

Пятрикас  
Дарья Валерьевна

**РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНОВ *HSP104 SACCHAROMYCES CEREVISIAE* И *HSP101 ARABIDOPSIS  
THALIANA***

**03.01.05 – физиология и биохимия растений**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Иркутск – 2013

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

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

Боровский Геннадий Борисович

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук

Глянько Анатолий Константинович

доктор биологических наук,  
профессор

Тимофеев Максим Анатольевич

**Ведущая организация:**

Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

Защита диссертации состоится «19» марта 2013 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: matmod@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 «18» февраля 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 003.047.01,  
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Несмотря на то, что достаточно хорошо известно, как осуществляется регуляция экспрессии генов БТШ на транскрипционном уровне, механизм, вызывающий активацию транскрипционных факторов, остается во многом неизвестным. В последнее время все больше появляется данных о вероятном участии в активации транскрипции таких вторичных мессенджеров, как кальций и активные формы кислорода (АФК) (Saidi et al., 2011; Reddy et al., 2011), которые обладают способностью активировать экспрессию стрессовых генов, в том числе и генов БТШ (Trofimova et al., 1999; Moraitis, Curran, 2004; Volkov et al., 2006; Колупаев, Карпец, 2009; Saidi et al., 2009; Федосеева и др., 2010; Креславский и др., 2012).

Известно, что митохондрии могут как активировать (Krause, Durner, 2004; Kuzmin et al., 2004), так и подавлять (Lee et al., 2002) экспрессию стрессовых генов в процессе ретроградной регуляции. Предварительное мягкое тепловое воздействие, активирующее экспрессию БТШ, вызывает гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны в клетках *S. cerevisiae* (Rikhvanov et al., 2005), в культуре клеток *A. thaliana* (Rikhvanov et al., 2007) и в культуре клеток млекопитающих (Balogh et al., 2005). Агенты, способные при данных экспериментальных условиях снижать потенциал на внутренней митохондриальной мембране (мтΔψ), подавляли также активацию экспрессии БТШ. На этом основании было сделано предположение, что повышение мтΔψ является одним из необходимых условий для активации экспрессии БТШ при тепловом стрессе (Rikhvanov et al., 2005, 2007). Причины повышения мтΔψ в клетках дрожжей и растений остаются неизвестными.

Для клеток животных показано, что повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме ( $[Ca^{2+}]_{цит}$ ) сопровождается транспортом этого иона в митохондрии. Кальций в митохондриях активирует ферменты цикла Кребса, что, в свою очередь, сопровождается повышением мтΔψ (Robb-Gaspers et al., 1998). Очевидно, что аналогичная ситуация происходит в клетках животных и при тепловом стрессе (Balogh et al., 2005). Хотя существуют данные, что растительные митохондрии также участвуют в гомеостазе внутриклеточного кальция (Subbaiah et al., 1998; Logan, Knight, 2003), однако неизвестен механизм взаимодействия цитозольного кальция с митохондриями, а именно, может ли повышение уровня  $[Ca^{2+}]_{цит}$  приводить к повышению потенциала на внутренней митохондриальной мембране и, следовательно, активировать экспрессию БТШ.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось исследование роли кальция в митохондриальной регуляции экспрессии генов *HSP104 S. cerevisiae* и *HSP101 A. thaliana* при тепловом стрессе, действии регулятора кальциевого гомеостаза амиодарона (АМД) и протонифора карбонилцианида *m*-хлорфенилгидразона (СССР).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить влияние амиодарона на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* и культуры клеток *A. thaliana*.
2. Сравнить влияние амиодарона и СССР на экспрессию генов *HSP104* и *HSP101* и термотолерантность клеток при обычной температуре инкубации и тепловом стрессе.
3. Изучить роль транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p в индукции синтеза Hsp104p в клетках *S. cerevisiae* при обработке амиодароном.

4. Изучить возможность модулирования амиодароном термотолерантности клеток *S. cerevisiae* в зависимости от наличия гена *HSP104*.

5. Исследовать влияние теплового стресса, амиодарона и СССР на уровень цитозольного кальция и потенциал внутренней митохондриальной мембраны в культуре клеток *A. thaliana*.

#### **Положение, выносимое на защиту:**

Митохондриальная регуляция экспрессии *HSP101* и *HSP104* в клетках *A. thaliana* и *S. cerevisiae* происходит через взаимообусловленное изменение мембранного потенциала митохондрий и содержания ионов кальция в цитозоле.

#### **Научная новизна работы.**

Амиодарон – активатор кальциевых каналов на плазматической мембране клеток животных и дрожжей вызывает повышение мТΔψ в клетках дрожжей. В работе впервые показано, что этот агент оказывает аналогичное действие на клетки растений. Амиодарон вызывает повышение уровня кальция в цитозоле и гиперполяризацию митохондриальной мембраны в культуре клеток *A. thaliana*. Впервые установлено, что амиодарон и СССР при обычной температуре инкубации индуцируют синтез Hsp101p в клетках *A. thaliana* и Hsp104p в клетках *S. cerevisiae*. Способность амиодарона индуцировать синтез Hsp104p в клетках *S. cerevisiae* зависит от наличия транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p. Показано, что обработка амиодароном защищает клетки *S. cerevisiae* от гибели при жестком тепловом шоке и этот эффект зависит от присутствия Hsp104p.

Впервые продемонстрировано, что при обработке культуры клеток *S. cerevisiae* и *A. thaliana* протонофором СССР, деполяризующем митохондриальную мембрану, происходит увеличение уровня цитозольного кальция, индукция синтеза Hsp104p и Hsp101p, а также повышение термотолерантности. Совместное действие СССР и теплового стресса оказывало аддитивный эффект на содержание кальция в цитозоле, что сопровождалось ингибированием экспрессии Hsp101p *A. thaliana*.

Таким образом, полученные результаты указывают на важную роль ионов кальция в митохондриальной регуляции экспрессии ряда стрессовых белков и развитии термотолерантности клеток растений и дрожжей.

**Научно-практическая значимость.** Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание физиологических механизмов активации экспрессии стрессовых генов с участием митохондрий растений и дрожжей. Показана связь между изменением уровня цитозольного кальция и потенциалом на внутренней митохондриальной мембране, которая играет важную роль в экспрессии стрессовых генов. В работе впервые получены данные о возможности роста термотолерантности дрожжей при действии агентов, модулирующих содержание цитоплазматического кальция.

Поскольку, амиодарон относительно безвреден для растительной клетки и в то же время обладает значительным фунгицидным эффектом, то амиодарон или агенты со сходным механизмом действия потенциально могут быть использованы для обеззараживания сельскохозяйственных растений.

Материалы диссертации могут быть включены в курсы лекций по генетике, экологии, физиологии и биохимии растений, использоваться в профильных научно-исследовательских институтах РАН, РАМН и РАСХН.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликованы 2 статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Результаты исследования по теме диссертации были представлены в устных докладах на научной сессии СИФИБР СО РАН (Иркутск, 2012), на международной конференции «Plant genetics, genomics and biotechnology» (Irkutsk, 2012) и на VI международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы физики, химии, биологии» (Москва, 2013).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (274 источников, в том числе 23 российских и 251 иностранных). Работа изложена на 161 странице, содержит 26 рисунков и 1 таблицу.

**Личное участие автора в получении научных результатов.** 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 следующие штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*:  $\Psi$ -74-D694 (*MATa ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) his3 $\Delta$ -200 ura3-52 leu2-3 112 [psi<sup>-</sup>]*), являющийся родительским типом для изогенного ему мутанта *hsp104 $\Delta$* , предоставлены проф. S. Lindquist (Институт биомедицинских исследований, Уайтхед, США), а также W303-1A (*Mata ade2-1 ura3-1 his3-11 15 leu2-3 112 trp1-1 can1-100 SUC2*), являющийся родительским типом для изогенного мутанта *msn2 $\Delta$ msn4 $\Delta$* , получены от к.б.н. Д.А. Кнорре (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского при МГУ им. М.В. Ломоносова).

В работе также использовали культуру клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (раса Columbia), полученную из 14-ти дневных проростков, выращиваемую в темноте при 26 °С в среде (MS), содержащей соли по Murashige, Skoog (1962), 3 % сахарозы, 0,5 мг/мл тиамина, 0,5 мг/мл пиридоксина и 0,1 мг/мл 2,4-Д. Для экспериментов использовали 8-ми дневную культуру, что соответствовало второй половине логарифмической фазы роста, которая характеризуется наибольшей физиологической активностью клеток и наименьшим конститутивным уровнем синтеза БТШ.

**Обработка клеток.** Обработку клеток *S. cerevisiae* и клеток суспензионной культуры *A. thaliana* производили путем добавления концентрированных растворов действующих веществ в культуральную среду.

**Оценка жизнеспособности.** Количество жизнеспособных клеток дрожжей оценивали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) капельным методом. Количество жизнеспособных клеток суспензионной культуры арабидопсиса оценивали по их способности восстанавливать 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ) (Еникеев и др., 1995).

**Выделение общего белка, электрофорез белков и Вестерн-блоттинг.** Для разрушения клеток биологический материал растирали с кварцевым песком в жидком азоте. Белковые фракции получали методом дифференциального центрифугирования из гомогенатов тканей. Электрофорез белков в ПААГе с ДДС-Na проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970), используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III (“BIO-RAD”, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (“Amersham”, США).

и последующую обработку антителами проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

**ОТ-ПЦР-анализ.** Тотальную РНК выделяли с помощью набора SV Total RNA Isolation System (“Promega”, США). Для синтеза первой цепи кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК, праймер oligo(dT)<sub>18</sub> (20 рМ) и набор REVERTA (“АмплиСенс”, Россия). Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ был выполнен при использовании кДНК в качестве матрицы (50 нг) и геноспецифичных праймеров (10 рМ каждого). Равные объемы ПЦР-продуктов разделяли в 1,5 % агарозном геле.

