На правах рукописи

Рогов Антон Геннадьевич

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ, ДИСФУНКЦИЕЙ МИТОХОНДРИЙ, ИХ ФРАГМЕНТАЦИЕЙ И АПОПТОЗОМ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Специальность 03.01.04 Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена в лаборатории биоэнергетики Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор **Звягильская Рената Александровна**

Официальные оппоненты: **Миронова Галина Дмитриевна**
Заслуженный деятель наук РФ, доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, заведующая лабораторией митохондриального транспорта

Ягужинский Лев Сергеевич
Доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, заведующий лабораторией структуры и функций мембран

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук

Защита состоится «__»_____2016 года в часов на заседании Диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте института http://fbras.ru//.

Автореферат разослан «__»_____2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Термин «окислительный стресс» в настоящее время используется для обозначения повышенной внутриклеточной генерации активных форм кислорода (АФК) (среди них наиболее распространённые супероксид анион-радикал, пероксид водорода, синглетный кислород и гидроксил анион-радикал) и окислительного повреждения редокс-чувствительных компонентов клетки (железо-серных кластеров, белков, липидов и нуклеиновых кислот).

В клетке основными источниками АФК являются митохондрии [Li et al., 2011; Dröse and Brandt, 2012; Suski et al., 2012]. Именно они концентрируют в себе большую часть окислительных метаболических путей, содержат многочисленные редокс-переносчики и центры, потенциально способные к одноэлектронному восстановлению кислорода до радикала супероксид-аниона, предшественника других форм АФК. В норме продукция АФК уравновешивается различными антиоксидантными системами, локализованными в цитоплазме и самих митохондриях (включая разобщающие белки у животных и растений и альтернативную оксидазу у растений и грибов). Избыточная продукция АФК митохондриями связана, как правило, с их дисфункцией и представляет серьезную угрозу для жизни клетки. Анализ структуры смертности в мире показывает, что связанные с окислительным стрессом патологии (инсульты, инфаркты, диабет, хронические воспаления и др.) лидируют в списке причин смертей. Очевидно, что не только качество, но и количество митохондрий в клетке должно строго соответствовать энергетическим потребностям организма в норме и при меняющихся физиологических условиях. Этим целям служит процесс митофагии. Митофагии всегда предшествует фрагментация митохондрий, которая часто является характерным признаком начала запрограммированной клеточной смерти (апоптоза).

Ясно, что выяснение взаимосвязи: дисфункция митохондрий – окислительный стресс – митофагия – апоптоз является чрезвычайно актуальной задачей, также как и предотвращение или обращение окислительного стресса и связанных с ним последствий с помощью антиоксидантов.

Целью работы явилось изучение взаимосвязи между индуцированным окислительным стрессом, дисфункцией митохондрий, фрагментацией митохондрий и апоптозом в клетках дрожжей аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica* и *Dipodascus magnusii*. В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

1) Методами биоинформатики выявить гены в геноме дрожжей *Y. lipolytica,* возможно участвующие в процессе апоптотической смерти дрожжевых клеток.
2) Исследовать действие окислительного стресса на морфологию и функциональное состояние митохондрий дрожжей аэробного типа обмена.
3) Исследовать влияние окислительного стресса на фрагментацию митохондрий дрожжей и апоптоз дрожжевых клеток.
4) Ослабить или обратить окислительный стресс с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов.
5) Построить трехмерную структуру дрожжевой альтернативной оксидазы (АО) (на примере АО *Y. lipolytica*).

Научная новизна. Исследовано действие бутилового эфира родамина 19 (C_4R1), бензалкония хлорида (БХ) и SkQT1 на прочносопряженные митохондрии печени крысы. Показано, что C_4R1 и БХ являются активаторами Ca^{2+}/Рн-неспецифической поры и специфическими ингибиторами синтеза и гидролиза АТР митохондриями (для БХ показано впервые). SkQT1 является наиболее эффективным митохондриально-направленным антиоксидантом нового поколения. Впервые смоделирована пространственная структура альтернативной оксидазы (АО) дрожжей, выявлены ее консервативные

участки и активные центры. Показана связь окислительного стресса с фрагментацией митохондрий дрожжей *D. magnusii* и впервые показана способность митохондриально-направленных антиоксидантов не только предотвращать, но и обращать фрагментацию митохондрий дрожжей, вызванную окислительным стрессом.

Научно-практическая ценность. Данные, полученные в работе, расширяют наши представления о влиянии окислительного стресса на индукцию апоптоза у дрожжей. Построенная нами впервые модель альтернативной оксидазы дрожжей, по-видимому, адекватно описывает структуру и свойства альтернативных оксидаз из других грибов, она полезна при разработке специфических фармацевтических средств лечения микозов. Полученные нами данные должны учитываться при использовании C_4R1 в качестве потенциального препарата медицинского назначения, необходим баланс между его хорошей способностью проникать в ткани и преодолевать гематоэнцефалический барьер, с одной стороны, а с другой, как было показано нами, возможным негативным действием на биоэнергетику. Выявленное нами негативное действие на биоэнергетику митохондрий бензалкония хлорида (БХ), широко используемого консерванта для всех типов глазных капель, делает целесообразным замену его менее токсичным консервантом. Обнаруженная нами высокая эффективность (при минимальном побочном действии) нового митохондриально-направленного антиоксиданта SkQT1 позволяет рекомендовать его в качестве перспективного агента при лечении патологий, связанных с дисфункциями митохондрий, вызванными окислительным стрессом.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: Третий Съезд Микологов России, Москва, 10-12 октября 2012 г., 38`th FEBS Congress, Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г., XXVI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 10-14

февраля 2014 г., Международная конференция, посвящённая 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, Москва, 15-19 сентября 2014 г., International Conference “The Problem of the origin of life” and Youth Scientific School “Molecular and cellular basis of the early evolution of Life”, Москва, 22-26 сентября 2014 г., International Conference of young scientists “Mitochondrial pores and channels as pharmacological targets”, Пущино-на Оке, 29-30 октября 2014 г.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 статей в зарубежных и отечественных журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ, и 8 тезисов в материалах конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 259 ссылок. Работа изложена на 158 листах печатного текста, иллюстрирована 89 рисунками и 2 таблицами.

Использованные сокращения: Ap5A – P1,P5-диаденозинпентафосфат; АФК – активные формы кислорода; C_4R1 – бутиловый эфир родамина 19; C_{16}TMA – цетилтриметиламмоний; C_9TEA – нонилтриэтиламмоний; C_{12}TPP – додецилтрифенилфосфоний; SkQBerb – 10-(6'-пластохинонил)децилберберин; SkQPalm – 10-(6'-пластохинонил)децилпалматин; БХ – бензалконий хлорид; АО – альтернативная оксидаза; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний; SkQT1 – 10-(5’- толухинолил)децилтрифенилфосфоний; mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) – митохондриальная неспецифическая Ca^{2+}/Pн-зависимая, циклоспорин А-чувствительная пора; *t*-BHP – трет-бутил гидропероксид; КЦХФ – карбонилцианидхлорфенилгидразон; Олиго – олигомицин, РСА – рентгеноструктурный анализ; ФАО – фениларсеноксид; ОА – оксалоацетат; КОЕ – колоние-образующая единица.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В обзоре литературы описана роль митохондрий в метаболизме клетки, влияние митохондриально-направленных физиологически активных веществ на развитие заболеваний, связанных с дисфункцией митохондрий. Описаны индукторы апоптоза в дрожжевых клетках, компоненты, вовлеченные в апоптоз дрожжей, основные механизмы, по которым он протекает. Подробно описаны индукция, распространение, свойства, регуляция и функции альтернативных оксидаз разных организмов от дрожжей до растений, особо подчеркнута ее роль в реакции клетки на различные виды стресса, в том числе и окислительный стресс.

