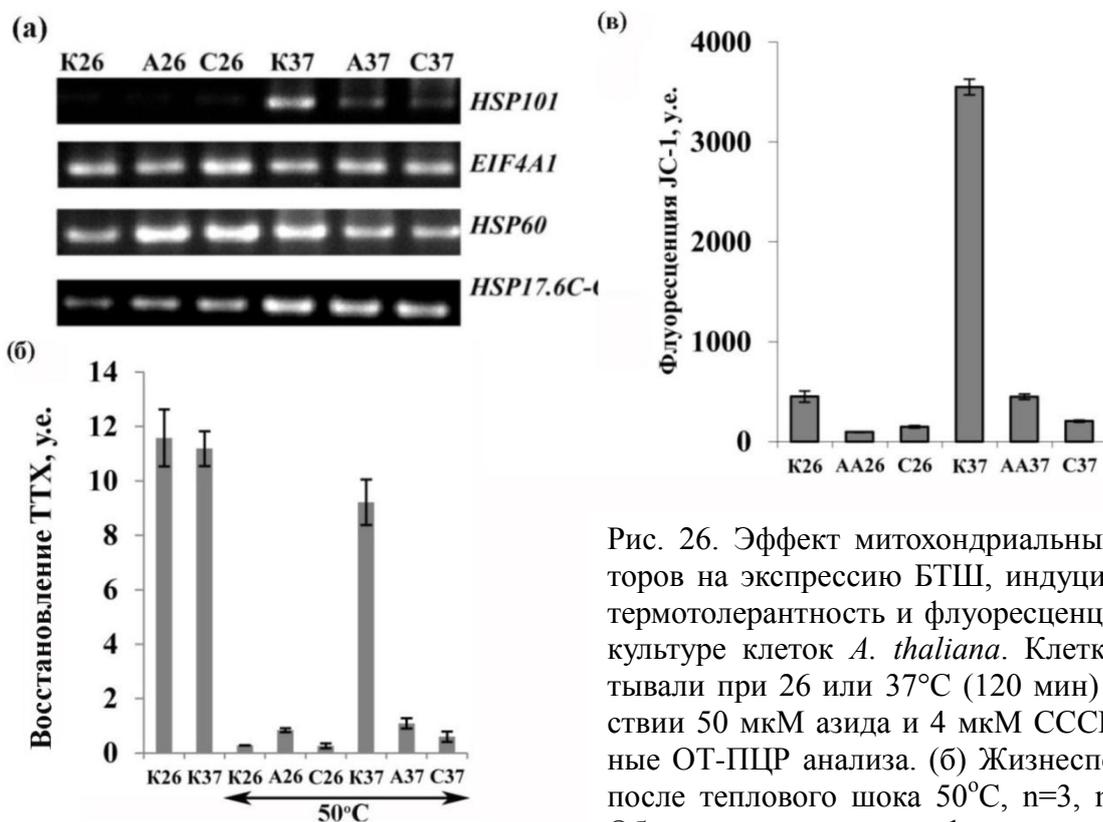


Рис. 26. Эффект митохондриальных ингибиторов на экспрессию БТШ, индуцированную термотолерантность и флуоресценцию JC-1 в культуре клеток *A. thaliana*. Клетки обрабатывали при 26 или 37°C (120 мин) в присутствии 50 мкМ азида и 4 мкМ СССР. (а) Данные ОТ-ПЦР анализа. (б) Жизнеспособность после теплового шока 50°C, n=3, m±S.E. (в) Обсчет интенсивности флуоресценции JC-1, n=3, m±S.E. К – контроль; А – азид; С – СССР.

Обработка экзогенной салициловой кислотой и фторидом натрия, так же как и обработка митохондриальными ингибиторами и разобщителями, ингибировала повышение мтΔψ при тепловом стрессе в культуре клеток *A. thaliana*, что сопровождалось подавлением экспрессии генов БТШ и развитием индуцированной термотолерантности (представлено в диссертации).

Кальций и ответ дрожжей *S. cerevisiae* на тепловой стресс

Есть основание полагать, что существует связь между гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны и гомеостазом внутриклеточного Ca^{2+} . Обработка клеток дрожжей амиодароном, вызывающая кратковременное повышение уровня кальция в цитозоле $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ (Gupta et al., 2003), приводила к повышению мтΔψ в клетках *S. cerevisiae* (Pozniakovsky et al., 2005). Аналогичным образом, повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках млекопитающих при тепловом стрессе сопровождалось повышением мтΔψ (Balogh et al., 2005).

Чтобы выяснить возможную зависимость между гомеостазом Ca^{2+} и повышением мтΔψ при тепловом стрессе, изучали эффект теплового стресса на изменение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках *S. cerevisiae*. Повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле дрожжей может происходить за счет поступления кальция из внутриклеточных компартментов или за счет его транспорта через плазматическую мембрану (Cunningham, 2011). Белки Ssh1p и Mid1p *S. cerevisiae* участвуют в поступлении Ca^{2+} через плазматическую мембрану (Cunningham, 2011). В эксперименте использовали штамм H207 родительского типа *S. cerevisiae*, PT, а также изогенные ему мутанты: *cch1Δ* (штамм H311), *mid1Δ* (штамм H317), *mid1Δcch1Δ* (штамм H319). Клетки трансформировали плазмидой pGAPAQ1, содержащей ген апоэкворина. Апоэкворин при обработке целентеразином превращается в экворин, белок, люминесцирующий в

присутствии ионов Ca^{2+} . Для изучения влияния теплового стресса на изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} дрожжи выращивали либо на минимальной среде SC, либо на полной среде YEPD, помещали в ячейку люминометра и после 60 с измерения люминесценции повышали температуру до 39°C путем добавления заранее нагретой до 70°C питательной среды.