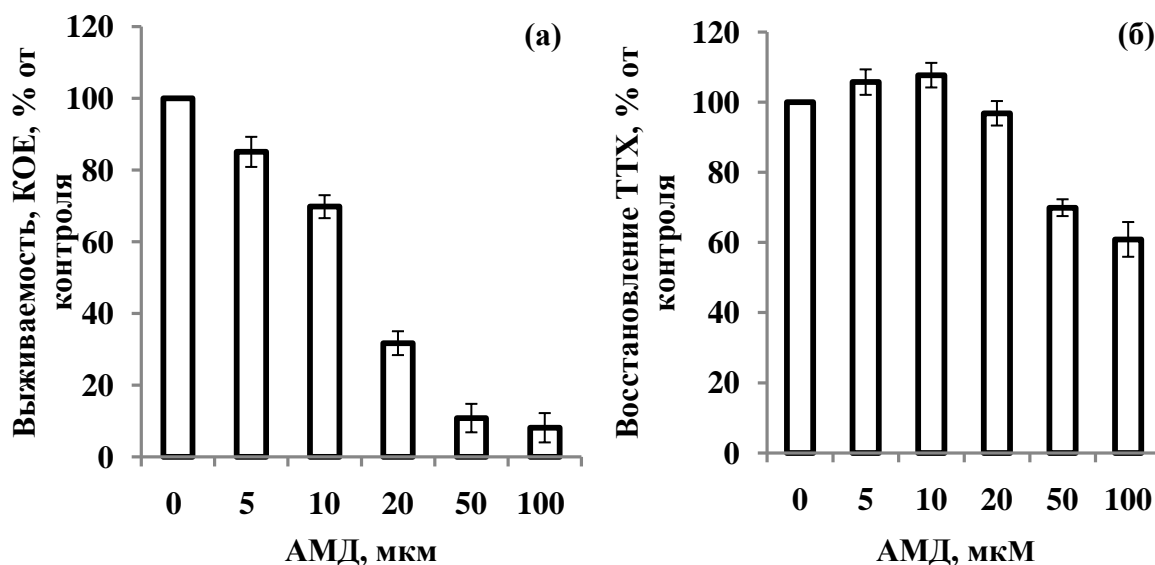
**Микроскопия.** Анализ клеток проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (“Zeiss”, Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений “AxioVision Rel.4.6”. Визуализацию величины потенциала на внутренней митохондриальной мембране клеток *A. thaliana* проводили с использованием 5 мкМ потенциал-зависимого катионного красителя 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',2,2'-тетраэтилбензимидазоло-карбоцианина (JC-1) (“Fluka”, Германия), для дрожжей использовали 5 мкМ потенциал-зависимого катионного красителя метилового эфира тетраметилродамина (TMRM) (“Invitrogen”, США). Для количественной оценки интенсивность флуоресценции митохондрий обсчитывали статистически. Для определения уровня кальция в цитоплазме клеток *A. thaliana* использовали 15 мкМ флуоресцентного красителя Fluo-4/AM (“Invitrogen”, США).

**Статистическая обработка данных.** Эксперименты повторяли не менее 3 раз. Полученные данные обработаны статистически: рассчитаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения (Лакин, 1973).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Влияние АМД на жизнеспособность S. cerevisiae и культуры клеток A. thaliana*

Для изучения токсичного влияния АМД на дрожжи и культуру клеток *A. thaliana* использовали концентрации в диапазоне 0–100 мкМ. В соответствии с литературными данными (Rozniakovsky et al., 2005) обработку АМД клеток дрожжей проводили в течение 60 мин при 30 °С. Культуру клеток *A. thaliana* обрабатывали АМД в течение 120 мин при 26 °С, поскольку одной из задач данного эксперимента являлось определение зависимости между индукцией синтеза БТШ и гибелью культуры клеток *A. thaliana*. Ранее было показано, что максимальная индукция синтеза БТШ в клетках *A. thaliana* наблюдалась после 120 мин теплового воздействия (Rikhvanov et al., 2007). Жизнеспособность *S. cerevisiae* определяли по способности клеток образовывать колонии (КОЕ), а для измерения жизнеспособности в культуре клеток *A. thaliana* использовали метод восстановления ТТХ. Обработка АМД сопровождалась гибелью клеток штамма W303-1A *S. cerevisiae*, которая возрастала с повышением концентрации агента. В концентрации 100 мкМ число жизнеспособных клеток снижалось на 90 % (рис. 1 а). Токсичный эффект АМД на культуру клеток *A. thaliana* был гораздо менее выражен. При обработке 100 мкМ АМД наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток *A. thaliana* на 40 % (рис. 1 б). Очевидно, что клетки растений гораздо более устойчивы к воздействию АМД, чем дрожжи.



**Рис. 1.** Влияние АМД на выживаемость клеток дрожжей *S. cerevisiae* и культуры клеток *A. thaliana*.

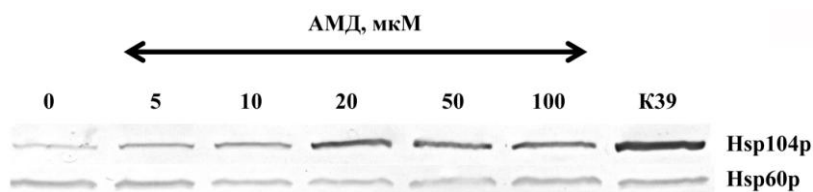
*а* - Клетки штамма W303-1А выращивали на среде с глюкозой и инкубировали при 30 °С 60 мин в присутствии АМД (0–100 мкМ). Затем клетки отмывали от агента и высевали на твердую питательную среду YEPD. Количество образовавшихся колоний учитывали, спустя 48 часов инкубации при 30 °С.  $n=3$ ;  $M\pm S.E.$

*б* - Культуру клеток *A. thaliana* выращивали на MS-среде, инкубировали при 26 или 37 °С 120 мин в присутствии АМД (0–100 мкМ). Затем клетки отмывали от агента, ресуспендировали в свежей среде и инкубировали при 26 °С в течение 120 мин. Количество живых клеток определяли, спустя 48 ч инкубации при 26 °С после обработки АМД по восстановлению ТТХ.  $n=3$ ;  $M\pm S.E.$

### **Влияние АМД на содержание БТШ в клетках дрожжей *S. cerevisiae***

Поскольку АМД активирует экспрессию ряда стрессовых генов у дрожжей (Zhang, Rao, 2007), то для того чтобы установить связь между гибелью клеток и содержанием БТШ, дрожжи обрабатывали АМД, как это описано выше, и определяли содержание Hsp104p и Hsp60p.

Обработка АМД клеток дрожжей штамма W303-1А приводила к увеличению содержания Hsp104p, которое возрастало с повышением концентрации агента (рис. 2). Содержание Hsp60p при обработке АМД не изменялось, что позволяет использовать этот критерий в качестве показателя равномерной нагрузки белка на трек. Отчетливое повышение количества Hsp104p наблюдалось при концентрациях АМД 20, 50 и 100 мкМ. В то же время после теплового стресса при 39 °С количество Hsp104p было гораздо больше, чем при обработке АМД в любой из использованных концентраций (рис. 2).



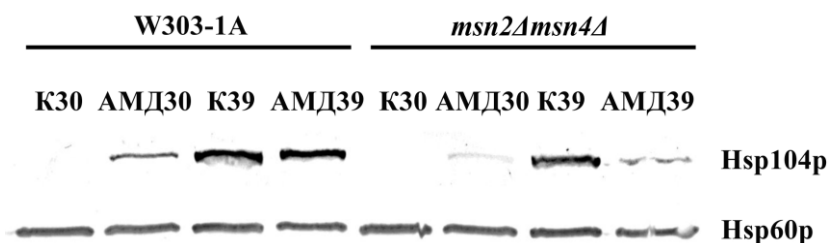
**Рис. 2.** Влияние АМД на содержание Hsp104p и Hsp60p в клетках дрожжей штамма W303-1А.

Клетки дрожжей штамма W303-1А выращивали на среде с глюкозой, инкубировали 60 мин при 30 °С в присутствии 0–100 мкМ АМД. Для сравнения справа приведено содержание Hsp104p и Hsp60p после инкубации при 39 °С в течение 60 мин (K39). Представлены данные типичного эксперимента ( $n=3$ ).

Аналогичное повышение содержания Hsp104p при обработке АДД также наблюдалось при использовании штамма  $\Psi$ -74-D694 (рис. 7 а). Следовательно, несмотря на то, что АДД оказывал ярко выраженное летальное действие на клетки дрожжей (рис. 1 а), он в тех же условиях повышал содержание Hsp104p (рис. 2).

### **Роль транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p в повышении количества Hsp104p, индуцированного обработкой АДД**

Известно, что экспрессия *HSP104* при тепловом стрессе регулируется двумя независимыми друг от друга системами, которые включают в себя Hsf и транскрипционные факторы Msn2p/Msn4p (Рихванов, Войников, 2005; Yamamoto et al., 2008). Чтобы узнать через какую из этих систем АДД индуцирует синтез Hsp104p, использовали клетки дрожжей родительского типа штамма W303-1A и изогенного ему мутанта, у которого отсутствуют гены *MSN2* и *MSN4* (*msn2 $\Delta$ msn4 $\Delta$* ). Количество Hsp104p резко возрастало при 39 °С как в клетках дрожжей родительского типа, так и в клетках двойного мутанта *msn2 $\Delta$ msn4 $\Delta$*  (рис. 3), что свидетельствует о том, что в отсутствие транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p повышение количества Hsp104p при тепловом стрессе определяется функционированием Hsf (Boy-Marcotte et al., 1999; Grably et al., 2002). Обработка АДД при обычной температуре инкубации увеличивала содержание Hsp104p в клетках родительского типа. Способность АДД индуцировать синтез Hsp104p снижалась в клетках мутанта *msn2 $\Delta$ msn4 $\Delta$*  (рис. 3). Этот результат указывает на то, что АДД активирует экспрессию *HSP104* в результате активации транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p. АДД оказывал различный эффект на синтез Hsp104p при тепловом стрессе. Присутствие АДД при мягком тепловом стрессе не влияло на тепловую индукцию синтеза Hsp104p в клетках родительского типа, но подавляло повышение содержания этого белка в клетках двойного мутанта (рис. 3).



**Рис. 3.** Влияние мягкого теплового стресса и АДД на содержание Hsp104p и Hsp60p в клетках дрожжей штамма W303-1A родительского типа и изогенного ему мутанта по гену *MSN2/MSN4* (*msn2 $\Delta$ msn4 $\Delta$* ).