Материалы и методы.

Условия выращивания дрожжевых клеток. В работе использовали дрожжи аэробного типа обмена *Y. lipolytica* и *D. magnusii*. Клетки выращивали при 28 ^{o}C на роторной качалке (220 об/мин) на полусинтетической среде [Андреищева и др., 1997; Звягильская и др., 1981], содержавшей в качестве источника углерода и энергии 1,3%-ый сукцинат или 2% глюкозу (*Y. lipolytica*) или 1%-ый глицерин (*D. magnusii*). Для выделения митохондрий клетки собирали в поздней экспоненциальной фазе роста, в опытах на целых клетках - в ранней экспоненциальной фазе роста.

Выделение митохондрий. Прочносопряженные препараты митохондрий дрожжей и митохондрий печени крысы выделяли по методам, разработанным в лаборатории [Bazhenova et al., 1998; Kovaleva et al., 2009].

Скорость поглощения кислорода митохондриями определяли полярографическим методом в ячейке (рабочий объём 1 мл) с закрытым кислородным электродом типа Кларка.

Потенциал, генерируемый на внутренней митохондриальной мембране, регистрировали на спектрофотометре Beckman Coulter DU-650 (США), ис-

пользуя двуволновой режим (511–533 нм) с 20 мкМ Safranin O в качестве потенциалзависимого зонда [Akerman and Wikstrom, 1976].

Набухание митохондрий регистрировали спектрофотометрически на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония) по уменьшению оптической плотности митохондриальной суспензии при 540 нм. Основные среды инкубации были дополнены 40 мМ KCl.

Об открытии неспецифической Ca^{2+}/Рн-зависимой поры в митохондриях печени крысы судили, как принято в литературе [Bernardi et al, 2006], по совокупности двух параметров – уменьшению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий, выделенных и инкубированных в средах без ЭГТА.

Синтез ATP митохондриями регистрировали двумя независимыми методами. Первый из них (с феноловым красным) основан на регистрации небольшого сдвига pH при превращении ADP в ATP [Жарова и др., 2004], второй – на регистрации NADPH при сопряжении синтеза ATP с восстановлением NADP в ферментативных реакциях с участием NADP, гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Гидролиз ATP определяли двумя независимыми методами. Первый из них (с феноловым красным), основанный на сдвиге pH при гидролизе ATP и образовании ADP, был описан выше, в основе второго метода лежит сопряжение гидролиза ATP с окислением NADH в ферментативных реакциях с участием фосфоенолпирувата, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы.

Образование пероксида водорода митохондриями определяли флуориметрически путем измерения окисления Amplex Red, сопряженного с ферментативным восстановлением пероксида водорода пероксидазой хрена с помощью Shimadzu RF 5301PC (Япония) при 563/587 нм (длины волн возбуждения и испускания, соответственно).

Жизнеспособность дрожжевых клеток определяли, подсчитывая число микроколоний (детали в подписях к рисункам) и методом проточной цитометрии с Propidium Iodide, Sytox Green.

Для выявления митохондрий в клетке использовали флуоресцентные зонды MitoTracker Green FM и MitoTracker Red FM. С помощью последнего оценивали величину мембранного потенциала митохондрий в клетках.

Фрагментацию митохондрий в клетке оценивали методом флуоресцентной микроскопии, используя флуоресцентный зонд MitoTracker Green FM и флуоресцентный микроскоп Olympus BX-51 с определенным набором светофильтров.

Активные формы кислорода в клетках методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии, используя в качестве флуоресцентных зондов диацетатдигидрофлуоресцеин (DCF) и MitoSox Red.

Для окрашивания ДНК клеток использовали Hoechst 33342.

Фрагментацию ДНК оценивали по окрашиванию фрагментов ДНК бромистым этидием после разделения фрагментов с помощью электрофореза в 2%-ом агарозном геле.

Для установления и анализа пространственной структуры АО *Y. lipolytica* и поиска генов, участвующих в процессе апоптотической смерти дрожжей *Y. lipolytica* применяли методы биоинформатики, молекулярного моделирования и молекулярной динамики.

Основные результаты исследования и их обсуждение

Влияние окислительного стресса на выживаемость дрожжевых клеток и функциональное состояние митохондрий. На изолированных препаратах митохондрий тестировали следующие прооксиданты: менадион, фениларсеноксид, смесь этих веществ в присутствии оксалоацетата, а также трет-бутил

гидропероксид (*t*-BHP). Показано, что все они вызывают деполяризацию митохондрий, причем *t*-BHP являлся эффективным прооксидантом с минимумом побочных явлений. Поэтому в последующих исследования в качестве прооксиданта использовали именно его. Используя метод проточной цитометрии найдено, что инкубация клеток *Y. lipolytica* с *t*-BHP вызывает дозозависимое увеличение уровня АФК в клетке (Рис. 1), а методом подсчета микроколоний показано, что *t*-BHP уменьшал зависимую от концентрации выживаемость клеток (Рис. 2), вероятнее всего, в результате окислительного стресса.

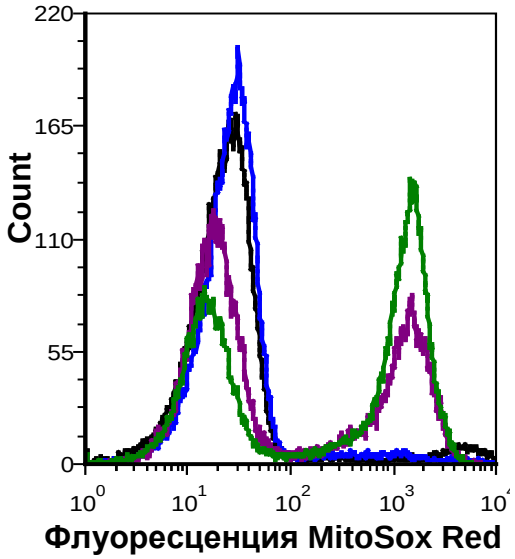


Рис. 1. Влияние разных концентраций *t*-BHP на окислительный стресс в клетках *Y. lipolytica*. Клетки были выращены до О.П. 1,0, проинкубированы с разными концентрациями *t*-BHP (**Контроль**, **200 мкМ**, **500 мкМ**, **700 мкМ**) в течение 1 ч., затем отмыты свежей порцией среды инкубации и нагружены красителем MitoSox Red. Измерение уровня АФК проводилось методом проточной цитометрии.