При выращивании на среде SC тепловой стресс приводил практически к мгновенному повышению люминесценции экворина в клетках штамма *PT*. Максимум люминесценции регистрировался через 120 с, затем наблюдалось снижение, а спустя ещё 400 с значение люминесценции возвращалось на контрольный уровень (рис. 27а). В клетках одиночных мутантов *cch1Δ* и *mid1Δ*, а также двойного мутанта *mid1Δcch1Δ* люминесценция экворина на среде SC возрастала при тепловом стрессе гораздо слабее, чем у штамма *PT*. Полученные результаты свидетельствуют, что тепловой стресс приводит к повышению уровня $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках дрожжей на среде SC, и это повышение зависит от функционирования белков *Cch1p* и *Mid1p*.

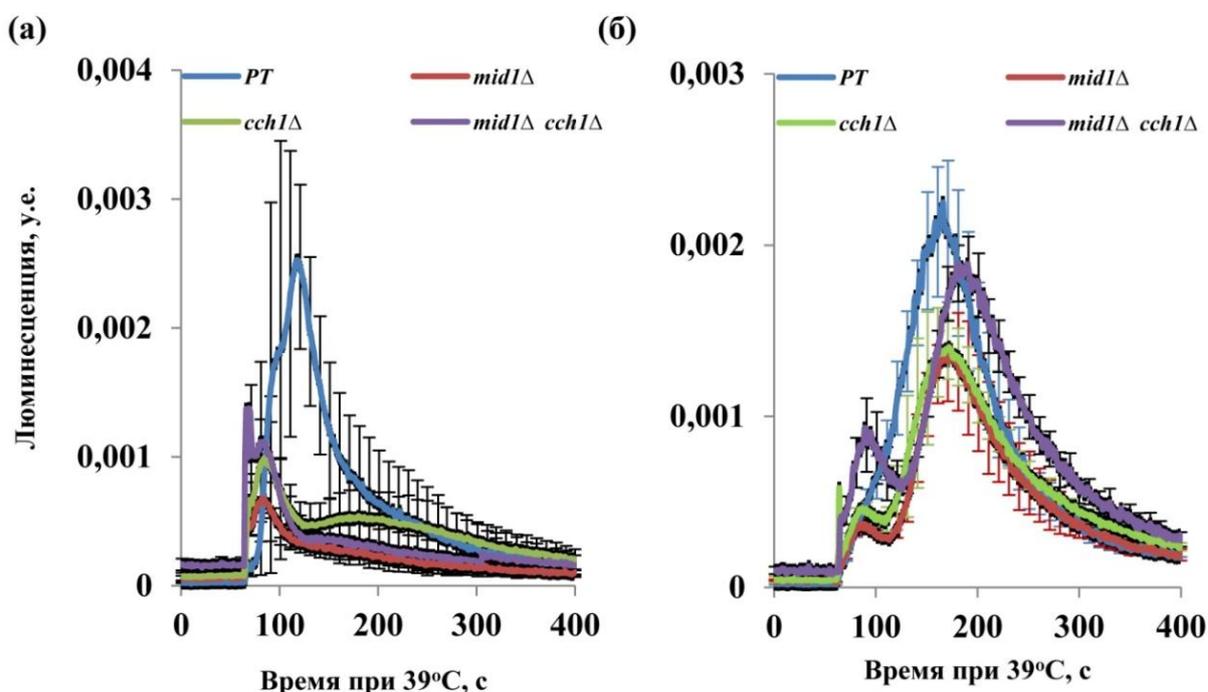


Рис. 27. Люминесценция экворина в цитозоле *S. cerevisiae* при тепловом стрессе. Клетки штамма *S. cerevisiae* родительского типа H207 (*PT*) и изогенных ему мутантов *mid1Δ* (H311), *cch1Δ* (H317), *mid1Δcch1Δ* (H319), трансформированные плазмидой pGARAQ1 с геном апоэкворина, выращивали на среде SC (а) или YEPD (б), вносили в ячейку люминометра и через 60 с инкубации подвергали действию теплового стресса при 39°C . Люминесценция экворина, $n=5$, $m \pm \text{S.E.}$

На среде YEPD тепловой стресс при 39°C , точно так же как и на среде SC, вызывал временное повышение люминесценции экворина в клетках штамма *PT* (рис. 27б). Однако на среде YEPD не наблюдалось статистически значимой разницы между уровнем повышения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетках штамма *PT* и мутантов с нарушением функционирования белков *Cch1p* и *Mid1p* (рис. 27б).

Анализ динамики люминесценции экворина показал, что при тепловом стрессе наблюдается два пика повышения $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$. Наиболее четко это можно увидеть в клетках, инкубированных на среде YEPD, с нарушением функционирования Sch1p и Mid1p белков (рис. 27б). Сравнение данных, представленных на рис. 27 а и б, показывает, что на среде SC в мутантных клетках специфически блокируется второй пик люминесценции экворина, тогда как первый пик остается неизменным. Выращивание клеток на среде YEPD восстанавливает второй пик люминесценции практически до уровня родительского типа. Полученные данные указывают на существование в клетке *S. cerevisiae*, по крайней мере, двух механизмов поступления кальция внутрь клетки при тепловом стрессе, один из которых зависит от функционирования Sch1p и Mid1p, а другой – нет.

Чтобы изучить, как влияют делеции генов *CCH1* и *MID1* на изменение мТДψ, клетки родительского типа и мутантов инкубировали при 30 и 39°C в присутствии 5 мкМ TMRM. При обычной температуре инкубации (30°C) не наблюдалось статистически значимой разницы в уровне флуоресценции TMRM между штаммом родительского типа и одиночными мутантами *mid1Δ* и *cch1Δ* (рис. 28а). В то же время, значение мТДψ у двойного мутанта *mid1Δcch1Δ* было гораздо ниже, чем у родительского типа. Тепловой стресс 39°C повышал мТДψ у всех исследованных штаммов, но динамика повышения и относительные величины мТДψ были различными (рис. 28б). После 10 и 20 мин теплового воздействия у одиночных мутантов *mid1Δ* и *cch1Δ* наблюдалось значительно меньшее повышение мТДψ, чем у штамма родительского типа. Однако после 30 мин обработки при 39°C статистически достоверной разницы между родительским типом и одиночными *mid1Δ* и *cch1Δ* мутантами уже не отмечалось. В то же время, у двойного мутанта *mid1Δcch1Δ* значение мТДψ было ниже, чем у родительского типа на протяжении всего эксперимента (рис. 28б).