Клетки дрожжей штамма W303-1A выращивали на среде с глюкозой, инкубировали 30 мин при 30 °С в присутствии 0–100 мкМ АДД. Для сравнения справа приведено содержание Hsp104p и Hsp60p при 39 °С в течение 30 мин (K39). Представлены данные типичного эксперимента ( $n=3$ ).

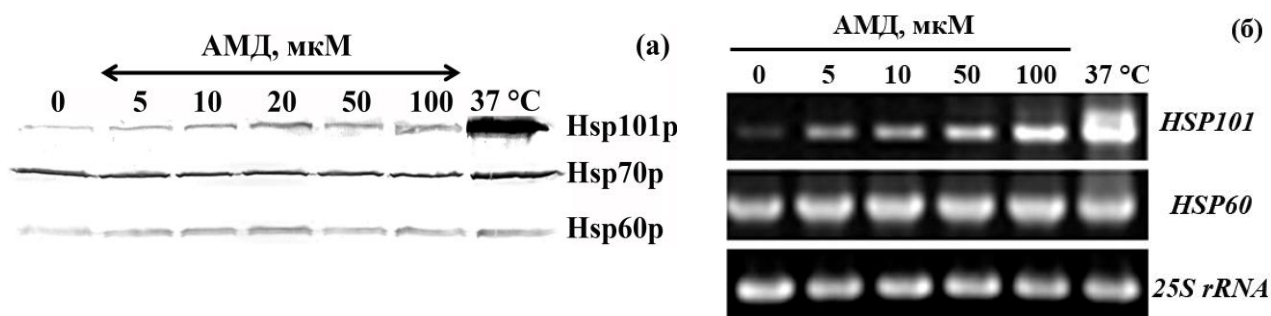
### **Влияние АДД на содержание и активацию экспрессии БТШ в культуре клеток *A. thaliana***

Поскольку обработка АДД в течение 120 мин вызывала гибель культуры клеток *A. thaliana* (рис. 1 б), для выявления зависимости между снижением жизнеспособности клеток и синтезом БТШ использовали ту же продолжительность обработки. Результаты, полученные с помощью вестерн-блоттинга, показали, что при обычной температуре инкубации содержание Hsp101p было незначительным, но резко возрастало при



обработке мягким тепловым стрессом (37 °С, 120 мин). Значительных изменений количества Hsp60p и Hsp70p не наблюдалось. Обработка АД в течение 120 мин при 26 °С приводила к повышению содержания Hsp101p. Чем выше была концентрация агента, тем выше было количество белка (рис. 4 а). В то же время содержание Hsp101p при 37 °С было значительно выше, чем при обработке АД. Таким образом, обработка АД, как и в случае дрожжей, повышает содержание Hsp101p в клетках *A. thaliana*.

Для того чтобы установить как АД влияет на транскрипцию генов БТШ, изучали экспрессию генов *HSP101* (at1g74310) и *HSP60* (at3g23990, at2g33210), используя метод полуколичественного ОТ-ПЦР анализа. В качестве контроля использовали ген *25S rRNA*, экспрессия которого значительно не меняется в культуре клеток *A. thaliana* во время стрессовых воздействий. Транскрипционные профили генов *HSP101* и *HSP60* в клетках, инкубированных при 26 °С в отсутствие или в присутствии АД (рис. 4 б), в основном были схожи с данными, полученными с помощью вестерн-блоттинга (рис. 4 а). Обработка АД концентрационно-зависимым образом повышала содержание транскриптов *HSP101* и не оказывала влияния на содержание транскриптов *HSP60*.



**Рис. 4.** Влияние АД на содержание (а) и активацию экспрессии БТШ (б) в культуре клеток *A. thaliana*.

Клетки *A. thaliana* инкубировали 120 мин при 26 °С в присутствии 0–100 мкМ АД. Для сравнения справа приведено содержание белков или транскриптов после обработки при 37 °С, 120 мин. Представлены данные типичного эксперимента ( $n=3$ ).

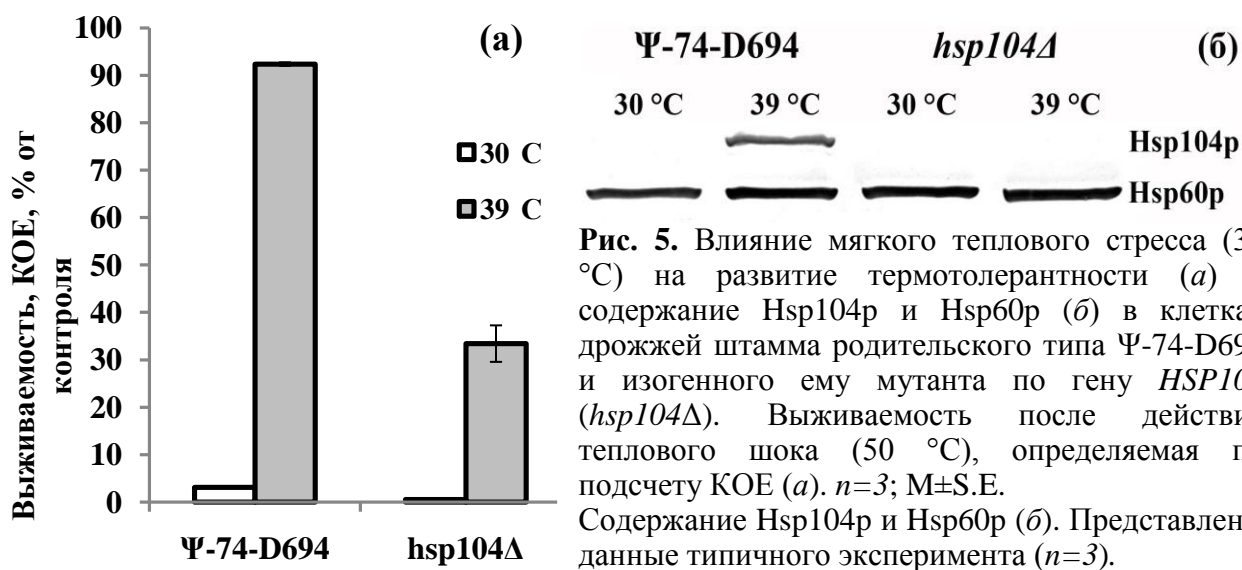
#### **Влияние АД на развитие термотолерантности в клетках дрожжей *S. cerevisiae***

Обработка АД индуцирует синтез Hsp104p (рис. 2). В связи с этим изучали влияние этого агента на способность клеток дрожжей выдерживать повреждающее действие жесткого теплового шока в зависимости от присутствия Hsp104p. Для решения этой задачи использовали штамм Ψ-74-D694 *S. cerevisiae* и изогенный ему мутант по гену *HSP104* (*hsp104Δ*).

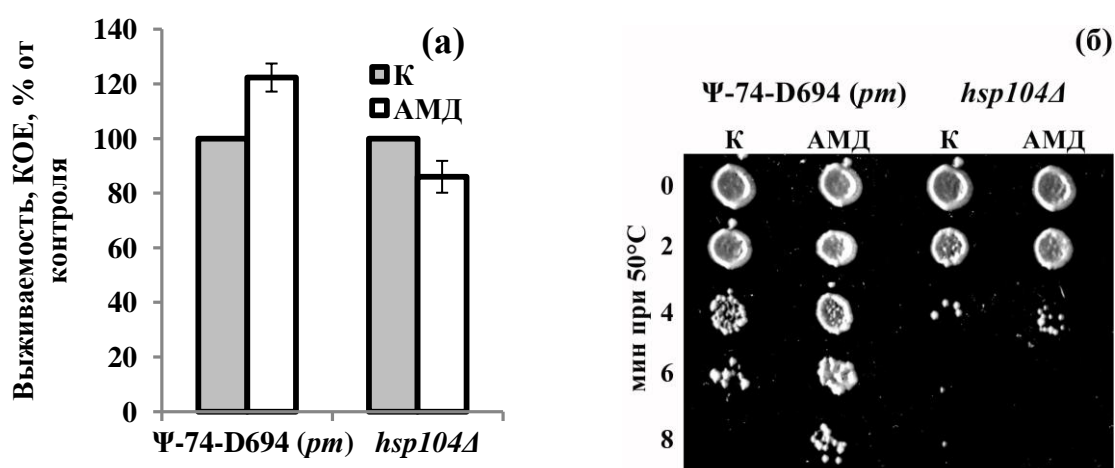
Клетки дрожжей, выращенные при обычной температуре инкубации (30 °С) и подвергнутые жесткому тепловому шоку при 50 °С (10 мин), погибали (рис. 5 а). Однако, если дрожжи предварительно обработать мягким тепловым воздействием (39 °С, 30 мин), то в клетках развивалась индуцированная термотолерантность, их выживаемость повышалась в несколько раз (рис. 5 а). Sanchez и Lindquist (1990) показали, что в развитии индуцированной термотолерантности дрожжей ключевую роль играет белок Hsp104p.

В соответствии с этими данными, у клеток дрожжей родительского типа после обработки мягким тепловым воздействием (39 °С, 30 мин) наблюдалось резкое

повышение содержания Hsp104p (рис. 5 б) и развивалась устойчивость к тепловому шоку (50 °С, 10 мин) (рис. 5 а). В то же время у изогенного данному штамму мутанта по гену *HSP104* (*hsp104Δ*), у которого увеличения содержания Hsp104p после обработки при 39 °С не происходило (рис. 5 б), развитие индуцированной термотолерантности резко снижалось (рис. 5 а).



Для того чтобы изучить влияние АД на термотолерантность, подобрали такие условия, в которых АД не оказывал бы самостоятельного токсичного действия на клетки дрожжей. Обработка дрожжей 20 мкМ АД (30 мин) не оказывала значительного негативного влияния (рис. 6 а). Для определения влияния АД на термотолерантность клетки дрожжей штамма Ψ-74-D694 и мутанта *hsp104Δ* инкубировали в присутствии 20 мкМ АД (30 °С, 30 мин) и подвергали действию жесткого теплового шока при 50 °С (10 мин). Предварительная обработка АД приводила к значительному повышению термотолерантности штамма родительского типа (рис. 6 б). Однако у клеток мутанта *hsp104Δ* эта способность была снижена (рис. 6 б).