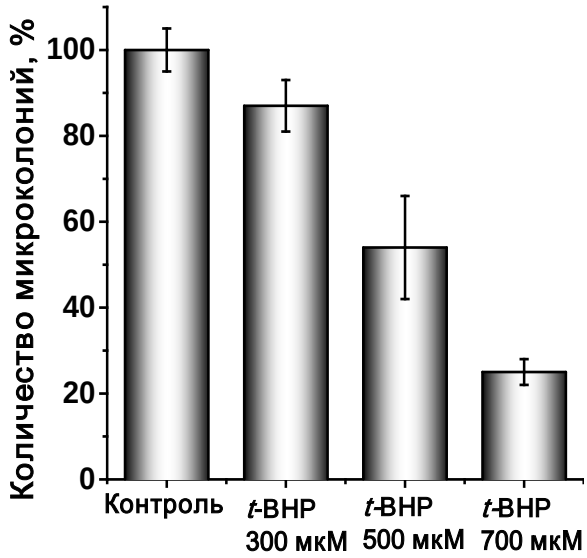
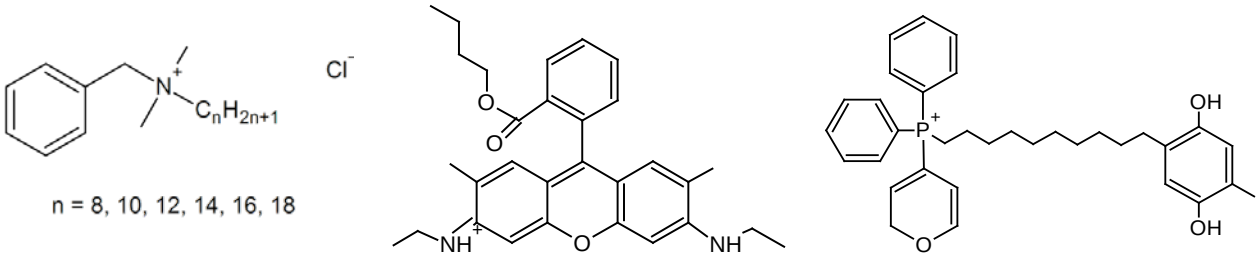


Рис. 2. *t*-BHP индуцирует клеточную смерть дрожжей *Y. lipolytica*. Клетки были выращены до О.П. 1,0, инкубированы с *t*-BHP возрастающей концентрации в течение часа. Затем суспензии разводили в 1000 раз свежей порцией среды выращивания и наносили на твердую среду выращивания, позволяя клеткам расти еще в течение 15 часов.

Нами был найден и другой эффективный прооксидант. Им оказался бензалконий хлорид (см. Рис. 3), используемый в качестве универсального консерванта практически во всех глазных каплях.



Бензалконий хлорид (БХ) | Бутилродамин (C_4R1) | SkQT1

Рис. 3. Структурные формулы использованных физиологически активных веществ

Показано, что БХ стимулировал продукцию H_2O_2 митохондриями печени крысы (Рис. 4) и вызывал окислительный стресс в клетках дрожжей (Рис. 5).

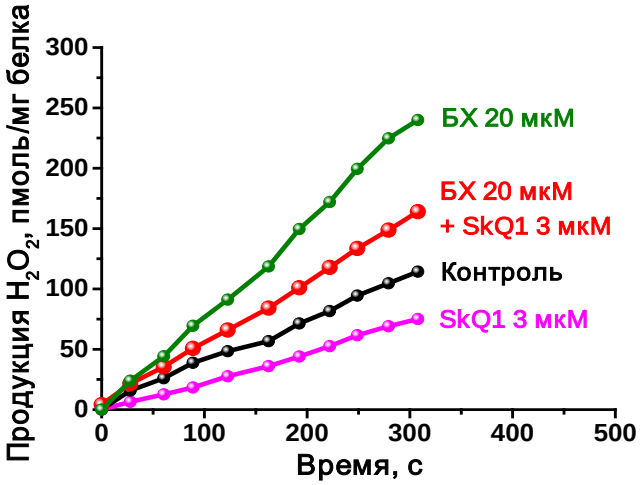


Рис. 4. БХ ускорял образование пероксида водорода митохондриями печени крысы. Основная среда инкубации содержала: 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Tris-фосфатный буфер, pH 7,2, 0,5 мМ ЭГТА, митохондрии (0,5 мг белка/мл): дополнительно - 20 мМ Tris-сукцинат, ЦсА (0,5 мкг/мг белка), 5 мкМ Amplex Red, пероксидаза хрена (9 м.е./мл)

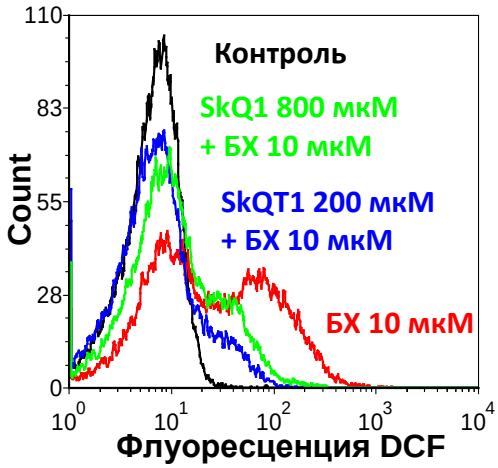


Рис. 5. БХ вызывает окислительный стресс в клетках *Y. lipolytica*. Клетки выращивали до О.П. 1,0, инкубировали с 10 мкМ БХ, затем отмыты свежей порцией среды инкубации и нагружали 2 мкМ DCF-DA.

Поскольку нами на митохондриях печени крысы было найдено, что БХ ингибирует окисление сукцината и NAD-зависимых субстратов, снижает мембранный потенциал, промотирует открытие неспецифической циклоспорин-чувствительной, Ca^{2+}/Рн-зависимой митохондриальной поры, ингибирует синтез и гидролиз АТР и, принимая во внимание, что БХ, будучи катионом, имеет своей мишенью митохондрии, полученные данные делают очевидной необходимость внести коррективы в использование БХ в качестве универсального растворителя глазных капель.

Влияние митохондриально-направленных антиоксидантов на ослабление или предотвращение окислительного стресса. Неоднократно предпринимались попытки замедлить различные патологии, связанные с окислительным стрессом. Наиболее успешным с этой точки зрения оказалось использование положительно заряженных (следовательно, транспортирующихся исключительно в митохондрии, в места синтеза АФК) липофильных антиоксидантов (см. [Murphy, 2013; Vyssokikh et al., 2015]). Мы также решили использовать для предотвращения или ослабления окислительного стресса, вызываемого *t*-BHP или БХ, митохондриально-направленные антиоксиданты нового поколения, синтезированные в рамках проекта, руководимого академиком В.П. Скулачевым. Один из них катионный протонофорный разобщитель C_4R1, другой – липофильный митохондриально-направленный антиоксидант SkQT1 (формулы этих соединений представлены на Рис. 3). Но вначале необходимо было исследовать механизм их действия на изолированных митохондриях. Суть нашего подхода мы подробно опишем для C_4R1. Мы подтвердили данные, полученные в статье [Khailova et al., 2014], о том, что C_4R1 является наиболее эффективным из всех до сих пор исследованных катионных разобщителей, но в дополнение к этим данным нашли, что C_4R1 является ингибитором преимущественно комплекса I дыхательной цепи; в очень низких

концентрациях, не вызывающих разобщения, он усиливает разобщающее действие жирных кислот, стимулирует открытие неспецифической Ca^{2+}/Рн-зависимой поры (Рис. 6) и ингибирует синтез и гидролиз АТР (Рис. 7 и 8). Это необходимо учитывать при использовании C_4R1в качестве потенциального препарата медицинского назначения.