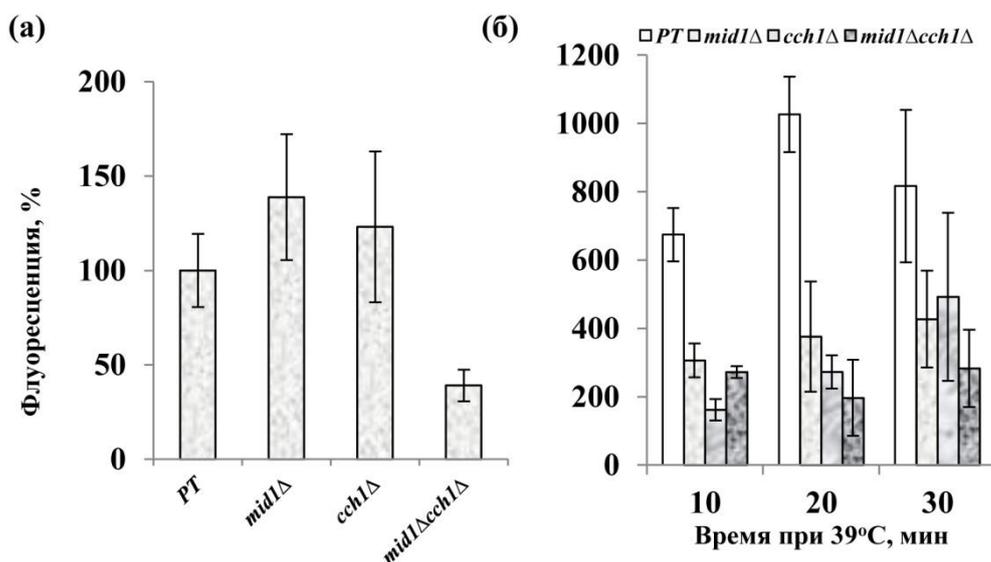


Рис. 28. Влияние *mid1Δ* и *cch1Δ* мутаций на флуоресценцию TMRM при тепловом стрессе в клетках *S. cerevisiae*.

Клетки штамма родительского типа H207 (PT) и изогенных ему мутантов *mid1Δ* (H311), *cch1Δ* (H317), *mid1Δcch1Δ* (H319) выращивали на среде YEPD, обрабатывали при 30 (а) или 39°C (б) в присутствии 5 мкМ TMRM. Обсчет интенсивности флуоресценции TMRM, $n=3$, $m \pm S.E.$

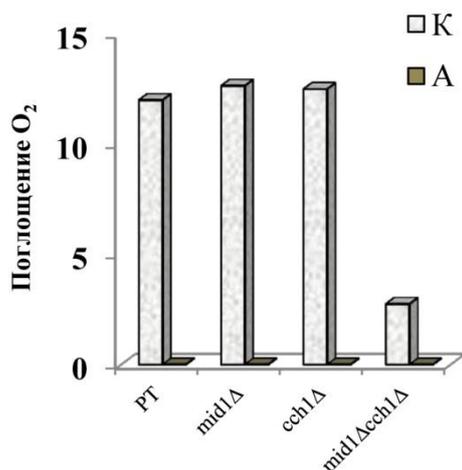


Рис. 29. Влияние *mid1Δ* и *cch1Δ* мутаций на поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae*. Клетки штамма родительского типа H207 (PT) и изогенных ему мутантов *mid1Δ* (H311), *cch1Δ* (H317), *mid1Δ cch1Δ* (H319) выращивали на среде YEPD и инкубировали при 30°C в присутствии 0,15 мМ NaN₃ (А). Скорость потребления кислорода выражали в нмолях O₂ в мин на 10⁷ клеток, n=3.

Измерение уровня поглощения кислорода у исследуемых мутантов показало, что интенсивность дыхания при 30°C была одинаковой у родительского типа и одиночных мутантов *mid1Δ* и *cch1Δ*. В то же время, отсутствие обоих белков Scl1p и Mid1p приводило к значительному снижению скорости поглощения кислорода (рис. 29). Таким образом, понижение дыхательной активности в клетках двойного мутанта *mid1Δcch1Δ* сопровождается снижением мтΔψ. В целом, полученные данные позволяют предполагать, что нарушение гомеостаза [Ca²⁺]_{цит} в результате отсутствия белков Scl1p и Mid1p оказывает значительное влияние на функционирование митохондрий. Это выражается в снижении дыхания и значения потенциала на внутренней митохондриальной мембране у двойного *mid1Δcch1Δ* мутанта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнения способности различных видов дрожжей, а также мутантов *S. cerevisiae* переносить повреждающее действие теплового шока и расти при температуре выше оптимальной, впервые было показано, что между этими двумя явлениями отсутствует зависимость. Клетки дрожжей, неспособные поддерживать рост при повышенной температуре, могут лучше сохранять жизнеспособность после кратковременного жесткого теплового шока (рис. 1). Поэтому предлагается под термином «термотолерантность» понимать способность организма выдерживать повреждающее воздействие теплового шока, а под термином «теплолюбивость» – способность к росту при температурах выше оптимальной. Поскольку эффективность производства АТФ, как правило, возрастает при повышении температуры, которое не оказывает мгновенного негативного эффекта на жизнеспособность растений и дрожжей (Семихатова, 1974; Postmus et al., 2011), предполагается, что теплолюбивость сопровождается активацией окислительного фосфорилирования.

Сравнение скорости роста дрожжей при обычной температуре инкубации подтвердило литературные данные об обратной зависимости между скоростью роста и термотолерантностью (Lu et al., 2009). Чем медленнее скорость роста дрожжей при обычной температуре инкубации, тем лучше они переживают повреждающее действие теплового шока (рис. 1). Поскольку замедление скорости роста, как правило, сопровождается повышением конститутивной синтеза БТШ (Brauer et al., 2008), очевидно, что активация экспрессии генов БТШ в клетках дрожжей и,

вероятно, в клетках растений может осуществляться не только в результате повышения температуры, но и замедления или полной остановки роста.

