



УДК 577.21

## **Влияние карбонилцианид м-хлорфенил гидразона на содержание Hsp104p и термотолерантность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от типа энергетического метаболизма**

Д. В. Пятрикас, И. В. Федосеева, Е. Г. Рихванов, А. В. Степанов,  
Н. Н. Варакина, Т. М. Русалева, Г. Б. Боровский

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск*  
E-mail: [galdasova@sifibr.irk.ru](mailto:galdasova@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** Изучали влияние протонофора карбонилцианид м-хлорфенил-гидразона (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, СССР) на индукцию синтеза шаперона Hsp104p, развитие термотолерантности и продукцию активных форм кислорода (АФК) у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что кратковременная обработка СССР клеток дрожжей, использующих бродильный тип метаболизма, сопровождалась синтезом Hsp104p и развитием устойчивости к последующему жёсткому тепловому шоку. Однако в случае с добавлением агента к клеткам с окислительным типом метаболизма наблюдалось ингибирование индукции синтеза Hsp104p и термотолерантности дрожжей. Не обнаружено чёткой корреляции между эффектом СССР на синтез Hsp104p и продукцию АФК.

**Ключевые слова:** *Saccharomyces cerevisiae*, Hsp104p, термотолерантность, СССР, митохондрии.

### **Введение**

В ответ на мягкое тепловое воздействие (тепловой стресс) в клетках эукариот активируется синтез специфического набора белков, называемых белками теплового шока (БТШ). Такое событие сопровождается развитием устойчивости клеток к более жёсткому тепловому воздействию (тепловому шоку) и получило название индуцированная термотолерантность [7]. Одну из ключевых ролей в развитии индуцированной термотолерантности играет шаперон Hsp104p [7]. Предполагают, что необходимым условием для активации экспрессии генов БТШ является усиление генерации активных форм кислорода (АФК). Основным источником АФК в клетках дрожжей являются митохондрии [5]. Карбонилцианид м-хлорфенил-гидразон (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone, СССР) является протонофором и ингибирует функции митохондрий, нарушая протонный градиент на внутренней митохондриальной мембране. Целью настоящей работы явилось изучение влия-

ния СССР на содержание Hsp104p и термотолерантность дрожжей *Saccaromyces cerevisiae* в зависимости от типа энергетического метаболизма.

### **Материалы и методы**

**Штаммы и условия культивирования.** В работе использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* Ψ-74-D694 (МАТа *ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) his3Δ-200 ura3-52 leu2-3 112 [psi<sup>-</sup>]*), предоставленный S. Lindquist (Институт биомедицинских исследований, Уайтхед, США). Дрожжи поддерживали на среде YEPD (дрожжевой экстракт – 5 г/л, пептон – 10 г/л, глюкоза – 20 г/л) или YEPЕ (дрожжевой экстракт – 5 г/л, пептон – 10 г/л, этиловый спирт – 20 мл/л) [1].

Дрожжи выращивали в течение 14–16 ч при 30 °С на термостатируемой качалке (Biosan, Латвия) в колбах объёмом 100 мл с 25 мл жидкой среды YEPD или YEPЕ. Для проведения экспериментов использовали дрожжи, находящиеся в середине логарифмической фазы роста.

Для изучения базовой термотолерантности клетки дрожжей *S. cerevisiae* обрабатывали при 30 °С, затем инкубировали при 50 °С в течение 8 мин. Для развития индуцированной термотолерантности клетки дрожжей *S. cerevisiae* обрабатывали при 39 °С в течение 30 мин, затем инкубировали при 50 °С в течение 8 мин.

Для изучения влияния агентов на жизнеспособность клетки дрожжей *S. cerevisiae* инкубировали при 30 или 39 °С (30 мин) в присутствии или отсутствии СССР, отмывали от них средой роста (3 раза), ресуспендировали в свежей среде и подвергали действию жёсткого теплового шока (50 °С) в течение 0–8 мин. Для подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ) суспензию клеток дрожжей *S. cerevisiae* десятикратно разводили и высевали на твёрдую питательную среду YEPD. Количество образовавшихся колоний учитывали спустя 48 ч инкубации при 30 °С. Жизнеспособность дрожжей определяли как процент образовавшихся колоний после определённого периода теплового воздействия к количеству колоний до теплового шока.