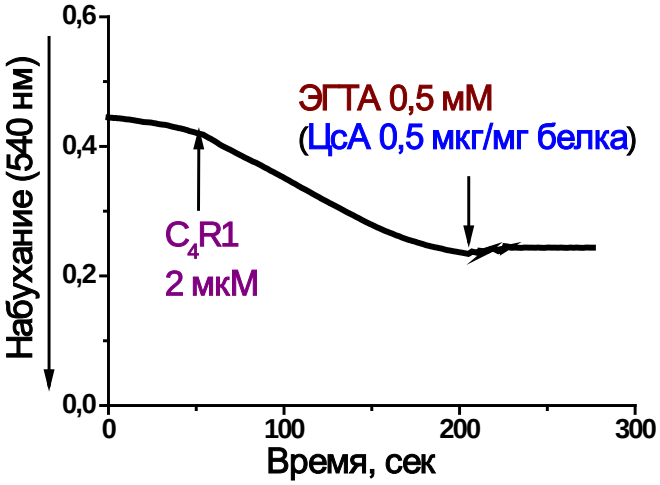


Рис. 6. C_4R1 промотирует открытие неспецифической Ca^{2+}/Рн-зависимой поры. Основная среда инкубации лишена ЭГТА и ЦсА, дополнительно содержала 20 мМ Tris-сукцинат + ротенон (2 мкг/мг белка), 40 мМ KCl. Где указано, добавлены ЭГТА или ЦсА

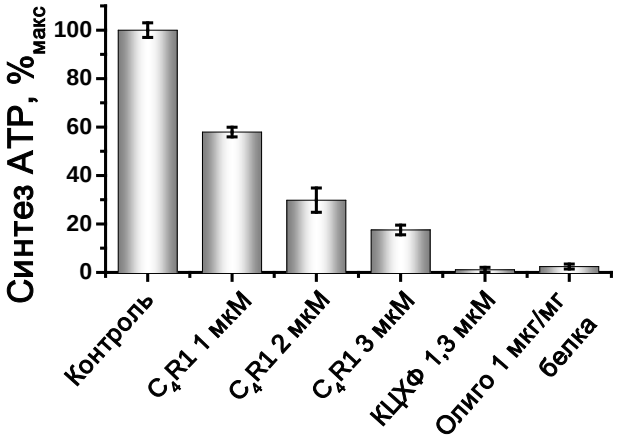


Рис. 7. Ингибирование C_4R1 синтеза АТР митохондриями печени крысы. Основная среда инкубации дополнительно содержала 20 мМ Tris-сукцинат + ротенон (2 мкг/мг белка), 6 мкМ Ap5A, 1мМ NADP, 1 мМ глюкозу, гексокиназу (10 м.е./мл), глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу (3 м.е./мл).

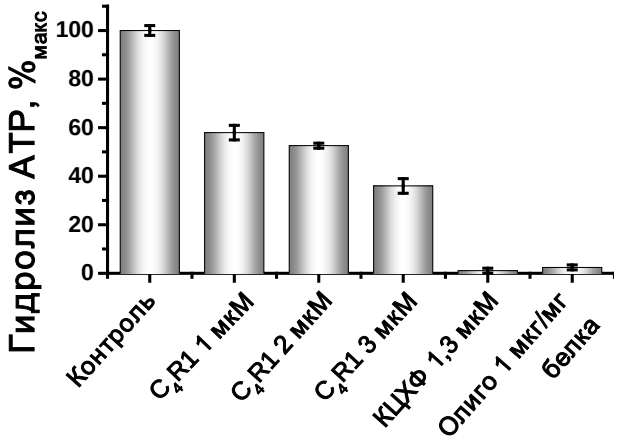


Рис. 8. Ингибирование C_4R1 гидролиза АТР митохондриями печени крысы. Основная среда инкубации дополнительно содержала 1 мМ фосфоенолпируват, 1 мМ NADH, пируваткиназу (10 м.е./мл), лактат-дегидрогеназу (2 м.е./мл).

SkQT1 не шунтировал перенос электронов от комплекса I. В относительно низких концентрациях SkQT1 и SkQ1 существенно увеличивали скорость окисления субстратов в состоянии 4 (Рис. 9), что указывало на их разобщающее действие. Для сравнения приведены данные для классического разобщителя КЦХФ.

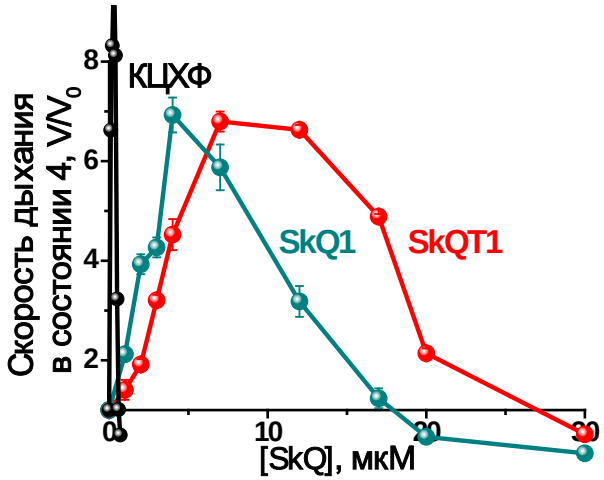


Рис. 9. Влияние SkQT1 и SkQ1 на состояние 4 дыхания митохондрий печени крысы. Основная среда инкубации дополнительно содержала 20 мМ Tris-сукцинат + ротенон (2 мкг/мг белка).

Важно отметить, что SkQT1 имеет по сравнению с SkQ1 более широкое «окно» между концентрациями, вызывающими активацию дыхания и проявляющими уже ингибирующее на дыхание действие. У КЦХФ это «окно» чрезвычайно узкое, что сделало невозможным его использование в качестве медикаментозного средства. Аналогичные данные были получены и при тестировании мембранного потенциала или скорости дыхания в состоянии 3 – мембранный потенциал снижался и скорость дыхания ингибировалась при добавлении обоих соединений, но в случае SkQT1 эти эффекты были менее выражены по сравнению с SkQ1. SkQT1 в меньшей степени, чем SkQ1, усиливал открытие Ca^{2+}/Рн-зависимой поры. Оба соединения не ингибировали гидролиз АТР, а синтез АТР ингибировали в строгом соответствии со степенью деполяризации мембраны, что позволяет предположить отсутствие специфического ингибирования АТР-синтазы или транслоказы адениновых нуклеотидов. В соответствии с теоретическими предпосылками найдено, что SkQT1 в широком диапазоне концентраций обладает более ярко выраженной антиок-

сидантной активностью по сравнению с SkQ1 (Рис. 10), и, главное, он не проявляет прооксидантного действия при увеличении концентрации, в отличии от абсолютного большинства других митохондриально-направленных катионов.

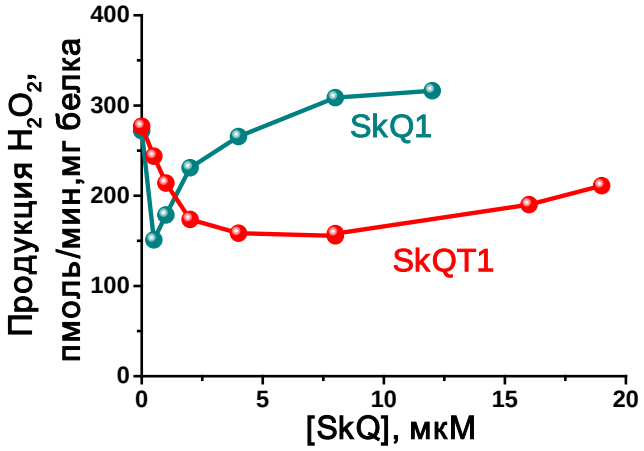


Рис. 10. Влияние SkQT1 и SkQ1 на образование пероксида водорода митохондриями печени крысы. Среда инкубации содержала: 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Tris-фосфатный буфер, pH 7,2, 20 мМ Tris-сукцинат, 0,5 мМ ЭГТА, 5 мкМ Amplex Red, пероксидазу хрена (9 м.е./мл).

Мы исследовали также взаимодействие с митохондриями дрожжей SkQBerb, SkQPalm, C_{12}TPP и поверхностно-активных веществ C_{16}TMA и C_9TEA. Поскольку эти данные были включены в диссертацию Т.А. Тренделевой (2012), мы ограничились лишь тем, что оставили публикации в списке работ.

Построение трехмерной модели митохондриальной альтернативной оксидазы дрожжей.