Впервые проведено сравнение базовой термотолерантности клеток дрожжей, различающихся по типу энергетического метаболизма. Результаты показали, что способность дрожжей переживать повреждающее действие теплового шока определяется функциональной активностью митохондрий. Клетки облигатного аэроба *D. vanriijiae* утилизируют как глюкозу, так и галактозу в ходе окислительного фосфорилирования. Соответственно, не обнаружено никаких различий в термотолерантности дрожжей *D. vanriijiae*, растущих на галактозе или глюкозе (рис. 2). Клетки факультативного анаэроба *S. cerevisiae* при росте на среде с глюкозой получают энергию преимущественно за счет сбраживания глюкозы до этанола, а на среде с галактозой используют окислительное фосфорилирование. При выращивании на среде с галактозой клетки *S. cerevisiae* лучше переживали тепловой шок, чем клетки этого же вида, выращенные на среде с глюкозой (рис. 2). Следовательно, клетки дрожжей, использующие окислительное фосфорилирование, оказываются гораздо более термотолерантными, чем такие же клетки, но использующие брожение. Повышенная термотолерантность клеток, использующих окислительный энергетический метаболизм, сопровождается повышением конститутивного синтеза Hsp104p (рис. 3) и увеличением активности антиоксидантных ферментов (представлено в диссертации). Таким образом, повышение уровня Hsp104p является одним из факторов повышения базовой термотолерантности клеток дрожжей, использующих окислительный энергетический метаболизм.

Впервые показано, что нарушение митохондриальных функций в клетках *S. cerevisiae*, использующих бродильный энергетический метаболизм, в результате утраты мтДНК (мутации *petite*) и в результате обработки митохондриальным ингибитором азидом натрия, приводило к одному и тому же эффекту – повышению термотолерантности (рис. 4 и рис. 5) и подавлению генерации АФК при умеренном тепловом шоке (рис. 6 и рис. 7). Наоборот, обработка азидом натрия усиливала продукцию АФК (рис. 7) и снижала термотолерантность клеток *S. cerevisiae* (рис. 4), использующих окислительный энергетический метаболизм. Полученные данные указывают, что наблюдается прямая зависимость между усилением генерации АФК и гибелью клеток при умеренном тепловом шоке. Повышение генерации АФК происходит за счет функционирования митохондрий дрожжей, поскольку нарушение их функций либо усиливает, либо ингибирует продукцию АФК. Очевидно, что митохондрии, генерируя токсичные АФК, играют активную роль в запуске механизма гибели дрожжевой клетки при умеренном тепловом шоке.

Механизм генерации АФК при тепловом шоке в клетках дрожжей и растений неизвестен. Однако с использованием изолированных митохондрий показано, что генерация АФК происходит тогда, когда на внутренней митохондриальной мембране повышается потенциал (мт $\Delta\psi$) (Skulachev, 1998). Полученные данные впервые показали, что повышение генерации АФК при тепловом шоке в целых клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana* зависит от гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны. Это дало основание предполагать причинно-следственную связь между мт $\Delta\psi$ и генерацией АФК. Такая зависимость подтверждается следующими фактами. Во-первых, в клетках дрожжей и растений наблюдается прямая зависимость между повышением мт $\Delta\psi$ и усилением продукции АФК при тепловом шоке (рис. 9 и рис. 10). Во-вторых, умеренный тепловой шок при 45°C вызывал повышение мт $\Delta\psi$ в клетках дрожжей, и это событие сопровождалось

значительным усилением продукции АФК. Напротив, не было зарегистрировано повышения мтΔψ в клетках *S. cerevisiae* при жестком тепловом шоке 50°C, одновременно, продукция АФК в этих условиях лишь незначительно превышала контрольный уровень (рис. 9). В-третьих, подавление повышения мтΔψ при тепловом шоке в результате обработки азидом натрия и ДНФ ингибировало усиление продукции АФК в клетках *S. cerevisiae*, выращенных на среде с глюкозой (рис. 7). Тем не менее, зависимость между мтΔψ и усилением генерации АФК не всегда выполняется. Обработка азидом натрия и ДНФ клеток дрожжей, выращенных на среде с этанолом, подавляла повышение мтΔψ при тепловом шоке, но не ингибировала, а, наоборот, усиливала продукцию АФК (рис. 7). Предполагается, что образование АФК митохондриями в клетках растений и дрожжей происходит за счет функционирования внутренних и внешних НАДН дегидрогеназ, которые продуцируют АФК как в результате перевосстановления компонентов дыхательной цепи (то есть, при повышении мтΔψ), так и в результате нарушения функционирования одного из ее компонентов (то есть, при снижении мтΔψ). Будет или нет наблюдаться образование АФК при тепловом шоке в результате функционирования внешних НАДН дегидрогеназ зависит от соотношения НАДН/НАД⁺ в цитозоле. В свою очередь, соотношение НАДН/НАД⁺ в цитозоле снижается при активации бродильного метаболизма, что вызывает снижение митохондриальной продукции АФК. Можно предположить, что одним из механизмов снижения продукции АФК при умеренном тепловом шоке в клетках дрожжей и растений и, соответственно, повышения термотолерантности является перенаправление метаболических путей, что приводит к снижению эффективности окислительного фосфорилирования и активации процессов гликолиза и брожения. Таким образом, если теплолюбивость сопровождается повышением эффективности производства АТФ митохондриями, то термотолерантность, вероятно, сопровождается снижением митохондриальной продукции АТФ.

Вероятно, гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны при повышении температуры в клетках дрожжей и растений происходит за счет двух механизмов, которые не исключают друг друга. Первый, за счет повышения уровня внутриклеточного Ca²⁺ и последующей активации митохондриальных ферментов. Второй, за счет нарушения функционирования АДФ/АТФ транслокатора, в результате чего подавляется поступление АДФ в митохондрии, ингибируется синтез АТФ и повышается мтΔψ.