**Флуоресцентная микроскопия.** Для качественной визуализации потенциала на внутренней мембране митохондрий использовали потенциал-зависимый краситель TMRM (tetramethylrhodamine methylester) в конечной концентрации 5 мкМ. Результаты фиксировали после инкубации клеток дрожжей с красителем в течение 10 мин.

Для изучения генерации АФК с помощью метода флуоресцентной микроскопии использовали краситель H<sub>2</sub>DCF DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) в конечной концентрации 5 мкМ (30 мин).

Флуоресцентную микроскопию проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioObserver Z1 (Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программного обеспечения для захвата и анализа изображений AxioVision Rel.4.7. В анализе использовали по 10 фотографий каждого варианта, по которым обсчитывали интенсивность флуоресценции.

**Выделение суммарного белка и иммуоблоттинг.** Для выделения суммарного белка клетки дрожжей обрабатывали СССР (20 мкМ), осаждали

центрифугированием, отмывали 2 раза дистиллированной водой от компонентов среды, для анализа использовали 0,5 г сырой массы. Перед выделением клетки размораживали, ресуспендировали в буфере для выделения белка (0,1 М Трис-НСl, 0,003 М ДДС-Na, 0,001 М β-меркаптоэтанол, рН 7,4–7,6), замораживали жидким азотом и растирали с кварцевым песком. Грубые клеточные компоненты удаляли центрифугированием (15000g, 15 мин), белок из супернатанта осаждали трёхкратным объёмом охлаждённого ацетона. Осадок белка трижды промывали и растворяли в буфере для образца (0,625 М Трис-НСl, 0,008 М ДДС-Na, 0,1 М β-меркаптоэтанол, 10 % глицерин рН 6,8). Концентрацию белка определяли по методу Лоури [6]. После разведения белков методом электрофореза с ДДС-Na в 12%-ном ПААГ проводили иммуноблоттинг с антителами против Hsp104p (SPA-8040, StressGen, США) и Hsp60p (US biological H1830-77B, США).

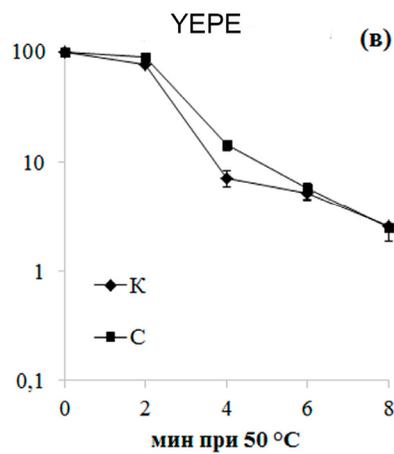
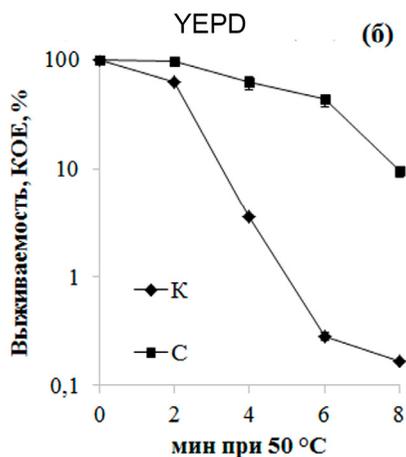
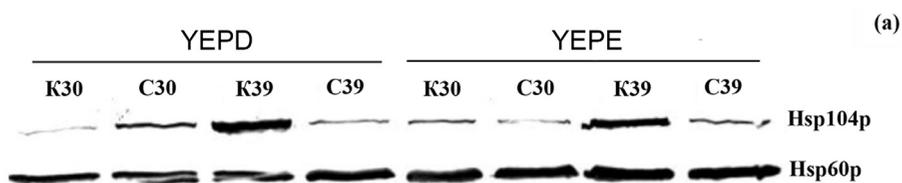
Эксперименты повторяли не менее трёх раз. Полученные данные были обработаны статистически: с помощью программы Excel рассчитаны среднеарифметические значения и их стандартные отклонения.