Помимо ферментов антиоксидантной защиты, важным механизмом предотвращения или ослабления окислительного стресса является АО (см. [Рогов и др., 2014, Рогов и Звягильская, 2015]). Однако, структура дрожжевой АО отсутствует. Мы решили восполнить этот пробел и построить трехмерную модель дрожжевой АО по аналогии с хорошо разрешенной структурой АО из *Trypanosoma brucei* [Shiba et al., 2013]. В качестве объекта исследования использовали дрожжи *Y. lipolytica*, содержащие цианид-резистентный путь окисления; геном *Y. lipolytica* секвенирован [Kerscher et al., 2001] и доступна библиотека кДНК этого организма. Методами биоинформатики были найде-

ны и аннотированы гены, кодирующие дрожжевую АО, после чего была создана пространственная модель АО *Y. lipolytica*. Методом молекулярной динамики модель была оптимизирована, и стало доступно изучение активных центров и консервативных участков АО.

Был идентифицирован ди-железный центр АО дрожжей, консервативный для всех представителей ди-железных карбоксилатных белков. В АО дрожжей *Y. lipolytica* шесть аминокислотных остатков координируют 2 атома железа (Рис. 11): четыре остатка глутаминовой кислоты (Glu-151, Glu-190, Glu-241, Glu-297), а также 2 остатка гистидина (His-193 и His-300). Эти аминокислотные остатки очень консервативны, тогда как остальные аминокислотные остатки, судя по всему, участвуют в поддержании правильного расположения аминокислотных остатков активного центра. Кроме ди-железного активного центра, восстанавливающего кислород до воды, АО любых организмов имеет сайт присоединения убихинола, восстанавливающего агента. Сайт связывания убихинола является более вариабельным чем ди-железный центр, поэтому его поиск в АО *Y. lipolytica* проводился с помощью алгоритма докинга, в результате чего были идентифицированы следующие аминокислотные остатки, координирующие молекулу убихинола: Arg-146, Phe-147, Leu-150, Ile-153, Leu-240, Thr-247 (Рис. 11).

Найдено, что взаимное расположение молекулы убихинола и ди-железного активного центра в АО *Y. lipolytica* сходно с таковым в АО *T. brucei* (Shiba et al., 2013), и является удобным для процесса передачи электрона между активным центром и убихинолом. АО грибов (и дрожжей в том числе) регулируется нуклеотидами (см. [Рогов и др., 2014; Рогов и Звягильская, 2015]). Был выбран наиболее вероятный сайт связывания ADP, удовлетворявший условиям доступности для внешних молекул и положения в сегменте белка, экспонированном в полярный растворитель. Он представлен аминокислотными остат-

ками Pro-157, Gln-158 и Met-159. На всех этапах моделирования и оптимизации модели качество предсказанной пространственной структуры контролировалось с помощью сервисов Verify_3D, SWISS-MODEL и алгоритмами, рекомендованными порталом Protein Model Portal.

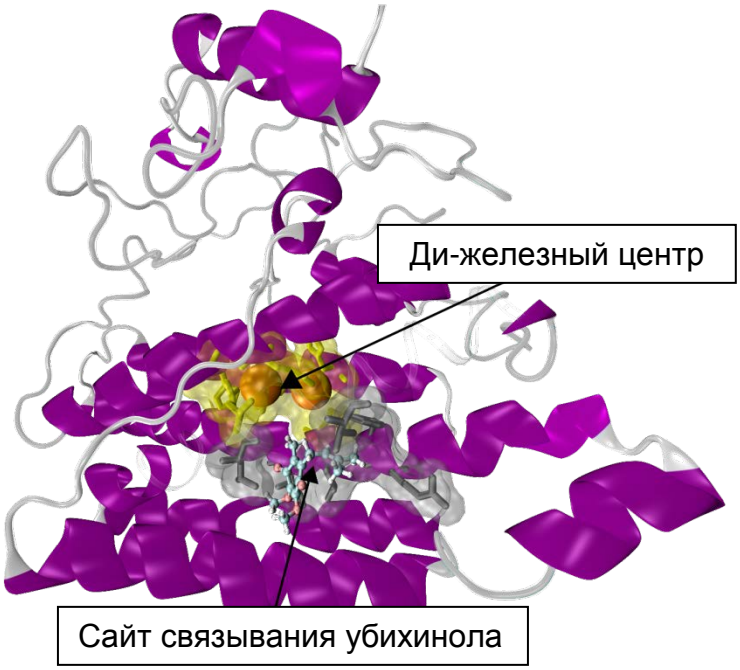


Рис. 11. Модель пространственной структуры альтернативной оксидазы дрожжей *Y. lipolytica*. Желтым обозначены аминокислотные остатки, координирующие атомы железа (оранжевые сферы); серым - аминокислотные остатки, координирующие убихинол.

Таким образом, нами впервые предложена трехмерная структура дрожжевой АО. Есть основания полагать, что сходную структуру могут иметь и другие грибные АО.

Поиск методами биоинформатики генов, участвующих в апоптозе *Y. lipolytica*. Методами биоинформатики был проведен поиск генов в геноме *Y. lipolytica*, задействованных, по литературным данным, в процессе апоптоза животных. На основе полученных данных сделан вывод о сходстве протекания процесса апоптоза у дрожжей *Y. lipolytica* и *Saccharomyces cerevisiae*, об отсутствии ряда генов (кодирующих каспазы, белки, ответственные за выход цитохрома *c* из митохондрий, регуляцию апоптотического каскада), вовлеченных в апоптоз у животных.

Фрагментация митохондрий дрожжей *D. magnusii*, вызванная окислительным стрессом.

Дрожжи *D. magnusii* в норме обладают разветвленной митохондриальной сетью (Рис. 12), что делает их перспективной моделью для изучения фрагментации митохондрий методом флуоресцентной микроскопии. Окислительный стресс, вызванный в клетках *D. magnusii* добавлением *t*-BHP, приводил к частичному или полному (в зависимости от времени инкубации и концентрации прооксиданта) распаду митохондриальной сети.

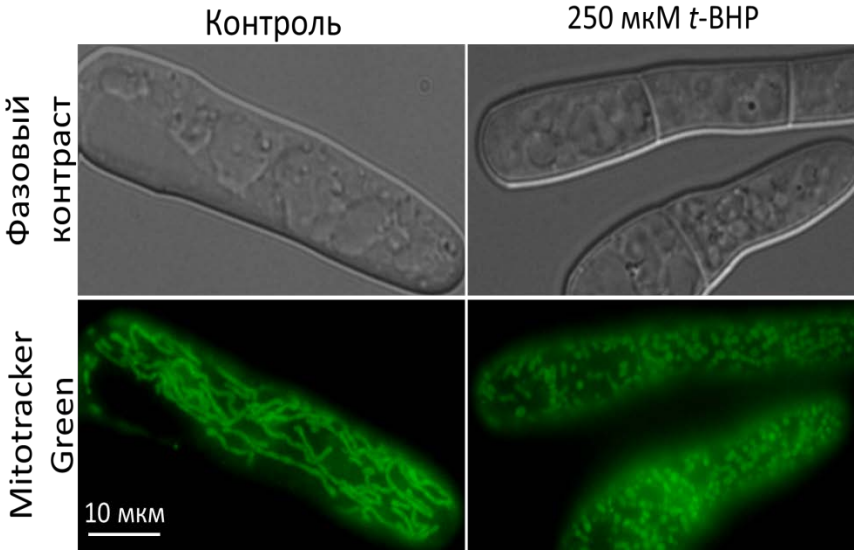


Рис. 12. Фрагментация митохондрий *D. magnusii* под действием *t*-BHP. Клетки в логарифмической фазе роста (О.П. ~ 1,0) инкубировали с 250 мкМ *t*-BHP 2 ч., затем отмыли от прооксиданта свежей порцией среды и нагружали 200 нМ Mitotracker Green.

Апоптоз дрожжей *Y. lipolytica* и *D. magnusii*, вызванный окислительным стрессом.

Окислительный стресс, вызванный относительно высокими концентрациями *t*-BHP, индуцировал в клетках *D. magnusii* клеточную смерть (Рис. 13). Поскольку клеточная смерть, сопровождалась не только повышением продукции АФК в клетках дрожжей, но и фрагментацией ДНК (Рис. 14) и конденсацией хроматина (Рис. 15), это позволяет сделать предварительный вывод о том, что клеточная смерть дрожжей проходила по механизму апоптоза.

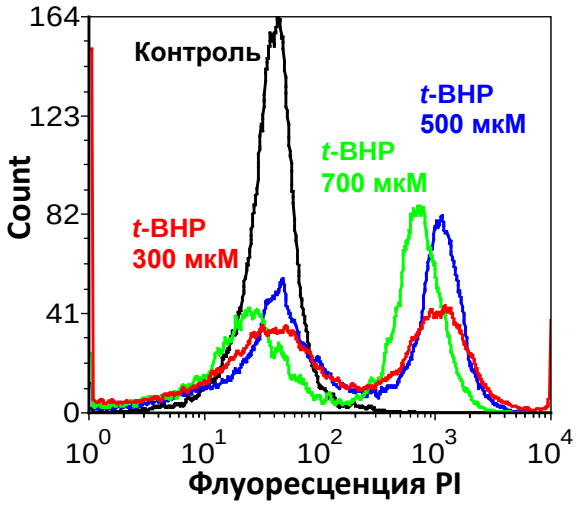


Рис. 13. *t*-BHP индуцирует клеточную смерть дрожжей *D. magnusii*. Эффект *t*-BHP является дозозависимым. Клетки выращивали до О.П. 1,0, инкубировали с разными концентрациями *t*-BHP, затем отмывали свежей порцией среды инкубации и нагружены красителем Propidium Iodide.

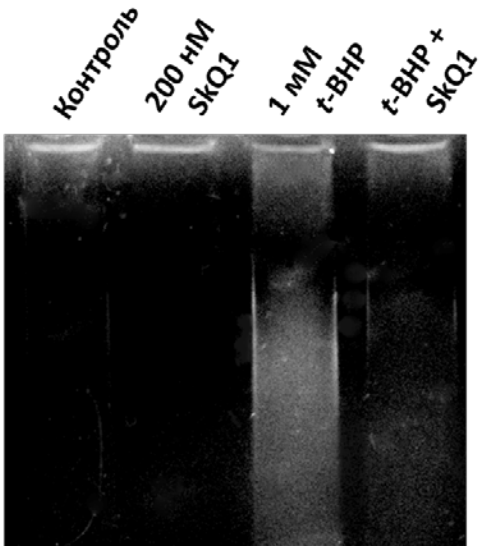


Рис. 14. *t*-BHP индуцирует фрагментацию ДНК в дрожжах *Y. lipolytica*, предотвращаемую SkQ1. Клетки *Y. lipolytica* выращивали до О.П. ~ 1, преинкубировали с 200 нМ SkQ1 в среде выращивания в течение 1 ч., отмывали свежей порцией среды выращивания, затем инкубировали с 1 мМ *t*-BHP в течение 2,5 ч., после чего выделяли геномную ДНК.

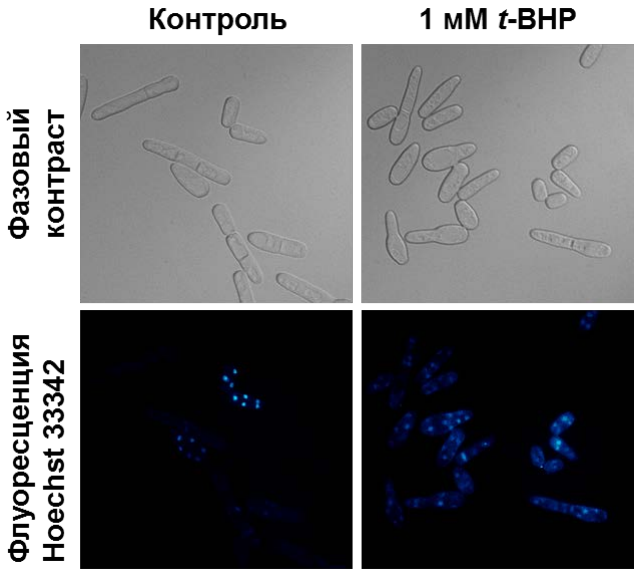


Рис. 15. Конденсация хроматина в клетках *D. magnusii* под действием окислительного стресса. Клетки *Y. lipolytica* выращивали до О.П. ~ 1, инкубировали с 1 мМ *t*-BHP, отмывали в PBS, pH 5,5 и нагружали красителем Hoechst 33342.

Взаимосвязь между фрагментацией митохондрий и апоптозом.

Была выявлена роль фрагментации митохондрий в индукции клеточной смерти. Добавление к клеткам *D. magnusii* блокатора митохондриального деления Mdivi1 приводило к существенному увеличению уровня клеточной смерти при индукции окислительного стресса (Рис. 16) Таким образом, фрагментацию митохондрий, обычно приводящую к митофагии, следует рассматривать как один из механизмов защиты клетки от окислительного стресса.

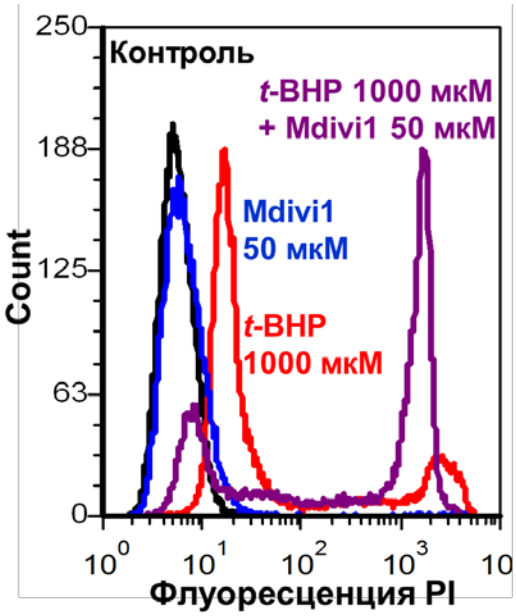


Рис. 16. Влияние ингибитора митохондриального деления Mdivi1 на уровень клеточной смерти дрожжей *D. magnusii* под действием окислительного стресса. Клетки *D. magnusii* (О.П. 1,0) преинкубировали с 50 мкМ Mdivi1 в течение 1 ч., инкубировали с 1 мМ *t*-BHP в течение 2,5 ч., отмывали от действующих веществ свежей порцией среды выращивания и инкубировали с Propidium Iodide в течение 30 мин.

Ослабление окислительного стресса, обращение фрагментации митохондрий и увеличение выживаемости клеток дрожжей под действием митохондриально-направленных антиоксидантов.

В целях предотвращения или ослабления действия окислительного стресса, вызванного прооксидантами БХ и *t*-BHP и их последствий, использовали митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ1 и SkQT1, чье действие было протестировано ранее на выделенных митохондриях. Методом проточной цитометрии показано, что оба антиоксиданта предотвращали окислительный стресс, вызванный *t*-BHP (Рис. 17).

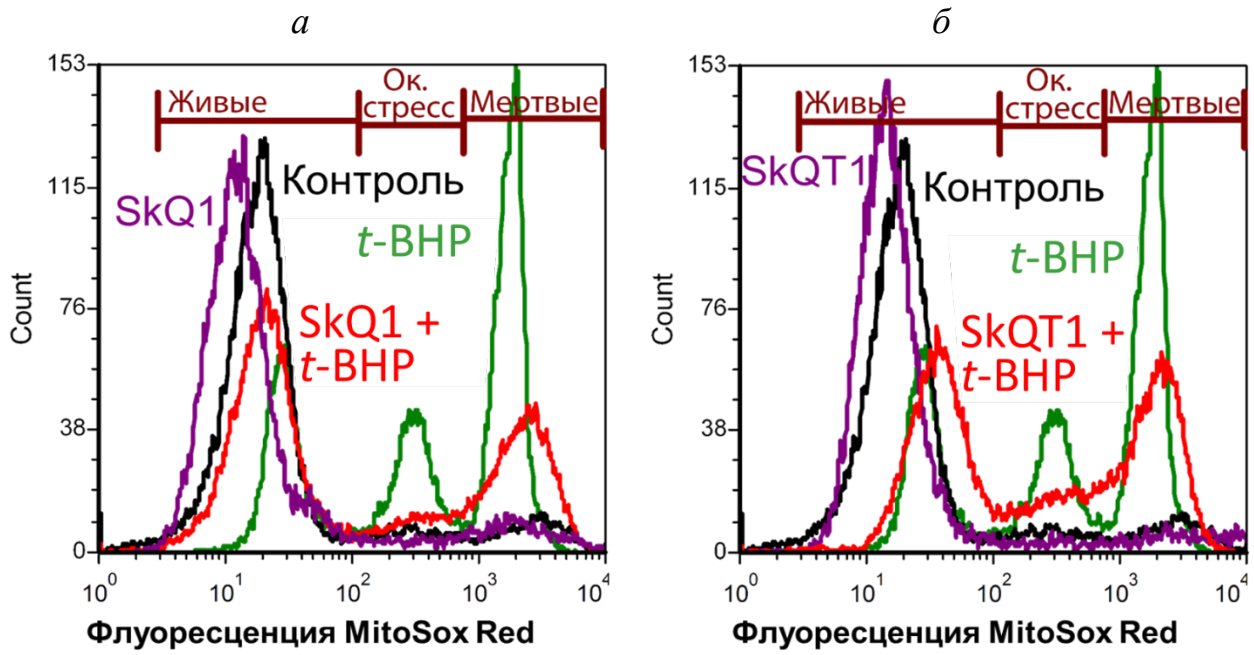


Рис. 17. Митохондриально-направленные антиоксиданты снижают окислительный стресс в клетках *Y. lipolytica*. Клетки выращивали до О.П. ~ 1, преинкубировали с 200 нМ SkQ1 (*а*) или 100 нМ SkQT1 (*б*) в течение 1 ч., отмывали свежей порцией среды выращивания, инкубировали с 300 мкМ *t*-BHP в течение 2 ч., после чего отмывали от прооксидантов и нагружали красителем MitoSox Red.

Использование митохондриально-направленных антиоксидантов не только предотвращало, но и обращало фрагментацию митохондрий (Рис. 18), предотвращало фрагментацию ДНК (Рис. 14), а также увеличивало выживаемость клеток *Y. lipolytica* при окислительном стрессе, вызывающем их 70%-ую гибель (Рис. 19). Во всех случаях SkQT1 был более эффективен, чем SkQ1, что хорошо согласуется с данными, полученными на изолированных препаратах митохондрий (см. выше).

Полученные данные показали перспективность использования дрожжей в качестве модели для изучения взаимосвязи между окислительным стрессом, дисфункцией митохондрий, фрагментацией митохондрий и апоптозом.

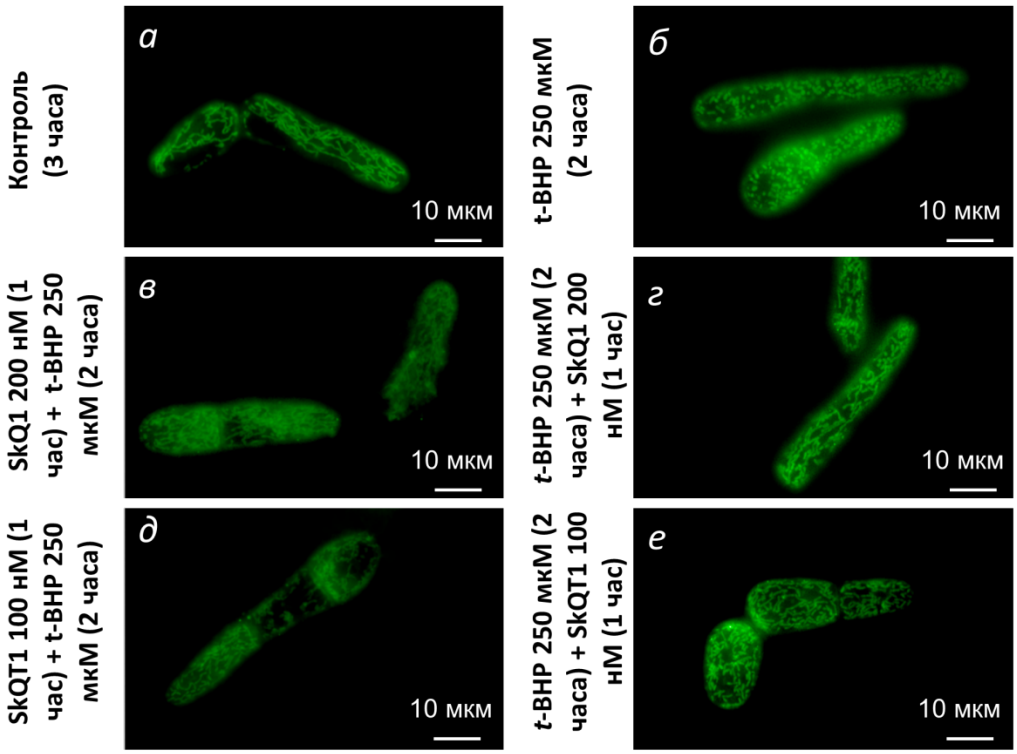


Рис. 18. SkQ1 и SkQT1 предотвращают и обращают фрагментацию митохондрий дрожжей *Dipodascus magnusii.* Клетки выращивали до О.П. ~ 1, преинкубировали с 200 нМ SkQ1 (*в*) или 100 нМ SkQT1 (*д*) в течение 1 ч., затем отмывали свежей порцией среды выращивания, инкубировали с 250 мкМ *t*-BHP в течение 2 ч, либо сначала преинкубировали с прооксидантом в течение 2 ч., затем отмывали и инкубировали с 200 нМ SkQ1 (*г*) или 100 нМ SkQT1 (*е*) в течение 1 ч. Далее клетки отмывали свежей порцией среды выращивания и нагружали красителем Mitotracker Green (200 нМ).

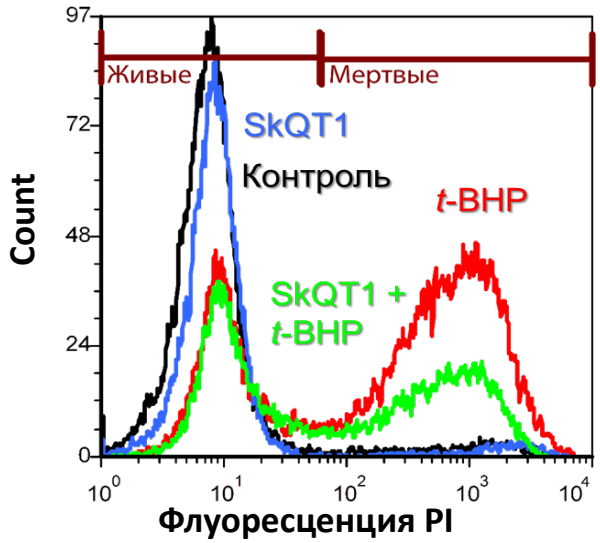


Рис. 19. Митохондриально-направленные антиоксиданты снижают клеточную смерть в клетках *Y. lipolytica*. Клетки выращивали до О.П. ~ 1, преинкубировали с 800 нМ SkQ1 или 200 нМ SkQT1 в течение 1 ч., отмывали свежей порцией среды выращивания, инкубировали с 700 мкМ *t*-BHP в течение 2 ч., после чего отмывали от прооксидантов и нагружали 1 мкМ Propidium Iodide.

ВЫВОДЫ

1. C_4R1 является наиболее эффективным из всех до сих пор исследованных катионных разобщителей, но при этом он ингибирует дыхание, промотирует открытие mPTP, ингибирует синтез, и гидролиз ATP.
2. Бензалконий хлорид в низких концентрациях снижает мембранный потенциал митохондрий печени крыс, промотирует открытие mPTP, ингибирует синтез и гидролиз ATP, стимулирует продукцию пероксида водорода митохондриями, вызывает окислительный стресс в дрожжевых клетках.
3. Митохондриально-направленные антиоксиданты SkQT1 и SkQ1 являются «мягкими» разобщителями окислительного фосфорилирования, они подавляют продукцию пероксида водорода митохондриями печени крысы, не ингибируют гидролиз ATP и снижают синтез ATP в соответствии со своим деполяризующим действием.
4. Построена модель пространственной структуры дрожжевой альтернативной оксидазы. Найдены и описаны активные центры белка.
5. Окислительный стресс вызывал фрагментацию митохондрий в клетках дрожжей *D. magnusii*, которая обращалась и предотвращалась митохондриально-направленными антиоксидантами SkQT1 и SkQ1.
6. Окислительный стресс вызывал в клетках дрожжей апоптоз, который частично обращался митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Суханова Е.И., **Рогов А.Г.**, Северин Ф.Ф., Звягильская Р.А. (2012) Феноптоз у дрожжей. Обзор. *Биохимия*, 77(7), 915-931.
2. Черняк Б.В., Антоненко Ю.Н., Галимов Е.Р., Домнина Л.В., Дугина В.Б., Звягильская Р.А., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Лямзаев К.Г., Пустовидко А.В., Рокицкая Т.И., **Рогов А.Г.**, Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев М.В., Ташлицкий В.Н., Титова Е. В., Тренделева Т.А., Шагиева Г.С. (2012) Новые митохондриально-направленные соединения, построенные из природных веществ: конъюгаты растительных алкалоидов берберина и пальматина с пластохиноном. *Биохимия*, 77(9), 1186-1200.
3. Тренделева Т.А., **Рогов А.Г.**, Черепанов Д., Суханова Е.И., Ильясова Т.М., Северина И.И., Звягильская Р.А. (2012) Взаимодействие тетрафенилфосфония и додецилтрифенилфосфония с липидными мембранами и митохондриями. *Биохимия*, 77(9), 1230-1239.
4. Trendeleva T.A., Sukhanova E.I., **Rogov A.G.**, Zvyagilskaya R.A., Seveina I.I., Ilyasova T.M., Cherepanov D.A., Skulachev V.P. (2013) Role of charge screening and delocalization for lipophilic cation permeability of model and mitochondrial membranes. *Mitochondrion*, 13(5), 500-506.
5. Litvinchuk A.V., Sokolov S.S., **Rogov A.G.**, Knorre D.A., Severin F.F. (2013) Mitochondrially-encoded protein Var1 promotes the loss of respiratory function in yeast Saccharomyces cerevisiae under stressful conditions. *Eur. J. Cell Biol.*, 92 (4), 169-174.
6. Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., Severina I.I., Simonyan R.A., Trendeleva T.A., Lyamzaev K.G., Antonenko Y.N., **Rogov A.G.**, Zvyagilskaya R.A., Skulachev V.P., Chernyak B.V. (2013) Derivatives of the cationic plant alkaloids berberine and palmatine amplify protonophorous activity of fatty acids in model membranes and mitochondria. *Mitochondrion*., 13(5), 520-525.
7. Severina I.I., Severin F.F., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V., Ilyasova T.M., Simonyan R.A., **Rogov A.G.**, Trendeleva T.A., Zvyagilskaya R.A., Dugina V.B., Domnina L.V., Fetisova E.K., Lyamzaev K.G., Vyssokikh M.Y., Chernyak B.V., Skulachev M.V., Skulachev V.P., Sadovnichii VA. (2013) In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: thymoquinone and its cationic derivatives. *FEBS Lett.*, 587(13), 2018-2024.
8. **Рогов А.Г.**, Суханова Е.И., Уральская Л.А., Аливердиева Д.А., Звягильская Р.А. (2014) Альтернативная оксидаза: распространение, индукция, свойства, структура, регуляция, функции (обзор). *Успехи биол. химии*, 54, 413-456.
9. **Рогов А.Г.**, Звягильская Р.А. (2015) Физиологическая роль митохондриальной альтернативной оксидазы (от дрожжей до растений). Обзор. *Биохимия*, 80(4), 472-479.

Материалы конференций:

1. **Рогов А.Г.**, Суханова Е.И. (2012) Альтернативная оксидаза дрожжей. Труды 3-го Съезда Микологов России, с. 97-98, Москва, 10-12 октября 2012 г.
2. Litvinchuk A.V., Sokolov S.S., **Rogov A.G.**, Markova O.V., Knorre D.A., Severin F.F. (2013) Mitochondrially-encoded protein Var1 promotes loss of respiratory function in *Saccharomyces cerevisiae* under stressful conditions. FEBS J., 280, p. 263, Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.
3. **Rogov A.G.**, Zvyagilskaya R.A. (2013) Effect of butylrhodamine and dodecylrhodamine on animal mitochondria. FEBS J., 280, p. 263, Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.
4. **Рогов А.Г.**, Тренделева Т.А. (2014) Действие хлорида бензалкония на митохондрии животных. XXVI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», с. 21, Москва, 10-14 февраля 2014 г.
5. Тренделева Т.А., **Рогов А.Г.** (2014) Митохондриально-направленное производное тимохинона как новый многообещающий липофильный антиоксидант. XXVI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», с. 148, Москва, 10-14 февраля 2014 г.
6. **Рогов А.Г.**, Суханова Е.И., Звягильская Р.А. (2014) Структура и функциональные особенности альтернативной оксидазы дрожжей. Труды Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института биоорганической химии им. Академиков Ю.А.Овчинникова и М.М.Шемякина РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова, с. 43, Москва, 15-19 сентября 2014 г.
7. **Rogov A.G.**, Zvyagilskaya R.A. (2014) Mitochondrial alternative oxidase: origin and evolution. International Conference “The Problem of the origin of life” and Youth Scientific School “Molecular and cellular basis of the early evolution of Life”, pp. 55-56, Москва, 22-26 сентября 2014 г.
8. **Rogov A.G.**, Zvyagilskaya R.A. (2014) Benzalkonium chloride: effects on bioenergetics of rat liver mitochondria. Abstract book and program of the International Conference of young scientists “Mitochondrial pores and channels as pharmacological targets”, pp. 31-32. Пущино-на Оке, 29-30 октября 2014 г.

Работа поддержана РФФИ (гранты №№ 09-04-01238, 12-04-31970, 13-04-01530), РНФ (грант № 14-24-00107), Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», контрактом с ООО «Митотехнология».