Механизм гибели клеток животных различается в зависимости от интенсивности теплового воздействия. При умеренном тепловом шоке гибель клеток происходит активным образом, в результате ПГК, а при более жестком тепловом воздействии клетки гибнут пассивно, в результате некроза (Gabai, Sherman, 2002). В данной работе впервые показано, что точно такая же ситуация наблюдается и в клетках дрожжей при тепловом шоке. Если при умеренном тепловом шоке 45°C гибель клеток дрожжей зависит от повышения мтΔψ и усиления генерации АФК, то при более жестком тепловом шоке 50°C этого не происходит (рис. 9). Мутация *petite* повышает жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* после действия умеренного теплового шока и, наоборот, снижает жизнеспособность после жесткого теплового шока (рис. 5). Следовательно, механизмы гибели клеток дрожжей различаются в зависимости от интенсивности теплового воздействия.

Поскольку повышение генерации АФК митохондриями непременно предшествует развитию ПГК, а мутация *petite* ингибирует ПГК в клетках *S. cerevisiae* во

всех описанных в литературе случаях, то результаты, приведенные выше, дали основания предполагать, что умеренный тепловой шок может активировать развитие ПГК. Последующие исследования подтвердили это предположение. На активный характер гибели клеток дрожжей при умеренном тепловом воздействии указывает способность ЦГ повышать термотолерантность. Такого эффекта не наблюдается при жестком тепловом шоке (рис. 11). Таким образом, гибель при умеренном тепловом шоке требует синтеза белков *de novo*, необходимых для развития ПГК. Динамика снижения жизнеспособности клеток дрожжей и *A. thaliana* после действия умеренного теплового шока также свидетельствует об активном характере гибели. Непосредственно после теплового шока клетки остаются живыми. Но во время восстановительного периода при обычной температуре инкубации клетки погибают (рис. 12 и рис. 13а), что сопровождается деградацией ДНК (рис. 13б) и усилением продукции АФК (представлено в диссертации). Цитохром *c*, освобождаемый из митохондрий, является важным фактором развития ПГК (Wang, Youle, 2009). Соответственно, умеренный тепловой шок приводил к выходу цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль в клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana* (рис. 14). Таким образом, вся совокупность полученных результатов указывает, что гибель клеток дрожжей и растений при умеренном тепловом шоке имеет признаки ПГК. Ранее было известно, что тепловой шок может вызывать развитие ПГК в культуре клеток растений и животных (Sherman, 2002; Reape, McCabe, 2010), но то, что такое же событие происходит в клетках *S. cerevisiae* показано впервые.

Как правило, развитие ПГК у млекопитающих, дрожжей и растений сопровождается деполяризацией внутренней митохондриальной мембраны. Считается, что при развитии ПГК выход белков, вызывающих развитие ПГК, из митохондрий происходит при открытии митохондриальной поры, что является результатом снижения мтΔψ (Wang, Youle, 2009). Как следует из результатов данной работы, развитие программы самоубийства в клетках дрожжей и растений при тепловом шоке сопровождается значительным повышением мтΔψ (рис. 9 и рис. 10). На основании полученных результатов и ряда литературных данных (Weir et al., 2003; Pozniakovsky et al., 2005) предполагается, что гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны при тепловом шоке является индикатором ранней стадии ПГК, а на более поздней стадии наблюдается ее деполяризация.

Известно, что БТШ защищают клетки от гибели при тепловом шоке, восстанавливая денатурированные и агрегированные при нагревании белки. В то же время показано, что БТШ млекопитающих, модулируя выход про-апоптозных белков из митохондрий и активацию каспазного каскада, могут как ингибировать, так и стимулировать развитие ПГК (Arya et al., 2007). В ходе данной работы впервые показано, что БТШ могут выполнять аналогичную функцию в клетках растений и дрожжей. Нарушение функционирования Hsp104p снижало жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* после умеренного и жесткого теплового шока, несмотря на различные механизмы гибели (рис. 15). Повышение количества БТШ в результате предварительного теплового стресса ингибировало все наблюдаемые признаки развития ПГК в клетках дрожжей и арабидопсиса, включая выход митохондриальных белков из митохондрий в цитозоль (рис. 18), повышение продукции АФК (рис. 19), а также снижало длительность гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны (рис. 20).

Изучение зависимости между индукцией синтеза БТШ и развитием ПГК при тепловом шоке позволило впервые показать, что когда клетки растений и дрожжей

начинают погибать, синтез БТШ ингибируется (рис. 16 и рис. 17). Следовательно, клетки дрожжей и растений не пытаются противостоять повреждению, синтезируя необходимые для своей защиты белки, когда тепловой шок переходит определенный порог. Таким образом, развитие ПГК и синтез БТШ – взаимоисключающие явления в растительной и дрожжевой клетке.

Известно, что выход Hsp60p из митохондрий может активировать развитие ПГК в клетках человека (Xanthoudakis et al., 1999; Chandra et al., 2007). Впервые показано, что аналогичное явление наблюдается в клетках растений и дрожжей. Развитие ПГК при тепловом шоке в клетках *A. thaliana* и *S. cerevisiae* сопровождалось выходом митохондриального белка Hsp60p из митохондрий в цитозоль (рис. 18). Поскольку подавление выхода Hsp60p из митохондрий приводило к повышению термотолерантности и ингибировало появление признаков ПГК, предполагается, что Hsp60p может стимулировать развитие ПГК в клетках дрожжей и растений.

Впервые показано, что цитоплазматический белок Hsp101p *A. thaliana* локализуется преимущественно в митохондриальной фракции белков после теплового стресса (рис. 18а). Гомологичный ему белок Hsp104p также обнаруживается в митохондриальной фракции клеток *S. cerevisiae* (рис. 18б). Такой результат позволяет предполагать, что AtHsp101p и ScHsp104p могут связываться с митохондриями при тепловом стрессе и модулировать их активность. Это предположение подтверждается тем, что инактивация гена *HSP104* приводила к повышению дыхательной активности дрожжей *S. cerevisiae* (представлено в диссертации). Предполагается, что AtHsp101p/ScHsp104p связывается с компонентами актинового цитоскелета, что влияет на процесс слияния и деления митохондрий, формирование митохондриальной сети и продукцию АФК митохондриями.