### ***Результаты и обсуждение***

Обработка СССР клеток с бродильным типом метаболизма (выращенных на среде с добавлением глюкозы) при 30 °С вызывала значительное повышение содержания Hsp104p. Добавление же СССР в клетки с окислительным типом метаболизма (на среде с добавлением этанола), наоборот, приводило к падению содержания Hsp104p ниже контрольного уровня. В то же время добавление СССР во время теплового стресса (39 °С) ингибировало повышение содержания этого белка (рис. 1, а) в клетках, выращенных на обоих вариантах сред.

Так как белок Hsp104p играет ключевую роль в развитии индуцированной термотолерантности [3], в следующем эксперименте изучали влияние СССР на устойчивость клеток дрожжей к тепловому шоку в зависимости от типа их энергетического метаболизма. Предварительная обработка СССР клеток дрожжей, выращенных на глюкозе, приводила к увеличению их способности выдерживать жёсткий тепловой шок (см. рис. 1, б). Такого результата не наблюдалось при добавлении агента к клеткам, выращенным на этаноле (рис. 1, в). Полученный результат согласуется с данными иммуноблоттинга. Обработка СССР индуцировала синтез Hsp104p (см. рис. 1, а), и это сопровождалось повышением термотолерантности (рис. 1, б).

Таким образом, хотя обработка СССР сопровождается ростом содержания Hsp104p и повышением устойчивости клеток к повреждающему действию теплового шока, однако это справедливо только для клеток, использующих бродильный тип метаболизма (рис. 1, з). В то же время присутствие СССР во время мягкого теплового стресса, наоборот, снижало индукцию синтеза Hsp104p (см. рис. 1, б) и подавляло способность клеток развивать индуцированную термотолерантность (данные не представлены).



(г)

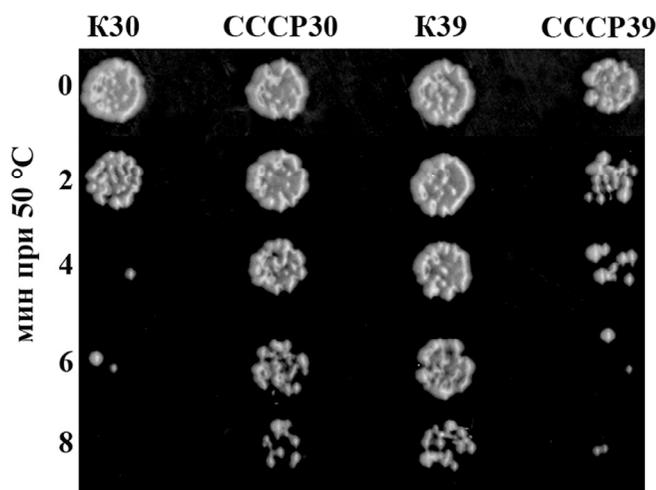


Рис. 1. Влияние СССР на содержание Hsp104p и термотолерантность клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Клетки дрожжей выращивали при 30 °C на среде с глюкозой или этанолом, инкубировали при 30 °C или 39 °C (30 мин) в отсутствие добавок (K30, K39) или при добавлении 20 мкМ СССР (C30, C39), отмывали и выделяли белок (а) или определяли выживаемость после теплового шока (50 °C, 0–8 мин) (б–г). Представлены результаты типичного эксперимента ( $n = 3$ )