**Рис. 6.** Влияние АД на содержание Hsp104p и термотолерантность клеток дрожжей *S. cerevisiae*.

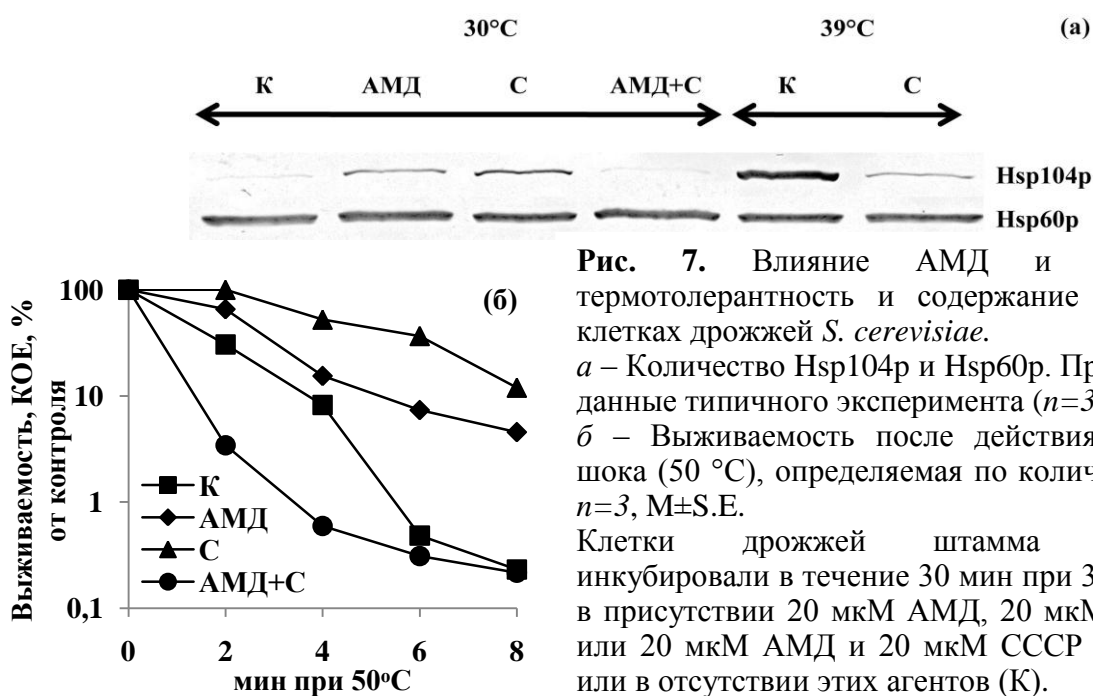
Клетки дрожжей штамма Ψ-74-D694 (родительский тип) и мутанта *hsp104Δ* инкубировали при 30 °С 30 мин в присутствии 20 мкМ АД. Определение жизнеспособности после обработки АД (а) или после действия теплового шока (б). Выживаемость клеток определяли через 48 часов по подсчету КОЕ (а),  $n=3$ ;  $M \pm S.E.$  и с помощью репликатора (б). Представлены данные типичного эксперимента ( $n=3$ ).

Таким образом, обработка АДД, так же как и мягкий тепловой стресс, защищает клетки дрожжей от гибели при жестком тепловом шоке и этот эффект зависит от присутствия гена *HSP104*.

### Сравнение влияния АДД и СССР на индукцию синтеза БТШ и развитие термотолерантности клеток дрожжей *S. cerevisiae*

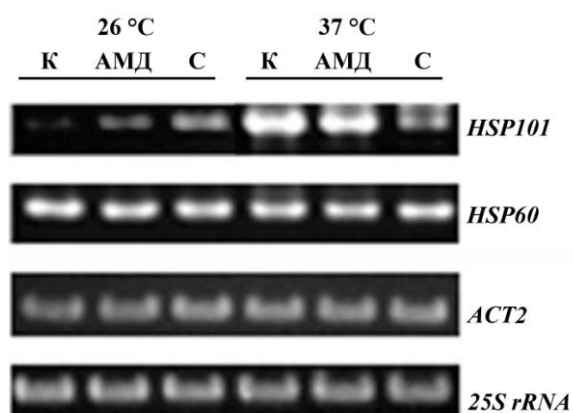
Известно, что АДД вызывает повышение уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_{цит}$ ) *S. cerevisiae* (Courchesne, Ozturk, 2003; Gupta et al., 2003). Поскольку обработка экзогенным кальцием индуцировала синтез Hsp104p и развитие термотолерантности (Федосеева и др., 2010), можно предположить, что именно повышение уровня  $[Ca^{2+}]_{цит}$  обуславливает способность АДД увеличивать количество БТШ, что, в свою очередь, приводит к развитию термотолерантности клеток дрожжей. Протонофор СССР также вызывает повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в клетках *S. cerevisiae* (Eilam et al., 1990), поэтому на следующем этапе сравнивали влияние АДД и СССР на развитие термотолерантности дрожжевых клеток.

Клетки дрожжей штамма  $\Psi$ -74-D694 инкубировали в присутствии АДД (20 мкМ) или СССР (20 мкМ), а также обоих этих агентов одновременно при 30 или 39 °С (30 мин). Обработка как СССР, так и АДД на среде с глюкозой при 30 °С вызывала значительное повышение количества Hsp104p. Совместное присутствие СССР и АДД не приводило к такому эффекту. Несмотря на то, что СССР увеличивал содержание Hsp104p при обычной температуре инкубации, добавление СССР во время теплового стресса 39 °С ингибировало повышение содержания этого белка (рис. 7 а). Повышение содержания Hsp104p при обработке АДД и СССР сопровождалось повышением термотолерантности клеток дрожжей к действию теплового шока. Обработка СССР и АДД по отдельности значительно повышала выживаемость клеток дрожжей, а совместная обработка этими агентами подавляла термотолерантность ниже контрольного уровня (рис. 7 б). Следовательно, СССР, как и АДД, обладает способностью увеличивать содержание Hsp104p и повышать термотолерантность.



### **Сравнение влияния АМД и СССР на активацию экспрессии генов БТШ в культуре клеток *A. thaliana***

Клетки культуры *A. thaliana* инкубировали при 26 или 37 °С (120 мин) в присутствии или отсутствии СССР (4 мкМ) или АМД (50 мкМ) и выделяли тотальную РНК. В качестве контроля использовали гены домашнего хозяйства *ACT2* и *25S rRNA*. Как и ожидалось, экспрессия *HSP101* повышалась при обработке культуры клеток мягким тепловым стрессом (37 °С) (рис. 8). Активации экспрессии *HSP60* не наблюдалось. Обработка 50 мкМ АМД активировала экспрессию *HSP101* при обычной температуре инкубации (26 °С, 120 мин). Если агент добавляли при 37 °С (120 мин), то он не оказывал значительного влияния на экспрессию *HSP101*. Обработка СССР (4 мкМ) также активировала экспрессию *HSP101* при 26 °С. Однако в отличие от АМД обработка СССР при тепловом стрессе 37 °С ингибировала тепловую активацию экспрессии *HSP101* (рис. 8). Полученные результаты указывают на то, что АМД и СССР активируют экспрессию БТШ в результате функционирования различных механизмов.

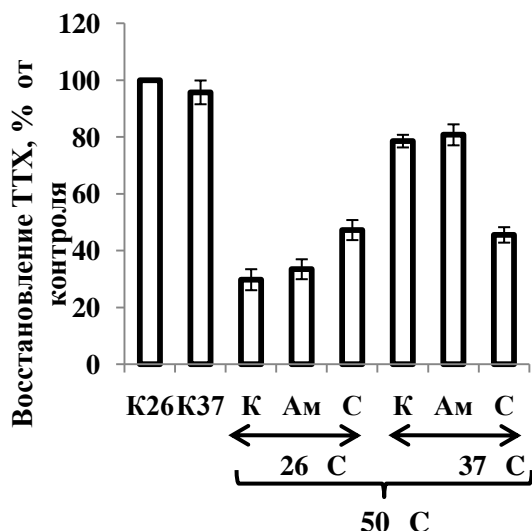


**Рис. 8.** Влияние АМД и СССР на активацию экспрессии БТШ в культуре клеток *A. thaliana*. Клетки *A. thaliana* инкубировали в течение 120 мин при 26 °С или 37 °С в присутствии 50 мкМ АМД (АМД), 4 мкМ СССР (С) или в отсутствии этих агентов (К). Представлены данные типичного эксперимента ( $n=3$ ).

### **Сравнение влияния АМД и СССР на развитие термотолерантности в культуре клеток *A. thaliana***

Как было установлено ранее, активацию экспрессии *HSP101* в клетках *A. thaliana* вызывали как АМД, так и СССР (рис. 8). В связи с этим следовало выяснить, влияет ли обработка этими агентами на устойчивость клеток растений к тепловому шоку. Клетки суспензионной культуры *A. thaliana* обрабатывали АМД (50 мкМ) или СССР (4 мкМ) при 26 °С в течение 120 мин. Затем клетки несколько раз промывали МС-средой для удаления исследуемых веществ, ресуспендировали в свежей среде и инкубировали при 26 °С в течение 120 мин. После этого клетки подвергали действию повреждающего теплового шока (50 °С, 10 мин). Выживаемость клеток суспензионной культуры определяли после 48 ч инкубации при 26 °С по восстановлению ТТХ. Известно, что повышение экспрессии *HSP101* при тепловом стрессе (рис. 8) играет ключевую роль в развитии термотолерантности растений (Queitsch et al., 2000; Hong, Vierling, 2000; Rikhvanov et al., 2007). Действительно, жизнеспособность клеток растений (К26), непосредственно подвергнутых тепловому шоку при 50 °С (10 мин), значительно снижалась. Однако предварительная обработка мягким тепловым воздействием при 37 °С (К37), приводила к активации экспрессии *HSP101* (рис. 8) и развитию индуцированной термотолерантности (Rikhvanov et al., 2007; Richter et al., 2010) (рис. 9). Инкубация клеток в присутствии АМД как при 26 °С, так и при 37 °С не сопровождалась какими-либо изменениями в устойчивости клеток к тепловому шоку.