Полученные результаты указывают, что не только AtHsp101p/ScHsp104p может модулировать активность митохондрий, но и митохондрии регулируют экспрессию генов БТШ. Установлена положительная связь между повышением уровня конститутивной экспрессии Hsp104p и активацией окислительного фосфорилирования (рис. 3). Нарушение дыхательной цепи митохондрий *S. cerevisiae* в результате мутации *petite* подавляет экспрессию Hsp104p при тепловом стрессе (представлено в диссертации). Впервые показано, что нарушение митохондриальных функций в результате обработки митохондриальными ингибиторами и разобщителями подавляет активацию экспрессии генов БТШ при тепловом стрессе в клетках дрожжей (рис. 21 и рис. 22) и растений (рис. 26). Способность митохондрий регулировать экспрессию генов Hsp104p в клетках *S. cerevisiae* при тепловом стрессе, вероятно, зависит от функционирования транскрипционных факторов Msn2p и Msn4p. В клетках с пониженной активностью цАМФ-ПКА (то есть тогда, когда факторы Msn2/Msn4p находятся постоянно в активированном состоянии) обработка азидом натрия не приводила к ингибированию тепловой индукции синтеза Hsp104p (рис. 25).

Показано, что способность митохондриальных ингибиторов и разобщителей подавлять активацию генов БТШ при тепловом стрессе зависит от их способности подавлять повышение мтΔψ (рис. 23). Антимидин А и цианид не подавляли повышение мтΔψ при тепловом стрессе в клетках *S. cerevisiae*, использующих бродильный энергетический метаболизм, одновременно, отсутствовал подавляющий эффект этих агентов на тепловую индукцию синтеза Hsp104p и развитие индуцированной термотолерантности. Напротив, в клетках *S. cerevisiae*, использующих

окислительный энергетический метаболизм, способность антимицина А и цианида подавлять повышение мТΔψ при тепловом стрессе сопровождалась ингибированием индукции синтеза Hsp104p (рис. 23) и индуцированной термотолерантности после теплового стресса (рис. 22). Таким образом, наблюдается прямая зависимость между гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны и активацией экспрессии генов БТШ при тепловом стрессе. Агенты, которые при данных экспериментальных условиях подавляют повышение мТΔψ, одновременно подавляют тепловую активацию экспрессии генов БТШ. Подобная зависимость предполагает наличие причинно-следственной связи между этими явлениями и указывает, что повышение мТΔψ в клетках дрожжей и растений при тепловом стрессе является необходимым этапом в активации экспрессии генов БТШ. Следует подчеркнуть, что данная закономерность выполняется только в условиях теплового стресса, поскольку деполяризация митохондриальной мембраны при обычной температуре инкубации также может приводить к активации экспрессии генов БТШ.

Результаты, показывающие, что обработка экзогенной салициловой кислотой подавляет повышение мТΔψ при тепловом стрессе в культуре клеток *A. thaliana* и одновременно ингибирует тепловую экспрессию генов БТШ, указывают, что регулятором уровня БТШ у растений *in situ* может быть изменение в уровне эндогенной салициловой кислоты (представлено в диссертации).

Фторид натрия, являющийся одним из компонентов атмосферных выбросов, подавляет повышение мТΔψ при тепловом стрессе в культуре клеток *A. thaliana* и ингибирует тепловую экспрессию генов БТШ. Следовательно, этот загрязнитель, в условиях, когда он сам не оказывает отрицательного действия, может подавлять адаптивную реакцию растений на экстремальные факторы внешней среды, ингибируя экспрессию генов БТШ (представлено в диссертации).

В клетках *S. cerevisiae* при самых различных стрессовых воздействиях повышается уровень кальция в цитозоле (Cunningham, 2011). В этом процессе участвуют низкоаффинная и высокоаффинная системы транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану. Известно, что тепловой стресс вызывает временное повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле растений (Saidi et al., 2011) и животных (Balogh et al., 2005). Существуют косвенные данные, указывающие, что повышение $[Ca^{2+}]_{cyt}$ наблюдается при тепловом стрессе и в клетках *S. cerevisiae* (Paidhungat, Garrett, 1997; Birchwood et al., 2001). Чтобы установить зависимость между повышением уровня кальция в цитозоле и гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны, был исследован механизм повышения $[Ca^{2+}]_{cyt}$ в клетках *S. cerevisiae* при тепловом стрессе. Впервые показано, что в условиях пониженной концентрации питательных веществ и Ca^{2+} в среде инкубации, повышение $[Ca^{2+}]_{cyt}$ при тепловом стрессе определяется функционированием высокоаффинной системы транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану (рис. 27а). Нарушение функционирования известных компонентов этой системы, белков Mid1p и Ssh1p, подавляло этот процесс. Когда в среде инкубации концентрация питательных веществ и Ca^{2+} повышена, поступление Ca^{2+} в цитозоль при тепловом стрессе не зависит от присутствия Mid1p и Ssh1p и, вероятно, определяется функционированием низкоаффинной системы транспорта Ca^{2+} (рис. 27б). Анализ динамики повышения кальция показал, что наблюдаются два пика повышения $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (рис. 27б). Делеция генов *MID1* и *CCH1* специфически ингибировала второй пик повышения $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (рис. 27а). Этот результат позволяет предположить, что существует и третий механизм поступления кальция в ци-

тозоль дрожжевой клетки. Этот механизм, вероятно, определяется поступлением Ca^{2+} в цитозоль из клеточных компартментов.

Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ в митохондриях млекопитающих стимулирует активность дыхательных ферментов, приводит к повышению сопряжения между дыханием и окислительным фосфорилированием и, соответственно, повышает мтДψ (Denton, 2009). Система транспорта Ca^{2+} в митохондриии функционирует и у растений (Медведев, 2005). Но неизвестно, может ли повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ вызывать гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны у растений. В клетках дрожжей отсутствует система активного транспорта кальция в митохондриии. Несмотря на это обстоятельство, полученные данные однозначно свидетельствуют, что нарушение гомеостаза внутриклеточного кальция оказывает значительное влияние на функционирование митохондриий *S. cerevisiae*. Утрата белков Mid1p и Ssh1p, определяющих транспорт кальция через плазматическую мембрану, приводит к снижению потенциала на внутренней митохондриальной мембране (рис. 28) и к подавлению дыхательной активности (рис. 29) в клетках *S. cerevisiae*. Представленные данные позволяют предполагать, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в дрожжевой клетке может косвенно, модулируя функционирование сигнальных систем TOR и цАМФ-ПКА, влиять на активность митохондриий.

В целом, вся совокупность полученных результатов, позволяет предложить следующую упрощенную гипотетическую схему участия дрожжевых и растительных митохондриий в ответе клетки на тепловое воздействие. Повышение температуры вызывает открытие кальциевых каналов на плазматической мембране. Что это за каналы и как они функционируют, неизвестно. Полученные в данной работе результаты показывают, что при тепловом стрессе, в условиях низкой концентрации питательных веществ, транспорт кальция через плазматическую мембрану *S. cerevisiae* зависит от белков Mid1p и Ssh1p.

Кратковременное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ как непосредственно, так и косвенно, активирует экспрессию генов БТШ. Длительное повышение уровня кальция в цитозоле может иметь неблагоприятные последствия для клетки. Это может, наоборот, ингибировать экспрессию БТШ и стимулировать гибель. Поэтому из цитозоля кальций транспортируется либо в митохондриии, либо в другие клеточные компартменты. Поступление кальция в митохондриии и, вероятно, в другие клеточные компартменты зависит от значения мтДψ. Если мтДψ понизить в результате обработки митохондриальными ингибиторами, то транспорт Ca^{2+} в митохондриии подавляется, он аккумулируется в цитозоле до критического уровня, при котором активация экспрессии БТШ не происходит. В свою очередь, обработка митохондриальными ингибиторами при обычной температуре инкубации повышает уровень кальция в цитозоле за счет его выхода из клеточных компартментов, что, в отсутствие теплового стресса, также может приводить к активации экспрессии генов БТШ.

Далее, кальций, либо косвенным образом, модулируя активность сигнальных систем, либо непосредственно, оказавшись в митохондриях, вызывает повышение уровня НАДН. Повышенный уровень НАДН стимулирует транспорт электронов по дыхательной цепи, усиливает продукцию АТФ, что в результате приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны и усилению продукции АФК. Повышение генерации АФК до определенного уровня также играет важную роль в активации экспрессии генов БТШ. Митохондриии, таким образом, выступают как «передатчик» и «реле» кальциевого сигнала. Если повышение температуры достигает определенного порога, то нарушается функционирование АДФ/АТФ

транслокатора. В результате, поступление АДФ в митохондрии прекращается, синтез АТФ ингибируется, что приводит к чрезмерному повышению мтΔψ. В этом состоянии генерация АФК митохондриями достигает критического уровня, экспрессия БТШ ингибируется, и активируются процессы гибели. Если тепловой шок не прекращается, повышенный уровень кальция в митохондриях и непрекращающаяся генерация АФК вызывают открытие митохондриальных пор, деполаризацию внутренней митохондриальной мембраны, выход цитохрома *c* и Hsp60p из митохондрий в цитозоль, и, в конечном счете, активацию программы самоубийства.

Следовательно, программа адаптации, включающая в себя активацию экспрессии генов БТШ, и программа самоубийства имеют ряд общих знаменателей при повышении температуры: повышение уровня кальция в цитозоле, гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны и усиление продукции АФК. Митохондрии, таким образом, модулируют уровень кальция в цитозоле и продукцию АФК, определяя жизнь и смерть клетки при тепловом шоке.

ВЫВОДЫ

1. Теплолюбивость дрожжей (способность к росту при температурах выше оптимальной) и термотолерантность дрожжей (способность выдерживать кратковременный повреждающий тепловой шок) определяются различными механизмами. Наблюдается обратная зависимость между скоростью роста и термотолерантностью, чем медленнее скорость роста, тем больше устойчивость дрожжей к повреждающему действию теплового шока.
2. В условиях активного окислительного метаболизма в клетках дрожжей повышается конститутивный синтез белков теплового шока (БТШ) и возрастает активность антиоксидантных ферментов, что определяет повышение базовой термотолерантности.
3. Митохондрии *S. cerevisiae* образуют активные формы кислорода (АФК) при умеренном тепловом шоке, что является одним из факторов гибели клеток.
4. В клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana* наблюдается прямая зависимость между гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны и генерацией АФК при умеренном тепловом шоке.
5. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны, усиление продукции АФК, выход цитохрома *c* и Hsp60p из митохондрий сопровождают гибель клеток *S. cerevisiae* и *A. thaliana* после умеренного теплового шока. Гибель клеток развивается во времени и имеет признаки программированной гибели. Механизм гибели клетки после теплового шока различается в зависимости от интенсивности теплового воздействия.
6. Повышение уровня БТШ подавляет развитие признаков программированной гибели в клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana*, что выражается в повышении жизнеспособности, в подавлении выхода из митохондрий цитохрома *c* и Hsp60p, в снижении уровня продукции АФК и длительности гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны. Полученные результаты позволяют предполагать, что БТШ растений и дрожжей, так же как БТШ жи-

вотных, могут модулировать активность митохондрий и ингибировать развитие программированной гибели.

7. Тепловой стресс, активирующий экспрессию генов БТШ и развитие индуцированной термотолерантности в клетках *S. cerevisiae* и *A. thaliana*, сопровождается кратковременным повышением уровня Ca^{2+} в цитозоле и гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны. Гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны является необходимым условием для активации экспрессии БТШ при тепловом стрессе.
8. Повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле *S. cerevisiae* при тепловом стрессе определяется функционированием низкоаффинной и высокоаффинной (Mid1p и Scl1p) системами транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану. Нарушение гомеостаза внутриклеточного кальция в клетке *S. cerevisiae* в результате одновременной утраты белков Mid1p и Scl1p приводит к ингибированию дыхательной активности и деполяризации внутренней митохондриальной мембраны, что указывает на существование связи между гомеостазом внутриклеточного кальция и функциями митохондрий в клетках дрожжей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Монография

Войников В.К., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Рихванов Е.Г. Стрессовые белки растений. – Иркутск: Изд-во Института географии СО РАН, 2004. – 129 с.

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Rikhvanov E.G., Varakina N.N., Sozinov D.Yu., Voinikov V.K. Association of bacteria and yeasts in hot springs // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V.65, №9. – P.4292-4293.
2. Rikhvanov E.G., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Rachenko E.I., Voinikov V.K. Sodium azide reduces the thermotolerance of respiratively grown yeasts // Curr. Microbiol. – 2002. – V.45, №6. – P.394-399.
3. Rikhvanov E.G., Rachenko E.I., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Heat-shock-induced synthesis of Hsp104 *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by mitochondrial activity // Eur. J. Biochem. – 2003. – V.270 (s1). – P.138.
4. 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, №1. – P.44-59.
5. 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, №4. – P.63-78.
6. Rikhvanov E.G., Romanova N.V., Chernoff Y.O. Chaperone effects on prion and nonprion aggregates // Prion. – 2007. – V.1, №4. – P.217-222.
7. Рихванов Е.Г., Войников В.К. Эффект внеклеточного белка, продуцируемого *Bacillus sp.*, на термотолерантность дрожжей *Debaryomyces vanriji* // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т.31, №3. – С.329-333.
8. Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Синтез белков теплового шока дрожжами *Debaryomyces vanriji* при различных температурах инкубирования // Физиология растений. – 1997. – Т.44, №1. – С.59-63.

9. Рихванов Е.Г., Созинов Д.Ю., Варакина Н.Н., Войников В.К. Стимулирующее действие *Bacillus sp.* на рост дрожжей *Debaryomyces vanriji* // Микробиология. – 1998. – Т.67, №5. – С.643-648.
10. Созинов Д.Ю., Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Раченко Е.И., Войников В.К. Влияние температуры послешоковой инкубации на выживаемость дрожжей *Debaryomyces vanriji* // Физиология растений. – 1999. – Т.46, №2. – С.276-281.
11. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Киселева В.А., Войников В.К. Влияние азидата натрия на устойчивость к тепловому шоку дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Debaryomyces vanriji* // Микробиология. – 2001. – Т.70, № 3. – С.300-304.
12. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Киселева В.А., Войников В.К. Изменение дыхания при действии теплового шока на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. – 2001. – Т.70, № 4. – С.531-535.
13. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Войников В.К. Изучение действие азидата натрия на термоустойчивость дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans* // Микробиология. – 2002. – Т.71, №6. – С.768-772.
14. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Войников В.К. Действие малоната натрия на термотолерантность дрожжей // Микробиология. – 2003. – Т.72, №5. – С.616-620.
15. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Войников В.К. Отсутствие прямой зависимости между способностью дрожжей расти при повышении температуры и их выживаемостью после летального теплового шока // Микробиология. – 2003. – Т.72, №4. – С.476-481.
16. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Войников В.К. Действие ингибиторов цитохром оксидазного комплекса на термоустойчивость дрожжей // Микробиология. – 2003. – Т.72, №2. – С.174-179.
17. Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Раченко Е.И., Боровский Г.Б., Войников В.К. Индукция синтеза Hsp104 *Saccharomyces cerevisiae* при тепловом шоке находится под контролем митохондрий // Генетика. – 2004. – Т.40, №4. – С.341-347.
18. Раченко Е.И., Рихванов Е.Г., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Боровский Г.Б., Войников В.К. Действие азидата натрия на базовую и индуцированную термотолерантность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Физиология растений. – 2004. – Т.51, № 2. – С.198-202.
19. Рихванов Е.Г., Войников В.К. Функции Hsp104p в развитии индуцированной термотолерантности и прионном наследовании у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Успехи современной биологии. – 2005. – Т.125, №1. – С.115-128.
20. Рихванов Е.Г., Лукина Е.А., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Гамбург К.З., Кнорре Д.А., Боровский Г.Б., Войников В.К. Митохондрии, как критическое звено в развитии ответа на тепловой шок у дрожжей с различным типом энергетического метаболизма // Физиология растений. – 2006. – Т.53, №5. – С.695-702.
21. Федосеева И.В., Гамбург К.М., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Таусон Е.Л., Ступникова И.В., Боровский Г.Б., Степанов А.В., Давыденко Е.А., Рихванов Е.Г., Войников В.К. Действие азидата натрия и 2,4-динитрофенола на развитие индуцированной термотолерантности и индукцию синтеза БТШ101 в суспензионной культуре *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. – 2008. – Т.55, № 2. – С.245-252.

22. Павлова Е.Л., Рихванов Е.Г., Таусон Е.Л., Варакина Н.Н., Гамбург К.З., Русалева Т.М., Боровский Г.Б., Войников В.К. Влияние салициловой кислоты на развитие индуцированной термотолерантности и индукцию синтеза БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. – 2009. – Т.56, №1. – С.78-84.
23. Федосеева И.В., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Боровский Г.Б., Рихванов Е.Г., Войников В.К. Эффект ионов кальция на синтез Hsp104 и термотолерантность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. – 2010. – Т.79, № 2. – С.173–179.
24. Пуляевская М.А., Варакина Н.Н., Гамбург К.З., Русалёва Т.М., Степанов А.В., Войников В.К., Рихванов Е.Г. Фторид натрия подавляет синтез БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana*, подвергнутых воздействию теплового стресса // Физиология растений. – 2011. – Т.58, №4. – С.533–541.
25. Гамбург К.З., Варакина Н.Н., Русалева Т.М., Таусон Е.Л., Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Сравнение устойчивости к высокой температуре суспензионных культур арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и теллунгиеллы (*Thellungiella salsuginea*) // Докл. Акад. Наук. – 2011. – Т.439, №3. – С.421–424.
26. Федосеева И.В., Пятрикас Д.В., Варакина Н.Н., Русалёва Т.М., Степанов А.В., Рихванов Е.Г., Боровский Г.Б., Войников В.К. Эффект амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. – 2012. – Т.77, №1. – С.99-109.

Подписано к печати 05.06.2012 г.
Формат 60*84/16. Объем 2,6 п.л. Тираж 150 экз. Заказ № 556.
Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН.
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1.