Известно, что в клетках дрожжей мягкий тепловой стресс сопровождается повышением потенциала на внутренней мембране митохондрий (мтΔψ) [2]. В наших экспериментах установлено, что СССР эффективно подавляет потенциал на внутренней мембране митохондрий в клетках, выращенных на среде с добавлением глюкозы как при обычной температуре, так и при тепловом стрессе (рис. 2). В клетках же с окислительным типом метаболизма СССР не оказывал заметного эффекта на мтΔψ при обычной температуре, однако ингибировал повышение потенциала при тепловом стрессе. Вероятно, повышение мтΔψ приводит к активации экспрессии генов БТШ. Снижение мтΔψ при обработке СССР во время теплового стресса (см. рис. 2) приводит к ингибированию тепловой индукции синтеза Hsp104p в клетках дрожжей как на среде с этанолом, так и на среде с глюкозой (см. рис. 1, а). Однако связь между мтΔψ и экспрессией БТШ выполняется только в условиях теплового стресса. Присутствие СССР при обычной температуре инкубации снижало мтΔψ (см. рис. 2), что приводило к индукции синтеза Hsp104p в клетках дрожжей, выращенных на среде с глюкозой (см. рис. 1, а), сопровождавшейся повышением термотолерантности (см. рис. 1, б).

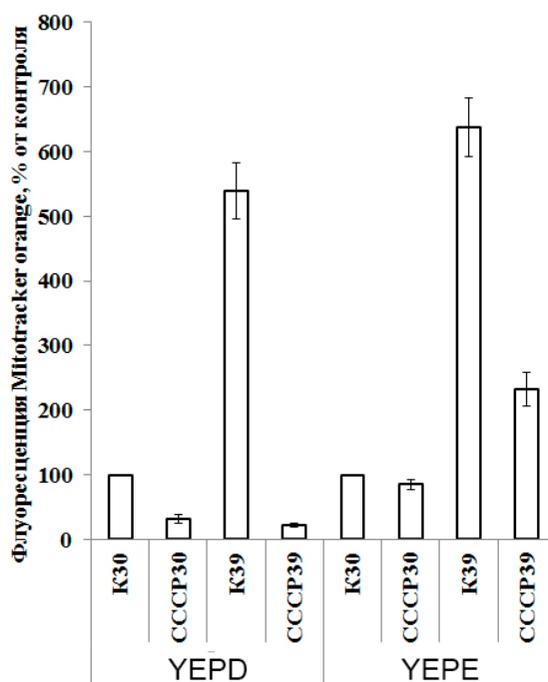


Рис. 2. Влияние СССР на флуоресценцию Mitotracker orange в клетках дрожжей в зависимости от источника получаемой энергии. Клетки дрожжей выращивали при 30 °С на среде с глюкозой или этанолом, инкубировали в течение 10 мин при 30 °С или 39 °С в отсутствие (K30, K39) или при добавлении 20 мкМ СССР (C30, C39) и измеряли флуоресценцию Mitotracker orange ( $n = 3$ )

Известно, что в клетках млекопитающих [4] и дрожжей [9] повышение мТДψ может сопровождаться усилением генерации АФК. Однако повышение продукции АФК может наблюдаться и при снижении мТДψ [8]. Поэтому на следующем этапе изучали влияние СССР на генерацию АФК в клетках дрожжей. Продукция АФК в клетках с окислительным метаболизмом была на низком уровне при обычной температуре инкубации и возрастала при мягком тепловом стрессе (39 °С) (рис. 3). В клетках с бродильным метаболизмом наблюдалась такая же тенденция, однако, по сравнению с клетками, выращенными на этаноле, уровень АФК был выше. Присутствие СССР оказывало незначительный эффект на продукцию АФК в клетках с бродильным типом энергетического метаболизма, но резко усиливало генерацию АФК в клетках с окислительным типом метаболизма (см. рис. 3).

Измерение продукции АФК показало, что обработка СССР дрожжей, выращенных на глюкозе, очень незначительно усиливала образование АФК (см. рис. 3). Напротив, обработка СССР дрожжей, выращенных на этаноле, заметно стимулировала продукцию АФК (см. рис. 3), но при этом не наблюдалось индукции синтеза Hsp104p (см. рис. 1, a).