Присутствие СССР при 26 °С несколько увеличивало устойчивость клеток *A. thaliana*, однако при 37 °С СССР ингибировал развитие индуцированной термотолерантности. Способность СССР влиять на экспрессию генов БТШ в клетках растений при обычной температуре инкубации и при тепловом стрессе согласуется с результатами, полученными на клетках дрожжей (рис. 7). Несмотря на то, что при обработке АД ингибировалась активация экспрессии *HSP101* (рис. 8) в клетках *A. thaliana*, развития термотолерантности при этом не происходило (рис. 9).

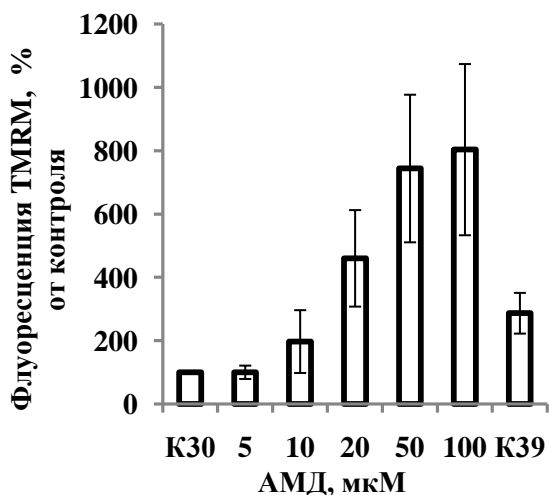


**Рис. 9.** Влияние АД и СССР на термотолерантность клеток *A. thaliana*. К – контроль; С – СССР; Ам – АД. Стрелками внизу обозначены образцы, инкубированные при 26 или 37 °С в присутствии СССР или АД или в отсутствии этих агентов (К), а затем подвергнутые тепловому шоку при 50 °С. Первые два столбца соответствуют контрольным образцам, которые не инкубировали при 50 °С. Выживаемость клеток определяли спустя 48 ч инкубации при 26 °С по восстановлению ТТХ.  $n=3$ ;  $M\pm S.E.$

#### *Изучение влияния АД на потенциал внутренней митохондриальной мембраны в клетках S. cerevisiae и A. thaliana*

На культурах клеток млекопитающих (Balogh et al., 2005), растений (Rikhvanov et al., 2007) и дрожжей (Rikhvanov et al., 2005) показано, что мягкий тепловой стресс повышает потенциал внутренней митохондриальной мембраны ( $m\Delta\psi$ ). Pozniakovskiy с соавторами (2005), используя потенциал-зависимый зонд Mitotracker orange показали, что обработка АД вызывает повышение  $m\Delta\psi$  в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Аналогичные результаты были получены с помощью флуоресцентного зонда JC-1 (Knorre et al., 2008).

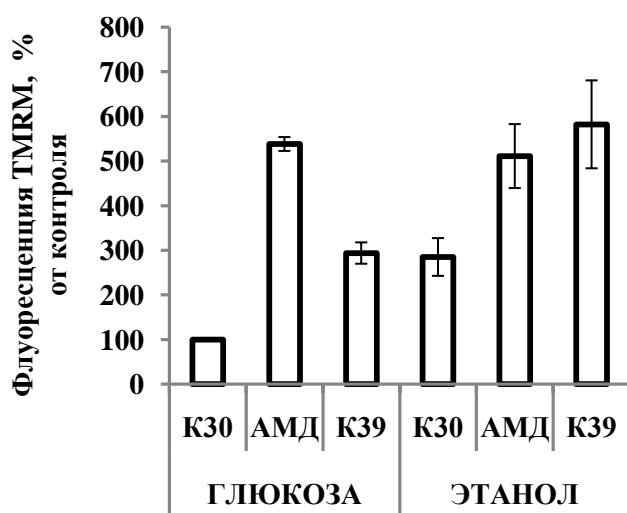
TMRM является потенциал-зависимым красителем, который накапливается в митохондриях пропорционально значению  $m\Delta\psi$  и флуоресцирует в красном свете (Scaduto, Grotyohann, 1999). В соответствии с ранее полученными результатами



**Рис. 10.** Влияние различных концентраций АД на флуоресценцию TMRM в клетках дрожжей *S. cerevisiae* штамма W303-1A. Обсчет интенсивности флуоресценции TMRM после инкубации дрожжей в течение 10 мин при 30 или 39 °С на среде YEPD в присутствии 5–100 мкМ АД.  $n=3$ ;  $M\pm S.E.$

(Rikhvanov et al., 2005) при обычной температуре инкубации (30 °С) флуоресценция TMRM была незначительной и возрастала при мягком тепловом стрессе (39 °С) (рис. 10). Подтверждая данные, полученные Pozniakovsky с соавторами (2005), обработка АД (10 мин) при 30 °С приводила к повышению флуоресценции TMRM в клетках штамма W303-1A, которая возрастала с повышением концентрации агента (рис. 10).

Дрожжи являются факультативными анаэробами и при росте на глюкозе ~75 % энергетических потребностей удовлетворяют за счет брожения (Merico et al., 2007). Соответственно, в этих условиях снижается интенсивность дыхания (Rikhvanov et al., 2005), хотя и не подавляется при этом полностью. Поэтому флуоресценция TMRM у дрожжей на среде с глюкозой (K30) была гораздо ниже, чем на среде с этанолом (рис. 11). Повышение флуоресценции TMRM в клетках дрожжей, использующих этанол в качестве источника энергии, свидетельствует о том, что изменение флуоресценции этого



**Рис. 11.** Влияние АД на флуоресценцию TMRM в клетках дрожжей штамма W303-1A в зависимости от источника получаемой энергии.

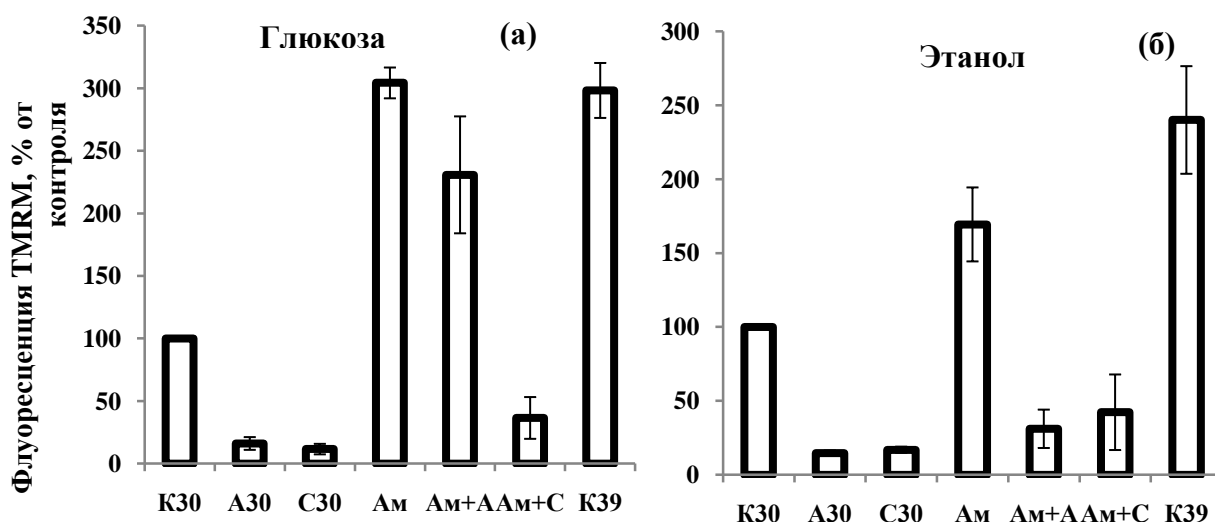
Статистический обсчет интенсивности флуоресценции TMRM после инкубации клеток дрожжей в присутствии 20 мкМ АД или в отсутствии этого агента при 30 (K30) или 39 °С (K39) на среде YEPD (глюкоза) или YEPE (этанол).  $n=3$ ;  $M \pm S.E.$

зонда корректно отражает изменение  $m\Delta\psi$ .

АД и тепловой стресс вызывали повышение флуоресценции TMRM независимо от типа энергетического метаболизма. АД в концентрации 20 мкМ вызывал примерно такое же увеличение, что и мягкий тепловой стресс при 39 °С (рис. 12 а и б).

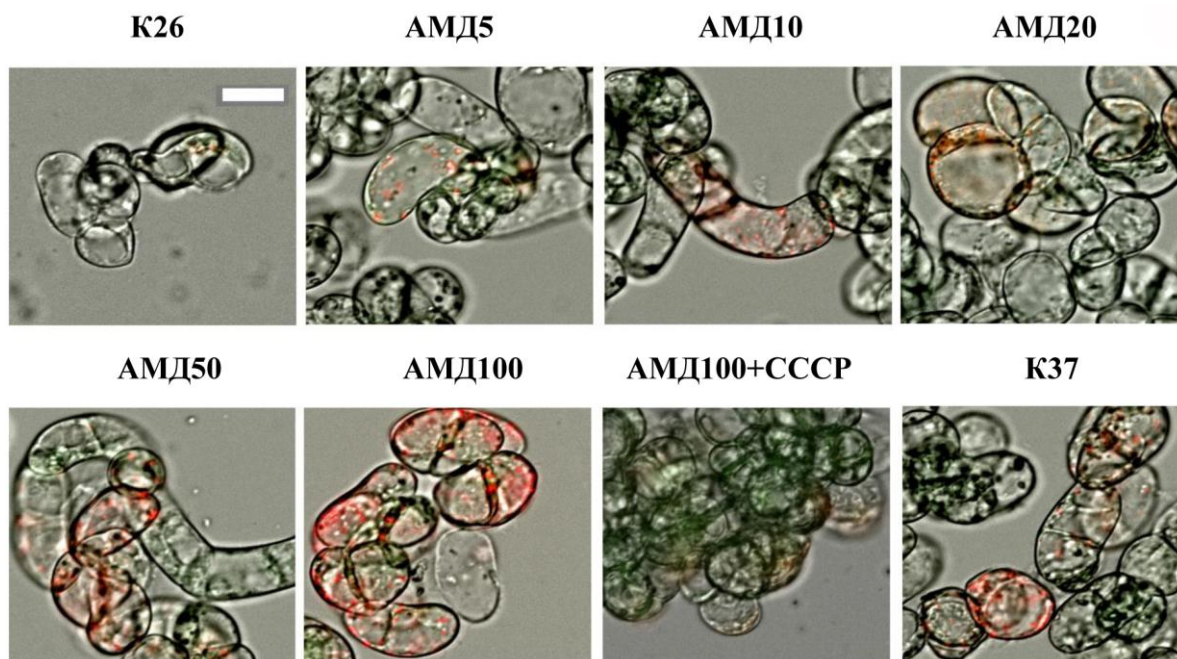
Протонофор CCCP эффективно подавлял повышение флуоресценции TMRM, индуцированное обработкой АД (Ам+С), независимо от типа энергетического метаболизма (рис. 12 а и б). В то же время ингибитор III комплекса дыхательной цепи антимицин А незначительно ингибировал повышение флуоресценции TMRM на среде с глюкозой (рис. 12 а), но так же эффективно, как и CCCP, ингибировал этот процесс на среде с этанолом (рис. 12 б).

В условиях бродильного метаболизма поддержание  $m\Delta\psi$  у дрожжей может обеспечиваться за счет электрогенного транспорта  $ATP^{4-}$  в обмен на  $ADP^{3-}$  через внутреннюю митохондриальную мембрану посредством транслокатора адениновых нуклеотидов (Traba et al., 2009; Физикова, 2011). Соответственно, антимицин А в этих условиях не будет влиять на  $m\Delta\psi$ . Таким образом, можно предполагать, что механизмы повышения  $m\Delta\psi$  при обработке АД различаются в зависимости от типа энергетического метаболизма. Аналогичный результат был получен ранее при изучении влияния теплового стресса на изменение  $m\Delta\psi$  (Rikhvanov et al., 2005).



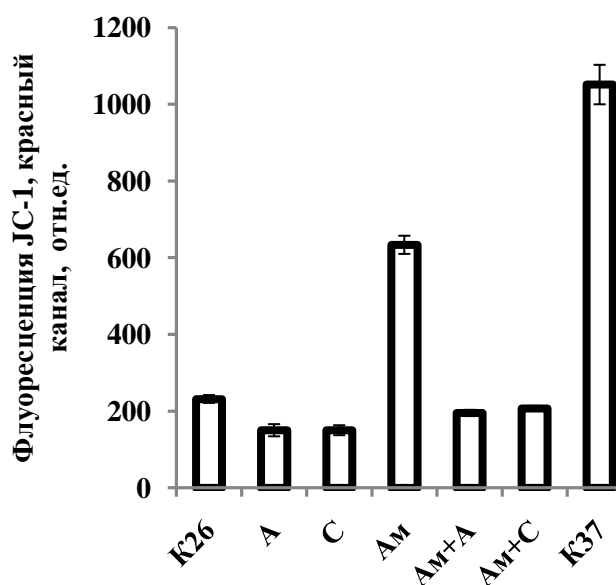
**Рис. 12.** Влияние АДД, антимицина А и СССР на флуоресценцию TMRM в клетках дрожжей штамма W303-1А в зависимости от источника получаемой энергии. Обсчет интенсивности флуоресценции TMRM после инкубации клеток дрожжей штамма W303-1А в течение 10 мин при 30 или 39 °С в присутствии 20 мкМ АДД (Ам), 10 мкМ антимицина А (А30), 20 мкМ СССР (С30), 20 мкМ АДД и 10 мкМ антимицина А (Ам + А) или 20 мкМ АДД и 20 мкМ СССР (Ам + С) или в отсутствии этих агентов (К30, К39).  $n=3$ ;  $M\pm S.E.$

Обработка АДД клеток дрожжей повышала мт $\Delta\psi$  (рис. 10). Поэтому на следующем этапе изучали эффект АДД на мт $\Delta\psi$  культуры клеток *A. thaliana*. Для этого использовали флуоресцентный краситель JC-1, который при низких значениях митохондриального потенциала флуоресцирует в зеленом свете (зеленый канал), а при высоких значениях образует агрегаты, флуоресцирующие в красном свете (красный канал) (Salvioli et al., 1997). Обсчет интенсивности флуоресценции проводили в красном канале.



**Рис. 13.** Влияние различных концентраций АДД и СССР на флуоресценцию JC-1 (красный канал) в культуре клеток *A. thaliana*. Клетки *A. thaliana* инкубировали в течение 10 мин при 26 °С или 37 °С в присутствии АДД (0–100) или в его отсутствии (К). Бар равен 20 мкМ. Представлены данные типичного эксперимента ( $n=3$ ).

В соответствии с ранее полученными результатами (Rikhvanov et al., 2007), флуоресценция красителя в красном канале была незначительной при 26 °С и возрастала при мягком тепловом стрессе (37 °С) (рис. 13). Обработка АД (10 мин) при 26 °С также сопровождалась повышением флуоресценции JC-1, которая возрастала с увеличением концентрации агента (рис. 13). Изменение спектра флуоресценции JC-1 с зелёного на красный указывает на повышение мтΔψ. Для того чтобы это доказать, использовали митохондриальный ингибитор антимицин А и протонифор СССР. Добавление как СССР, так и антимицина А значительно подавляло повышение флуоресценции JC-1 в красном канале при обработке АД (рис. 14). Действие этих агентов на флуоресценцию JC-1 доказывает, что АД вызывает гиперполяризацию внутренней митохондриальной мембраны в культуре клеток *A. thaliana*.



**Рис. 14.** Влияние АД, антимицина А и СССР на флуоресценцию JC-1 (красный канал) в культуре клеток *A. thaliana*.

Клетки *A. thaliana* инкубировали при 26 °С в течение 10 мин в присутствии 20 мкМ АД (Ам), 2 мкМ антимицина А (А), 4 мкМ СССР (С), 20 мкМ АД и 2 мкМ антимицина А (Ам+А), 20 мкМ АД и 4 мкМ СССР (Ам+С) или в отсутствии этих агентов (К26).  $n=3$ ;  $M \pm S.E.$

#### **Влияние АД и СССР на уровень цитозольного $Ca^{2+}$ в клетках *A. thaliana***

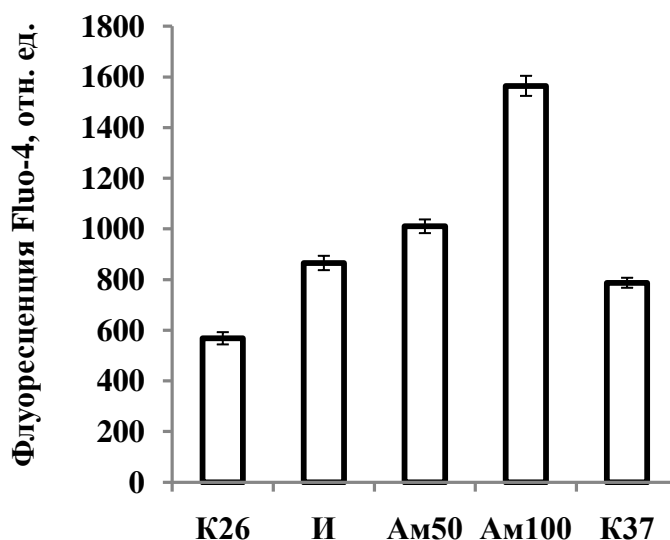
Обработка АД клеток дрожжей приводит к повышению уровня цитозольного  $Ca^{2+}$  (Courchesne, Ozturk, 2003; Gupta et al., 2003; Muend, Rao, 2008; Yadav et al., 2007, Реѝа et al., 2009; Pozniakovsky et al., 2005). Поскольку неизвестно, как АД влияет на содержание внутриклеточного кальция у растений, на следующем этапе изучали влияние этого агента на изменение уровня  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в клетках *A. thaliana*, используя флуоресцентный краситель Fluo-4АМ. Fluo-4АМ превращается в клетке во Fluo-4 в результате отщепления ацетоксиметилового эфира (АМ – acetoxymethyl ester). Флуоресценция Fluo-4 при связывании с ионами  $Ca^{2+}$  возрастает (Paredes et al., 2008). Для измерения уровня  $[Ca^{2+}]_{цит}$  культуру клеток *A. thaliana* инкубировали при 26 °С в присутствии 15 мкМ Fluo-4АМ (120 мин). Затем клетки обрабатывали 100 мкМ иономицином, 50–100 мкМ АД при 26 °С (10 мин) и регистрировали изменение флуоресценции. В качестве дополнительного контроля использовали тепловой стресс 37 °С.

Иономицин – кальциевый ионофор, который приводит к искусственному повышению  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в растениях (Saidi et al., 2009). Как и ожидалось, обработка иономицином вызывала повышение флуоресценции Fluo-4 (рис. 15). Интенсивность флуоресценции при обработке иономицином была в 1,5 раза выше, чем в контроле. Этот



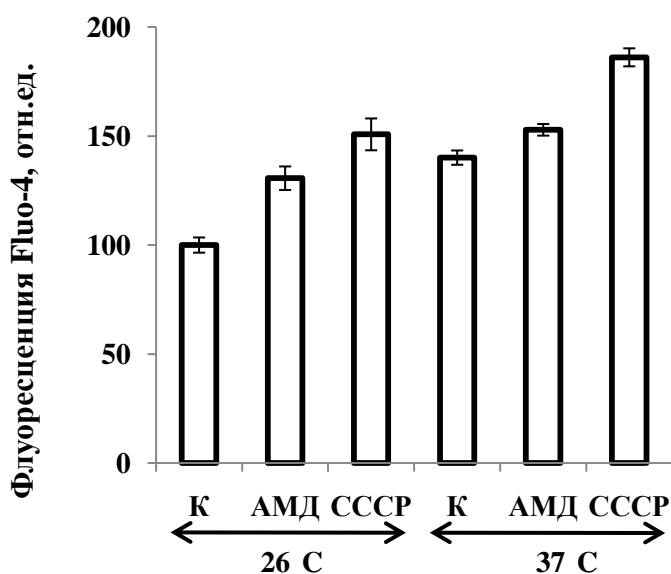
результат указывает, что изменение флуоресценции Fluo-4 отражает изменения в уровне цитозольного кальция клеток *A. thaliana*.

В соответствии с литературными данными (Бияшева и др., 1993; Gong et al., 1998; Saidi et al., 2011), мягкий тепловой стресс 37 °С сопровождался повышением уровня цитозольного  $Ca^{2+}$  в клетках *A. thaliana* (рис. 15). Обработка клеток арабидопсиса 50 мкМ АД приводит к повышению  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в 1,8 раза по отношению к контролю, в то время как обработка 100 мкМ АД приводит к повышению  $Ca^{2+}$  в цитозоле в 2,8 раза. Таким образом, АД обладает способностью повышать уровень цитозольного кальция не только в клетках дрожжей (Gupta et al., 2003; Pozniakovsky et al., 2005; Muend, Rao, 2008; Peña et al., 2009), но и в клетках *A. thaliana*.



**Рис. 15.** Влияние АД на уровень цитозольного  $Ca^{2+}$  в клетках *A. thaliana*. Культуру клеток *A. thaliana* инкубировали при 26 или 37 °С в присутствии 100 мкМ иономицина (И), 50 мкМ АД (Ам50) или 100 мкМ АД (Ам100) или в отсутствии этих агентов.  $n=3$ ;  $M \pm S.E.$

Представленные выше результаты указывают на положительную зависимость между  $[Ca^{2+}]_{цит}$  (рис. 15) и  $m\Delta\psi$  (рис. 13) при обработке АД культуры клеток *A. thaliana*. С другой стороны известно, что протонофор CCCP, деполаризующий митохондриальную мембрану, также вызывает повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в культуре клеток кукурузы (Subbaiah et al., 1998). Поэтому в следующем эксперименте сравнили эффект АД и CCCP на уровень  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в культуре клеток *A. thaliana*. Как и ожидалось, АД



**Рис. 16.** Влияние АД и CCCP на уровень цитозольного  $Ca^{2+}$  в клетках *A. thaliana*. Культуру клеток *A. thaliana* инкубировали при 26 или 37 °С в присутствии 50 мкМ АД (АД) или 4 мкМ CCCP (СССР) или в отсутствии этих агентов (К).  $n=3$ ;  $M \pm S.E.$

и СССР при обычной температуре инкубации (26 °С), а также тепловой стресс (37 °С) вызывали повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  (рис. 16). В то же время комбинированное действие теплового стресса и СССР имело аддитивный эффект. Уровень  $[Ca^{2+}]_{цит}$ , наблюдаемый при действии теплового стресса в присутствии СССР, превышал эффект каждого из этих факторов в отдельности. Напротив, обработка АМД при 37 °С вызывала примерно такое же повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$ , что тепловой стресс в отсутствии этого агента (рис. 16).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные в настоящей работе, подтвердили литературные данные (Courchesne, 2002; Zhang, Rao, 2007; Serrano-Martín et al., 2009) о токсичности амиодарона (АМД) по отношению к клеткам дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 1 а). Механизм летального действия АМД на клетки *S. cerevisiae*, вероятно, заключается в его способности вызывать кратковременное повышение кальция в цитозоле (Gupta et al., 2003), снижать внутриклеточный pH (Maresova et al., 2009; Peña et al., 2009), усиливать генерацию АФК (Pozniakovsky et al., 2005). Так же как и в случае клеток дрожжей, АМД вызывал в культуре клеток *A. thaliana* повышение потенциала на внутренней митохондриальной мембране (mtΔψ) (рис. 13), что является одной из причин усиления генерации АФК (Korshunov et al., 1997; Pozniakovsky et al., 2005), а также повышение уровня кальция в цитозоле (рис. 15 и 16). В то же время результаты показали, что клетки *A. thaliana* оказались гораздо более устойчивы к летальному действию АМД (рис. 1 б). Обработка АМД в течение 60 мин в концентрации 100 мкМ снижала жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* на 90 % (рис. 1 а). Однако АМД в той же концентрации за 120 мин обработки снижал жизнеспособность клеток *A. thaliana* на 40 % (рис. 1 б). Таким образом, АМД относительно безвреден для растительной клетки и, в то же время, обладает значительным фунгицидным эффектом. Поскольку поражение растений патогенными грибами приводит к значительным потерям сельского хозяйства, то АМД или агенты со сходным механизмом действия потенциально могут быть использованы для обеззараживания сельскохозяйственных растений от вредителей.

Обработка АМД активировала экспрессию Hsp104p в клетках *S. cerevisiae* (рис. 2) и Hsp101p в клетках *A. thaliana* (рис. 4), несмотря на то, что при этих же условиях наблюдалось снижение жизнеспособности как дрожжей (рис. 1 а), так и растений (рис. 1 б). Такой эффект АМД отличается от описанного ранее действия теплового шока на экспрессию БТШ в клетках *A. thaliana* (Rikhvanov et al., 2007) и *S. cerevisiae* (Rikhvanov et al., 2005). Активация экспрессии БТШ наблюдалась только при тепловом воздействии, которое не оказывало негативного эффекта на жизнеспособность (Rikhvanov et al., 2005, 2007). Вероятно, что АМД нарушает механизм, регулирующий зависимость между экспрессией БТШ и активацией гибели в клетках растений и дрожжей. Тем не менее, обработка клеток дрожжей АМД в тех концентрациях, которые не оказывали негативного влияния на жизнеспособность, способствовала повышению их термотолерантности к повреждающему тепловому шоку (рис. 6 б), этот эффект зависел от присутствия Hsp104p (рис. 5 б).

Кальций играет разнообразную роль в жизнедеятельности клетки. В одних условиях он вызывает гибель клетки, в других, активирует экспрессию стрессовых генов, защищающих ее от гибели. Тепловой стресс вызывает кратковременное

повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в клетках *A. thaliana* (рис. 15 и 16), что является одной из причин активации экспрессии БТШ у растений (Saidi et al., 2011). Зависимость между  $[Ca^{2+}]_{цит}$  и экспрессией БТШ подтверждается в данной работе. АМД и СССР вызывают повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в клетках *S. cerevisiae* (Gupta et al., 2003; Eilam et al., 1990) и в данной работе показано, что эти агенты индуцируют синтез Hsp104p у дрожжей (рис. 7 а). Аналогичным образом АМД и СССР при обычной температуре инкубации вызывали повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в культуре клеток *A. thaliana* (рис. 16) и одновременно активировали экспрессию *HSP101* (рис. 8). Однако АМД и СССР оказывали различный эффект на экспрессию БТШ при повышении температуры. Присутствие СССР во время теплового стресса ингибировало повышение содержания Hsp104p (рис. 7) и активацию экспрессии *HSP101* (рис. 8), а АМД такого эффекта не оказывал. Сравнение эффекта СССР на экспрессию *HSP101* и изменение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  при 37 °С показывает, что комбинированное действие СССР и теплового стресса приводило к аддитивному эффекту. При совместном действии двух факторов наблюдался наиболее высокий уровень  $[Ca^{2+}]_{цит}$ , который превышал эффект воздействия теплового стресса и СССР на этот показатель по отдельности (рис. 16). Чрезмерное повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  сопровождалось ингибированием экспрессии *HSP101* (рис. 8). Для активации экспрессии БТШ при тепловом стрессе необходима конкретная пространственная и временная динамика изменения уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле – сигнатура  $Ca^{2+}$  (Медведев, 2005). Нарушение этой динамики может приводить не к активации, а к подавлению экспрессии БТШ у растений (Saidi et al., 2011). Вероятно, именно по этой причине СССР, повышая концентрацию  $Ca^{2+}$  в цитозоле до критического уровня, ингибировал активацию экспрессии *HSP104* и *HSP101* при действии теплового стресса.

Регуляция экспрессии *HSP104* и других генов БТШ в клетках *S. cerevisiae* осуществляется с помощью двух независимых систем – фактора теплового шока (Hsf, heat shock factor) и транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p (Treger et al., 1998; Amorós, Estruch, 2001; Grably et al., 2002). В работе впервые показано, что способность АМД индуцировать синтез Hsp104p в клетках дрожжей зависит от присутствия факторов Msn2p/Msn4p (рис. 3). Есть основания полагать, что активация транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p в клетках *S. cerevisiae* может зависеть от присутствия ионов  $Ca^{2+}$  (Федосеева и др., 2010; Ohdate et al., 2010; Takatsume et al., 2010). Поскольку АМД повышает уровень  $[Ca^{2+}]_{цит}$  в клетках *S. cerevisiae* (Gupta et al., 2003), очевидно, что АМД индуцирует синтез Hsp104p в результате активации транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p.

В клетках *S. cerevisiae* источником повышения  $[Ca^{2+}]_{цит}$  при обработке АМД является поступление кальция внутрь клетки из внеклеточного пространства (Gupta et al., 2003). Показано, что АМД изменяет свойства плазматической мембраны, что и приводит к повышению  $[Ca^{2+}]_{цит}$  (Gupta et al., 2003). В результате действия аналогичного механизма наблюдается повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  у растений при повышении температуры (Saidi et al., 2011). Напротив, повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  при обработке СССР, по-видимому, происходит в результате функционирования другого механизма. Показано, что СССР вызывал деполяризацию митохондриальной мембраны в культуре клеток кукурузы и выход  $Ca^{2+}$ , депонированного в митохондриях, в цитозоль (Subbaiah et al., 1998). Таким образом, повышение  $[Ca^{2+}]_{цит}$  до критического уровня в результате совместного

действия теплового стресса и СССР (рис. 16) является, по-видимому, следствием суммы двух одновременных процессов: поступления кальция в цитозоль через плазматическую мембрану и выхода кальция из митохондрий.

Полученные ранее результаты указывают на то, что экспрессия БТШ при тепловом стрессе зависит от изменения потенциала на внутренней митохондриальной мембране. Тепловой стресс вызывал повышение мт $\Delta\psi$  в клетках дрожжей (Rikhvanov et al., 2005), растений (Rikhvanov et al., 2005) и млекопитающих (Balogh et al., 2005), и это событие, очевидно, является необходимым условием для активации экспрессии БТШ (Rikhvanov et al., 2005, 2007). Зависимость между значением мт $\Delta\psi$  и экспрессией генов БТШ подтверждена в данной работе. Гиперполяризация митохондриальной мембраны (рис. 10 и 13) и активация экспрессии БТШ (рис. 2 и 4) наблюдались при тепловом стрессе и обработке АД клеток *S. cerevisiae* и *A. thaliana*. Однако зависимость между повышением мт $\Delta\psi$  и экспрессией БТШ не является абсолютной. Обработка АД вызывала гораздо более значительное повышение мт $\Delta\psi$ , чем тепловой стресс (рис. 10, 13), однако экспрессия БТШ была выше при тепловом стрессе, чем при обработке АД (рис. 2, 4).

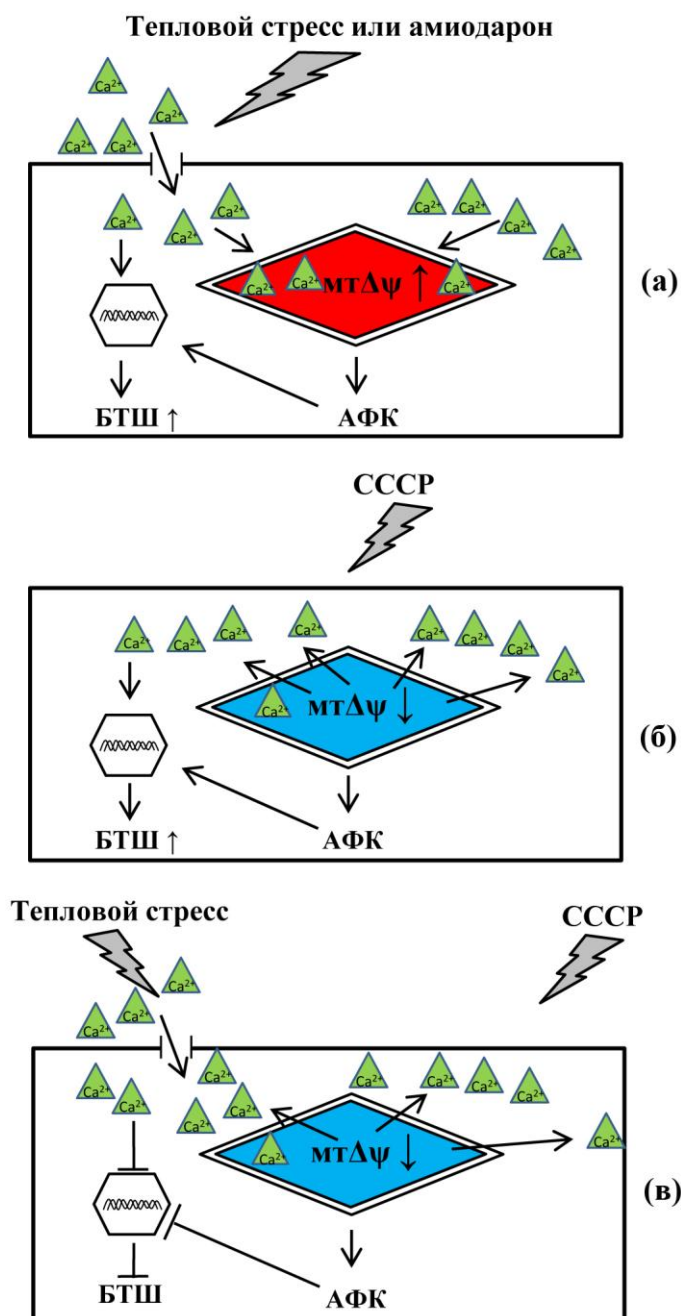
Вероятно, гиперполяризация внутренней митохондриальной мембраны при повышении температуры и обработке АД является следствием повышения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле (рис. 17 а). Balogh с соавторами (2005) показали, что в клетках млекопитающих при тепловом стрессе повышается  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ , что сопровождается повышением мт $\Delta\psi$ . Аналогичным образом обработка АД клеток *S. cerevisiae* приводила к увеличению содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле и повышению мт $\Delta\psi$ , что дало основание предполагать связь между этими двумя явлениями (Pozniakovsky et al., 2005). Очевидно, что подобная зависимость выполняется и для растений. Тепловой стресс и обработка АД вызывали гиперполяризацию митохондриальной мембраны (рис. 13) и повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  (рис. 15) в клетках *A. thaliana*.

Анализ результатов, а также литературных данных позволяет предположить следующую гипотетическую последовательность процесса митохондриальной ретроградной регуляции, активируемой в культуре клеток *A. thaliana* при повышении температуры и обработке АД. Тепловой стресс, а также обработка АД вызывают изменение структуры плазматической мембраны. В результате активируются кальциевые каналы, и наблюдается повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  (рис. 17 а). С одной стороны, повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  является причиной снижения жизнеспособности дрожжей и культуры клеток *A. thaliana* (рис. 1), но с другой стороны, повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  может активировать экспрессию *HSP104* (рис. 7) и *HSP101* (рис. 8). Поскольку длительное повышение уровня кальция в цитозоле имеет неблагоприятные последствия, то кальций транспортируется из цитозоля в митохондрии. Повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях растительной клетки приводит к повышению мт $\Delta\psi$ . Повышение мт $\Delta\psi$  усиливает генерацию АФК (Korshunov et al., 1997; Pozniakovsky et al., 2005).

Повышение генерации АФК до определенного уровня также может вносить вклад в активацию экспрессии БТШ (Volkov et al., 2006; Saidi et al., 2011). Чрезмерное повышение уровня АФК вызывает гибель клетки (рис. 1). Митохондрии, таким образом, изменяя потенциал на внутренней митохондриальной мембране, модулируют уровень

внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и АФК и, тем самым, осуществляют ретроградную регуляцию экспрессии *HSP104* и *HSP101*.

Иная последовательность событий наблюдается в случае обработки СССР дрожжей и культуры клеток *A. thaliana* при обычной температуре инкубации (рис. 17 б). Протонофор СССР вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны, что приводит к выходу  $\text{Ca}^{2+}$ , депонированного в митохондриях, в цитозоль (Subbaiah et al., 1998). Повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  (рис. 16) активирует экспрессию *HSP104 S. cerevisiae* (рис. 7) *HSP101 A. thaliana* (рис. 8). Однако деполяризация внутренней митохондриальной



**Рис. 17.** Гипотетический механизм митохондриальной ретроградной регуляции экспрессии *HSP104 S. cerevisiae* и *HSP101 A. thaliana* при действии теплового стресса или амиодарона (а), СССР (б), а также комбинированного действия СССР и теплового стресса (в).

мембраны во время теплового стресса, во-первых, ингибирует удаление  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля в митохондрии, а, во-вторых, вызывает выход депонированного  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий в цитозоль (рис. 17 в). В результате  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  повышается до критического уровня (рис. 16), при котором экспрессии *HSP104* (рис. 7) и *HSP101* (рис. 8) не происходит.

Полученные результаты свидетельствуют, что нарушение митохондриальных функций не только может активировать экспрессию генов БТШ растений, как это было показано другими исследователями (Krause, Durner, 2004; Kuzmin et al., 2004), но и подавлять активацию экспрессии БТШ при действии теплового стресса. Таким образом, очевидно, что митохондрии регулируют экспрессию ядерных генов растений как позитивным, так и негативным образом.

## ВЫВОДЫ

1. Амиодарон в микромолярных концентрациях значительно снижает жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae*, но менее токсичен для культуры клеток *A. thaliana*.
2. Амиодарон и СССР при обычной температуре инкубации индуцируют синтез Hsp101p в клетках *A. thaliana* и Hsp104p в клетках *S. cerevisiae*.
3. Способность амиодарона индуцировать синтез Hsp104p в клетках *S. cerevisiae* зависит от наличия транскрипционных факторов Msn2p/Msn4p.
4. Амиодарон повышает термотолерантность клеток *S. cerevisiae*. Повышение термотолерантности зависит от присутствия гена *HSP104*.
5. Повышение содержания ионов кальция в цитозоле культуры клеток *A. thaliana* при обработке амиодароном и действии теплового стресса сопровождается гиперполяризацией внутренней митохондриальной мембраны.
6. Деполяризация внутренней митохондриальной мембраны при обработке СССР приводит к повышению содержания ионов кальция в цитозоле культуры клеток *A. thaliana*. Присутствие СССР при действии теплового стресса еще больше повышает уровень ионов кальция, что сопровождается ингибированием экспрессии *HSP101*.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

И.В. Федосеева, **Д.В. Пятрикас**, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, А.В. Степанов, Е.Г. Рихванов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников. Влияние амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. – 2012. – Т.77, №1. – С.99–109.

**Д.В. Пятрикас**, И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов, Г.Б. Боровский. Эффект амиодарона на содержание Hsp101p и жизнеспособность культуры клеток *Arabidopsis thaliana*. VI международная научно-практическая конференция «Научная дискуссия: вопросы физики, химии, биологии», Москва, 2013, С.21.

**Д.В. Пятрикас**, Е.Г. Рихванов, И.В. Федосеева, Н.Н. Варакина, Т.М. Русалева, Е.Л. Таусон, А.В. Степанов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников. Митохондриальная ретроградная регуляция экспрессии *HSP101 Arabidopsis thaliana* при тепловом стрессе и действии амиодарона // Физиология растений. – 2013. В печати.

**Д.В. Пятрикас**, И.В. Федосеева, Е.Г. Рихванов, Г.Б. Боровский. Влияние амиодарона и теплового стресса на содержание Hsp104p и Hsp101p и жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и культуры клеток *Arabidopsis thaliana* // Вестник ИрГТУ. – 2013. – №2. – С.

**D.V. Pyatrikas**, I.V. Fedoseeva, N.N. Varakina, T.M. Rusaleva, A.V. Stepanov, E.G. Rikhvanov, G.B. Borovskii, V.K. Voinikov. Amiodarone induces the synthesis of Hsps in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* cells. The 2<sup>nd</sup> International conference «Plant genetics, genomics and biotechnology», Irkutsk, 2011, P.54.