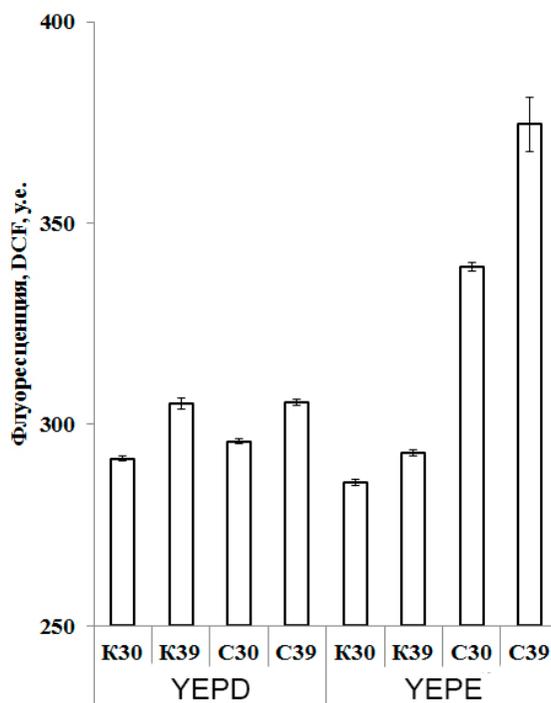


Рис. 3. Влияние СССР на продукцию АФК в клетках *S. cerevisiae*. Клетки дрожжей выращивали при 30 °С на среде с глюкозой или этанолом, инкубировали при 30 °С или 39 °С (30 мин) в отсутствие добавок (K30, K39) или при добавлении 20 мкМ СССР (C30, C39) и измеряли флуоресценцию H<sub>2</sub>DCF DA. Представлены результаты типичного эксперимента ( $n = 3$ )

Таким образом, не наблюдается положительной зависимости между генерацией АФК и индукцией синтеза Hsp104p при обработке CCCP. Однако нельзя исключать, что для активации экспрессии Hsp104p необходим определённый уровень АФК, и превышение его выше определённого порога не активирует, а ингибирует экспрессию Hsp104p.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-31677, 10-04-00921-а) и Минобрнауки РФ (соглашение № 8266). В работе использовано оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) СО РАН при Президиуме ИИЦ СО РАН.*

#### Список литературы

1. Влияние амиодарона на термотолерантность и синтез Hsp104p у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / И. В. Федосеева [и др.] // Биохимия. – 2012. – Т. 77, № 1. – С. 99–109.
2. Do mitochondria regulate the heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*? / E. G. Rikhvanov [et al.] // Curr. Genet. – 2005. – Vol. 48, N 1. – P. 44–59.
3. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress / Y. Sanchez [et al.] // EMBO J. – 1992. – Vol. 11, N 6. – P. 2357–2364.
4. Korshunov S. S. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria / S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, A. A. Starkov // FEBS Lett. – 1997. – Vol. 416, N 1. – P. 15–18.
5. Longo V. D. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae* / V. D. Longo, E. B. Gralla, J. S. Valentine // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, N 21. – P. 12275–12280.
6. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1957. – N 193. – P. 265–275.
7. Richter K. The heat shock response: life on the verge of death / K. Richter, M. Haslbeck, J. Buchner // Mol. Cell. – 2010. – Vol. 40, N 2. – P. 253–266.
8. Rigoulet M. Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H(2)O(2) Signaling / M. Rigoulet, E. D. Yoboue, A. Devin // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – Vol. 14, N 3. – P. 459–468.
9. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast / A. I. Pozniakovsky [et al.] // J. Cell Biol. – 2005. – Vol. 168, N 2. – P. 257–269.

## **Effect of Carbonyl Cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) on Level of Hsp104p Synthesis and Thermotolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Depending on the Type of Energy Metabolism**

D. V. Pyatrikas, I. V. Fedoseeva, E. G. Rikhvanov, A. V. Stepanov,  
N. N. Varakina, T. M. Rusaleva, G. B. Borovskii

<sup>1</sup>*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk*

**Abstract.** Studied the effect of protonophore CCCP on level of Hsp104p synthesis, development thermotolerance and ROS production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is

shown that short-term treatment of the СССР yeast cells using the type of fermentation metabolism, accompanied Hsp104p synthesis and the development of resistance to subsequent stringent thermal shock. However, in the case of adding the agent to the cells using the type of oxidative metabolism was observed inhibition of Hsp104p synthesis and yeast thermotolerance. Not found a clear correlation between the ability to induce ROS production and the expression of fusion Hsp104p by the СССР.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Hsp104p, thermotolerance, СССР, mitochondria.

*Пятрикас Дарья Валерьевна*  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел.: (3952) 42–46–59  
факс: (3952) 51–07–54  
e-mail: [galdasova@sifibr.irk.ru](mailto:galdasova@sifibr.irk.ru)

*Pyatrikas Darya Valeryevna*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033  
tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
e-mail: [galdasova@sifibr.irk.ru](mailto:galdasova@sifibr.irk.ru)

*Федосеева Ирина Владимировна*  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел. (3952) 42–46–59  
факс (3952) 51–07–54  
e-mail: [fedoseeva@sifibr.irk.ru](mailto:fedoseeva@sifibr.irk.ru)

*Fedoseeva Irina Vladimirovna*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
e-mail: [fedoseeva@sifibr.irk.ru](mailto:fedoseeva@sifibr.irk.ru)

*Рихванов Евгений Геннадьевич*  
доктор биологических наук  
ведущий научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел.: (3952) 42–46–59  
факс: (3952) 51–07–54  
e-mail: [eugene@sifibr.irk.ru](mailto:eugene@sifibr.irk.ru)

*Rikhvanov Evgenii Gennadievich*  
Doctor of Sciences (Biology)  
Leading Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
e-mail: [eugene@sifibr.irk.ru](mailto:eugene@sifibr.irk.ru)

*Степанов Алексей Владимирович*  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел.: (3952) 42–46–59  
факс: (3952) 51–07–54  
e-mail: [stepanov@sifibr.irk.ru](mailto:stepanov@sifibr.irk.ru)

*Stepanov Aleksey Vladimirovich*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
e-mail: [stepanov@sifibr.irk.ru](mailto:stepanov@sifibr.irk.ru)

*Варакина Нина Николаевна*  
*ведущий инженер*  
*Сибирский институт физиологии*  
*и биохимии растений СО РАН*  
*664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132*  
*тел.: (3952) 42-46-59*  
*факс: (3952) 51-07-54*  
*e-mail: galdasova@sifibr.irk.ru*

*Varakina Nina Nikolaevna*  
*Leading Engineer*  
*Siberian Institute of Plant Physiology and*  
*Biochemistry SB RAS*  
*132, Lermontov st., Irkutsk, 664033*  
*tel.: (3952) 42-46-59*  
*fax: (3952) 51-07-54*  
*e-mail: galdasova@sifibr.irk.ru*

*Русалева Татьяна Михайловна*  
*ведущий инженер*  
*Сибирский институт физиологии*  
*и биохимии растений СО РАН*  
*664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132*  
*тел. (3952) 42-46-59*  
*факс (3952) 51-07-54*  
*e-mail: galdasova@sifibr.irk.ru*

*Rusaleva Tatyana Mikhailovna*  
*Leading Engineer*  
*Siberian Institute of Plant Physiology and*  
*Biochemistry SB RAS*  
*132, Lermontov st., Irkutsk, 664033*  
*tel.: (3952) 42-46-59*  
*fax: (3952) 51-07-54*  
*e-mail: galdasova@sifibr.irk.ru*

*Боровский Геннадий Борисович*  
*доктор биологических наук*  
*главный научный сотрудник*  
*Сибирский институт физиологии*  
*и биохимии растений СО РАН*  
*664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132*  
*тел.: (3952) 42-46-59*  
*факс: (3952) 51-07-54*  
*e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru*

*Borovskii Gennadii Borisovich*  
*Doctor of Sciences (Biology)*  
*Chief Research Scientist*  
*Siberian Institute of Plant Physiology*  
*and Biochemistry SB RAS*  
*132, Lermontov st., Irkutsk, 664033*  
*tel.: (3952) 42-46-59*  
*fax: (3952) 51-07-54*  
*e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru*