

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ
имени М.В. Ломоносова
Отдел молекулярной энергетики микроорганизмов
Лаборатория фотохимии биомембран

Московская гимназия на Юго-Западе №1543 имени народного учителя
Российской Федерации Ю.В. Завельского

**Динамика изменений содержания
митохондриальных белков Tom70 и Idh1 в
условиях нарушения функции митохондрий
протонофорами**

Владимир Гладун

Иван Моржаков

Научные руководители:

Д.А. Кнорре

К.В. Галкина

Е.Д. Сурикова

Москва 2025

Оглавление

Оглавление	2
Введение	3
Цели и задачи	5
Обзор литературы	6
Дрожжи как модельный объект	6
Митохондрии, строение и функции	7
Функции митохондрий	7
Мембранный потенциал и дыхательная цепь	8
Обзор системы митохондриального импорта	9
Импорт Tom70 во внешнюю мембрану	11
Импорт Idh1 в матрикс	12
Материалы и методы	13
Условия культивирования <i>S. cerevisiae</i>	13
Штаммы <i>S. cerevisiae</i>	13
Используемые плазмиды	14
Амплификация флуоресцентных конструкций	15
Электрофорез в агарозном геле	17
Трансформация <i>S. cerevisiae</i> с использованием 0,1 М LiAc-буфера	18
Инкубация с PCR и R6G	19
Эффекты PCR на митохондрии	19
Эффекты R6G на митохондрии	19
Условия инкубации	19
Наблюдение и анализ флуоресценции	20
Анализ выживаемости клеток	21
Получение кривых роста <i>S. cerevisiae</i>	22
Результаты и обсуждение	23
Полученные штаммы	23
Анализ роста штаммов	25
Анализ относительного содержания Tom70 и Idh1 при добавлении разобщителя PCR	26
Подтверждение снижения мембранного потенциала митохондрий при добавлении PCR	31
Анализ выживаемости штаммов	36
Выводы	39
Благодарности	40
Список литературы	41
Приложения	44
	2

Введение

Гены большинства митохондриальных белков находятся в ядре эукариотической клетки, их транскрипция и последующая трансляция происходит вне митохондрий. В цитоплазме синтезируются предшественники митохондриальных белков, их импорт в митохондрии и распределение по компартментам осуществляются несколькими путями. Большинство белков матрикса и внутренней мембраны митохондрий импортирует TIM/TOM комплекс. TIM-комплексы (TIM23 и TIM22) осуществляют импорт во внутренней митохондриальной мембране. TIM23-комплекс переносит через мембрану или встраивает в нее белки-предшественники, имеющие внешний сигнал митохондриальный локализации (чаще всего он находится на N-конце, длиной 10-100 нуклеотидов, обеспечивает импорт в матрикс), отщепляемый в результате импорта. TIM22-комплекс встраивает в мембрану белки-предшественники, обладающие находящимся внутренним сигналом локализации (аминокислотными мотивами внутри цепи белка). TOM-комплекс переносит белки-предшественники через внешнюю мембрану митохондрий и транспортирует не только предшественники митохондриальных белков с внешним отщепляемым сигналом локализации, но и белки-предшественники с внутренним гидрофобным сигналом локализации [1].

Транслокация белков-предшественников через внутреннюю митохондриальную мембрану, в отличие от незаряженной внешней, требует наличия мембранного потенциала, активирующего TIM22 и TIM23 комплексы посредством конформационных изменений, а также оказывающего электрофоретическое воздействие на положительно заряженный N-конец белка-предшественника, облегчая транслокацию [2]. Дисфункция белкового импорта в митохондриях связана с нейродегенеративными и сердечно-сосудистыми заболеваниями, миопатией [3], а также болезнью Паркинсона [4], поэтому исследования митохондриального импорта весьма важны.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen, 1883) являются распространенным эукариотическим модельным объектом в молекулярной биологии из-за большой скорости роста, существования как гаплоидных, так и диплоидных стабильных штаммов и наличия легкой в использовании системы трансформации, что делает возможной модификацию их генома [5].

Цель нашей работы – оценить относительную эффективность белкового импорта во внешней и во внутренней митохондриальных мембранах в различных условиях. Для этого мы получили штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащие в геноме две

флуоресцентные конструкции: к распространенному белку матрикса митохондрий Idh1 и к распространенному белку внешней митохондриальной мембраны Tom70 присоединены зеленый флуоресцентный белок GFP и красный флуоресцентный белок RFP. Мы определили уровень флуоресценции каждого белка и структуру митохондриальной сети в разных условиях. Поскольку модификации клеточных белков могут повлиять на процессы, в которые те вовлечены, мы также оценили степень влияния, исследовав скорости роста полученных штаммов на субстратах с несбраживаемым источником углерода, рост на которых требует от дрожжей функционального дыхания.

Цели и задачи

Целью нашей работы является изучение динамики изменений содержания белка внешней мембраны митохондрий Tom70 и белка митохондриального матрикса Idh1 в условиях нарушения функции митохондрий протонофором.

Для достижения цели работы был поставлен ряд задач:

1. Оценить влияние тегирования белков Tom70 и Idh1 флуоресцентными белками на рост культуры дрожжей в средах со сбраживаемым и несбраживаемым источником углерода.
2. Определить влияние разобщения дыхания и фосфорилирования в клетках дрожжей протонофором на соотношение содержания белков Tom70 и Idh1 в митохондриях.
3. Выбор наиболее подходящего белка для использования в экспериментах по оценке структуры и функций митохондрий в качестве маркерного митохондриального белка.

Обзор литературы

Дрожжи как модельный объект

S. cerevisiae часто используются в качестве модельных объектов. Это объясняется многими факторами. Их культивация для эукариотических клеток относительно проста, они не опасны для человека со здоровым иммунитетом. Дрожжи доступны в больших количествах. При делении их клеток они располагаются не чересчур близко друг к другу. Высокая скорость деления позволяет быстро получать крупные, пригодные для дальнейших манипуляций колонии. Маленькое время смены поколений облегчает процедуры модификации генома. У дрожжей хорошо изучен геном. У них активна система гомологической рекомбинации, это упрощает редактирование их генома [6]. Они факультативные анаэробы, способные снабжать себя гликолизом. Это позволяет получать штаммы с нарушениями в митохондриях и таким образом исследовать гены, отвечающие за их правильную работу [5].

Дрожжи способны вегетативно размножаться как в гаплоидном, так и в диплоидном состоянии. Гаплоидные клетки удобны в трансформациях или при нокаутах определенных генов (значительно увеличивается шанс получения нового штамма, если нужно изменить ген один раз, а не два). Гаплоидные клетки у *S. cerevisiae* имеют тип спаривания, а или α . В норме существует система спонтанного перехода клеток из одного типа спаривания в другой, однако у большего числа лабораторных штаммов эта функция отключена. Без этого невозможно было бы содержать в культуре гаплоидные клетки, они бы спонтанно превращались в диплоидные.

Во многих лабораторных штаммах дрожжей (например, W303, см. раздел “Материалы и методы”, подраздел “Штаммы *S. cerevisiae*”) отключены гены синтеза аденина, а также таких аминокислот, как урацил, лейцин, гистидин, триптофан. Эта ауксотрофность облегчает отбор при трансформациях, т.к. вместе с интересующим геном можно также поместить ген синтеза определенной аминокислоты, а затем культивировать на среде, где её нет. У многих штаммов отключены гены флокулинов, отвечающие за адгезию клеток [7]. Поэтому эти штаммы не могут формировать больших агрегатов, которые мешали бы работе с ними.

Митохондрии, строение и функции

Митохондрии – органеллы, находящиеся в подавляющем большинстве эукариотических клеток. Это остатки древнего α -протеобактериотического симбионта, геном которого был частично утерян или перемещён в ядро в течение эволюции. Митохондрия состоит из двух мембран: внешней и внутренней, окружающих два компартмента: межмембранное пространство и митохондриальный матрикс [1]. В клетках дрожжей они образуют сеть [8].

Функции митохондрий

Митохондрии играют важную роль в биоэнергетике, метаболизме и передаче сигнала внутри клетки. Главная их функция – клеточное дыхание. С помощью метаболических путей, в основном происходящих в матриксе и связанных с циклом трикарбоновых кислот, а также метаболизмом аминокислот, жиров и нуклеотидов, метаболиты способны отдавать электроны, которые идут в электрон-транспортную цепь, создающую электрохимический потенциал путем выкачивания протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. Протонный градиент используется АТФ-синтазой для синтеза АТФ, а также для транспортировки низкомолекулярных метаболитов и белков через внутреннюю мембрану митохондрии [8].

Также важной для жизнеспособности клетки функцией митохондрий является создание Fe-S кластеров. Они служат кофакторами и участвуют во многих важных процессах эукариотических клеток, например, служат каталитическими центрами или переносчиками электронов. У дрожжей митохондрии участвуют также и в сборке цитоплазматических и ядерных белков, содержащих в себе Fe-S кластеры. Без их синтеза не будут работать многие цитоплазматические белки, включая Rli1, необходимый для сборки цитоплазматических рибосом [8].

Митохондрии играют важную роль в синтезе аминокислот. В самой митохондрии из ацетил-CoA синтезируется орнитин, из которого в цитоплазме образуется аргинин. Пируват в митохондриях может перерабатываться до изойлейцина и валина [8].

В митохондриальном матриксе также содержится полная генетическая система, включающая в себя митохондриальный геном, множество факторов, важных для его регуляции, а также митохондриальные рибосомы, отличающиеся от рибосом клетки размером и строением. Белки, закодированные в митохондриальном геноме, помещаются во внутреннюю мембрану при помощи Oxa1 и Mba1 (см. подраздел “Мембранный потенциал и дыхательная цепь”) [9].

Межмембранное пространство митохондрий также имеет несколько функций. Через него импортируются белки, экспортируются аминокислоты и Fe-S кластеры, там происходит фолдинг части белков. В межмембранном пространстве есть протеазы, некоторые из которых (такие как i-AAA1) закреплены во внутренней мембране и имеют активные центры, выходящие в межмембранное пространство. Здесь же расположены ферменты, синтезирующие гем и фосфорилирующие креатин. В межмембранном пространстве расположены факторы, переносящие металлы в матрикс и внутреннюю мембрану. Некоторые липиды синтезируются во внутренней мембране и затем переносятся во внешнюю. В межмембранном пространстве находятся белки, контролирующие баланс липидов в обеих мембранах. Активные формы кислорода, выделяемые комплексами I и III, присутствуют в межмембранном пространстве, поэтому там существует буфер окисляемого глутатиона [10].

Мембранный потенциал и дыхательная цепь

Мембранный потенциал создается в результате окислительно-восстановительных преобразований, происходящих в ходе цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса). Комплексы III и IV перекачивают протоны из матрикса в межмембранное пространство [11].

Окисление глюкозы начинается с гликолиза в цитоплазме, в результате которого получаются 2 молекулы NADH, 2 молекулы АТФ и 2 молекулы пирувата. Далее пируват переносится в митохондрию, где его ацетильные группы переносятся на КоА пируватдегидрогеназой с образованием 2 NADH. Ацетильные группы с 2 ацетил-КоА переносятся на оксалоацетат и таким образом входят в цикл трикарбоновых кислот, где они окисляются до CO_2 и воды. При этом выделяется 6 NADH и 2 ГТФ. У млекопитающих полученные молекулы NADH окисляются комплексом I. Однако у дрожжей этого комплекса нет, его функции осуществляют 3 фермента: NADH дегидрогеназа (Ndi1p) на внутренней стороне внутренней мембраны и две NADH дегидрогеназы (Nde1p и Nde2p) на внешней стороне. Также функции комплекса I выполняет глицерол-3-фосфат дегидрогеназа [12]. Сукцинат, образующийся в цикле трикарбоновых кислот, окисляется комплексом II соответственно. Они передают электроны на убихинон (UQ, ubiquinone), превращая его в убихинол (UQH_2 , ubiquinol), который по внутренней мембране диффундирует к комплексу III и передаёт ему электроны. Комплекс III окисляет находящийся во внутренней мембране цитохром c (cytochrome c), находящийся в межмембранном пространстве, и перекачивает 4 протона. Цитохром c передает свои электроны комплексу IV, который перекачивает 2 протона и

окисляет кислород до воды. Эти протоны затем проходят через АТФ-синтазу (комплекс V) обратно в матрикс, при этом она из АДФ синтезирует АТФ [11]. Комплексы III и IV могут образовывать суперкомплекс, а АТФ-синтаза может встречаться в димерном состоянии [12].

При перекачке протонов создается не только градиент протонов, но и электрический заряд [13]. Мембранный потенциал используется не только для синтеза АТФ. За счет него происходит импорт катионов, в основном Ca^{2+} , регулятора митохондриального дыхания, и Fe^{2+} , необходимого для синтеза Fe-S кластеров. Катионы также могут переноситься системами антипорта с анионными субстратами митохондриального дыхания [13]. Мембранный потенциал требуется для переноса белков через внутреннюю мембрану (см. подраздел “Обзор системы митохондриального импорта”).

Поддерживаться мембранный потенциал может также при помощи переносчика аденин-нуклеотидов (ANT, Adenine Nucleotide Transporter). Он может обменивать АТФ, имеющий заряд 4-, на АДФ, имеющий заряд 3-. Этот дисбаланс заряда компенсируется увеличением мембранного потенциала [13].

Если дыхательная цепь не может произвести достаточный потенциал, то АТФ-синтаза начинает работать в обратную сторону, потребляя АТФ и перекачивая протоны. Чтобы предотвратить это, существует фактор ингибирования АТФазы (IF1, ATPase Inhibitory Factor 1) [13].

Обзор системы митохондриального импорта

Почти все гены белков митохондрий находятся в ядре и синтезируются в цитоплазме. Поэтому система их импорта в разные компартменты и мембраны митохондрий имеет огромное значение, являясь ключевой для их правильного функционирования. Существует несколько путей митохондриального импорта [1].

Первый, наиболее распространенный, путь – импорт белков в матрикс (presequence pathway). Он осуществляется при наличии у белка сигнала митохондриальной локализации на их N-концах. Сначала белок захватывается транслоказой внешней мембраны (ТОМ-комплексом, Translocase of the Outer Membrane) и переносится через внешнюю мембрану. Это происходит вне зависимости от потенциала на внутренней мембране. Затем белок передается каналу, транслоказе внутренней мембраны, нацеленной на сигнал митохондриальной локализации на N-конце белка (TIM23-комплексу, presequence Translocase of the Inner Membrane). Ассоциированный с транслоказой мотор (РАМ, Presequence translocase-Associated Motor) осуществляет импорт белка в матрикс, где сигнал митохондриальной локализации на N-конце белка отрезается

митохондриальной процессинговой пептидазой (MPP, mitochondrial processing peptidase) [1]. На Рисунке 1.1 обозначен “белки с сигналом матричной локализации”.

Все белки, попадающие в митохондрию следующими путями импорта, не имеют отщепляемого сигнала митохондриальной локализации на N-конце белка, однако имеют разные сигналы внутри цепи. Почти все они проходят через ТОМ-комплекс [1].

Второй путь – импорт белков внутренней мембраны, имеющих одну или несколько гидрофобных цепей. Это, в том числе, переносчики метаболитов (metabolite carriers) Они переносятся через внешнюю мембрану ТОМ-комплексом. Далее, соединённые с шаперонами ТІМ-комплекса (Tim9 и Tim10), они помещаются в мембрану транслоказой внутренней мембраны (TIM22, carrier Translocase of the Inner Membrane) [1]. На Рисунке 1.1 обозначен “переносчики метаболитов”.

Третий путь – импорт β -бочек во внешнюю мембрану. Они также используют ТОМ-комплекс и шапероны ТІМ-комплекса, однако помещаются во внешнюю мембрану системой сортировки и сборки белков (SAM, Sorting and Assembly Machinery) [1]. На Рисунке 1.1 обозначен “белки с β -бочками”.

Четвертый путь – импорт белков межмембранного пространства, содержащие в себе цистеиновые мотивы (характеризуемые обилием дисульфидных связей). Они импортируются через ТОМ-комплекс и систему митохондриального импорта и сборки (MIA, Mitochondrial Import and Assembly) [1]. На Рисунке 1.1 обозначен “белки с цистеиновыми мотивами”.

Пятый путь – импорт белков внешней мембраны с α -спиральными трансмембранными сегментами. Комплекс митохондриального импорта (MIM, Mitochondrial IMport complex) способен без участия ТОМ-комплекса перемещать во внешнюю мембрану митохондрии белки, закрепленные в ней одной или несколькими α -спиралями [1]. На Рисунке 1.1 обозначен “белки с α -спиралями”.

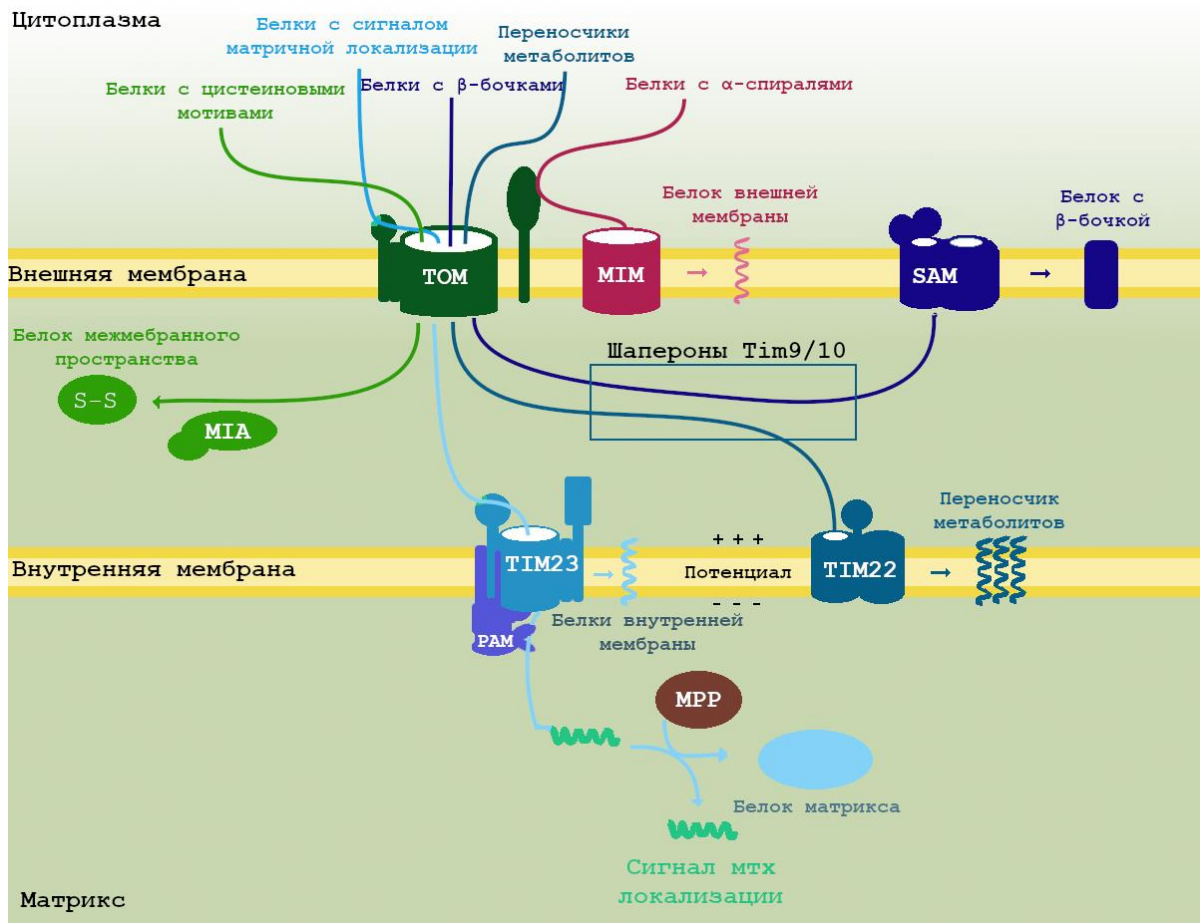


Рисунок 1.1. Основные механизмы импорта белков в митохондрию. Сделано на основе [1].

Стоит также упомянуть о транслоказе оксидазного комплекса (ОХА, OXidase Assembly translocase). Она выполняет несколько функций. Во-первых, ОХА вместе с Mba1 и множеством других белков производит импорт белков, синтезированных в митохондрии, во внутреннюю мембрану. Во-вторых, она отвечает за так называемую консервативную сортировку (conservative sorting, названа так из-за того что этот механизм схож с одним из механизмов транслокации у прокариот) белков во внутреннюю мембрану. Такие белки импортируются через ТОМ-комплекс и TIM23 в матрикс, затем переносятся во внутреннюю мембрану. Чаще всего таким механизмом пользуются белки с большим количеством трансмембранных последовательностей. Первая из них переносится в мембрану TIM23-комплексом (она находится на конце белка, и на ней импорт в матрикс останавливается, она переносится в мембрану), а остальные – консервативной сортировкой [1].

Импорт Tom70 во внешнюю мембрану

Tom70 – один из рецепторов комплекса импорта, находящегося во внешней мембране (ТОМ – Translocase of the Outer Membrane). Он слабо прикреплен к ТОМ-комплексу. Tom70 связывает как шапероны, так и

белок, импортируемый в митохондрий, и передает его центральному рецептору Tom22. Тот, в свою очередь, помещает белок в Tom40 – белок-канал. [1].

Сам Tom70 импортируется во внешнюю мембрану митохондрии, где он закреплен одной α -спиралью на N-конце, при помощи Mim1, но без участия TOM-комплекса [14]. Таким образом, импорт Tom70 не требует потенциала.

Импорт Idh1 в матрикс

Idh1 (Idp1) – NAD^+ -зависимая изоцитратдегидрогеназа, находящаяся у дрожжей в матриксе митохондрий. Она участвует в цикле трикарбоновых кислот [15]. Этот белок имеет сигнал митохондриальной локализации, находящийся на N-конце [16]. Он транспортируется сначала через внешнюю мембрану при помощи TOM-комплекса, затем через внутреннюю через белок-канал Tim23. Потенциал на внутренней мембране активирует Tim23, поэтому его присутствие необходимо для правильного транспорта [1]. Также для этого необходим АТФ, т.к. он потребляется РАМ.

Мы выбрали именно эти белки, потому что Tom70 не требует потенциала для импорта в митохондрию, а Idh1 требует. Поэтому при разобщении митохондрий импорт Tom70 не должен нарушиться, а Idh1 – наоборот.

Материалы и методы

Условия культивирования *S. cerevisiae*

Дрожжи *S. cerevisiae* выращивали на средах, состав которых приведен в таблице 2.1. Для получения твердых сред к составам добавляли 2% агара. Стерилизация производилась в автоклаве при 0.5-1 атм в течение 60 мин. Выращивание производили при 30°C или при комнатной температуре.

Таблица 2.1. Состав дрожжевых сред.

Название среды	Состав
YPD	2% бактопептон, 2% глюкоза, 1% дрожжевой экстракт
YPD -HIS	0,66% YNB без аминокислот с набором аминокислот без гистидина 1,92 г/л, 2% глюкозы
YPD -URA	0,66% YNB без аминокислот с набором аминокислот без урацила 1,9 г/л, 2% глюкозы
YPGly	20 мл 50% глицерина на 450 мл дрожжевого экстракта

Штаммы *S. cerevisiae*

Использованные в работе штаммы приведены в таблице ниже.

Таблица 2.2. Использованные штаммы *S. cerevisiae*.

w303	<i>ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+ MATa</i>
IDH1-GFP	<i>ade2-101 his3-11 TRP ura3-52 can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+ MATa</i>

Используемые плазмиды

Как источник последовательности генов флуоресцентных белков мы использовали две плазмиды, для получения красного флуоресцентного белка (RFP) – p1079(tagGFP-tagRFP), для зеленого флуоресцентного белка (GFP) – pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6.

Аmplицированная область плазмиды p1079(tagGFP-tagRFP) (Рисунок 2.1) между праймерами содержит RFP и терминатор ADH1, а также последовательность гена биосинтеза урацила под TEF-промотором и терминатором, на которые мы заменили стоп-кодон гена интереса впоследствии. Ген биосинтеза урацила компенсирует ауксотрофность штамма дрожжей, трансформированного его последовательностью, что позволяет производить отбор клонов, успешно прошедших трансформацию, по способности их расти на средах без урацила.

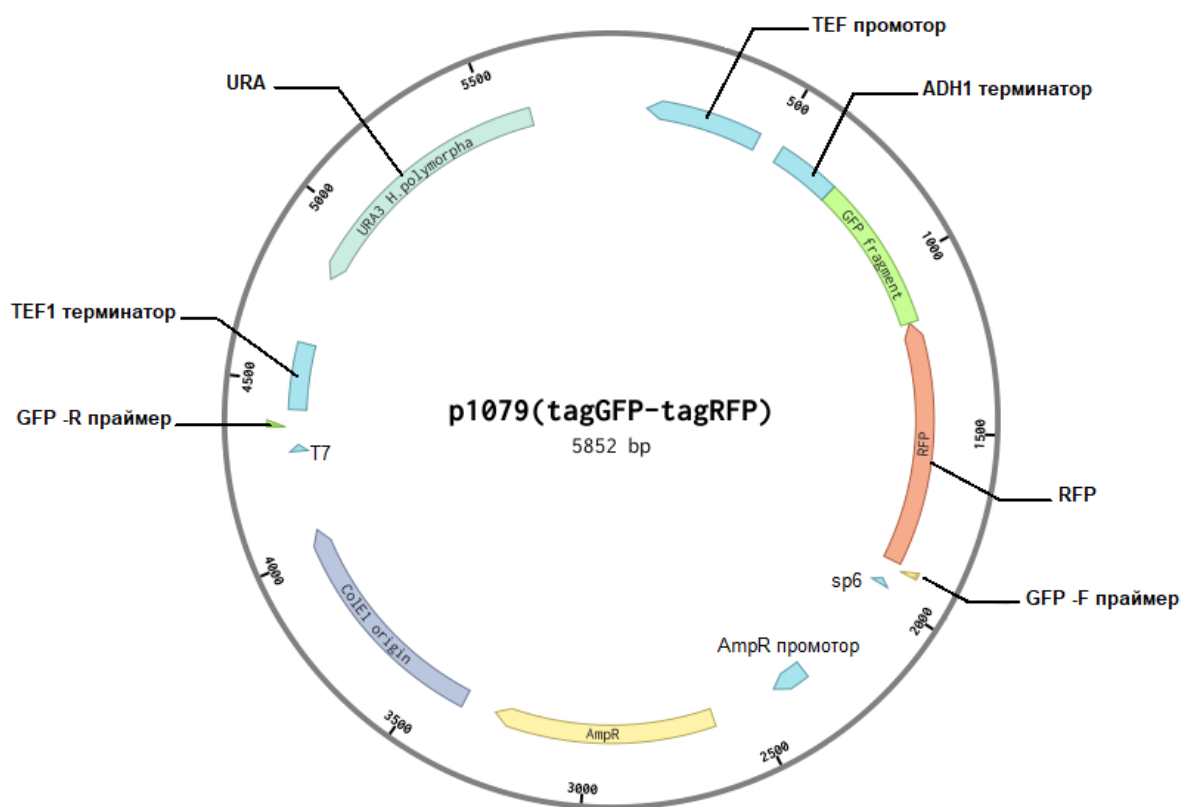


Рисунок 2.1. Карта плазмиды p1079(tagGFP-tagRFP).

Аmplицированная область плазмиды pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6 между праймерами содержит GFP и терминатор ADH1, а также последовательность гена биосинтеза гистидина под TEF-промотором и терминатором, на которые мы заменили стоп-кодон гена интереса впоследствии. Ген биосинтеза гистидина выполняет роль аналогичную роли гена биосинтеза урацила в вышеприведенной плазмиде.

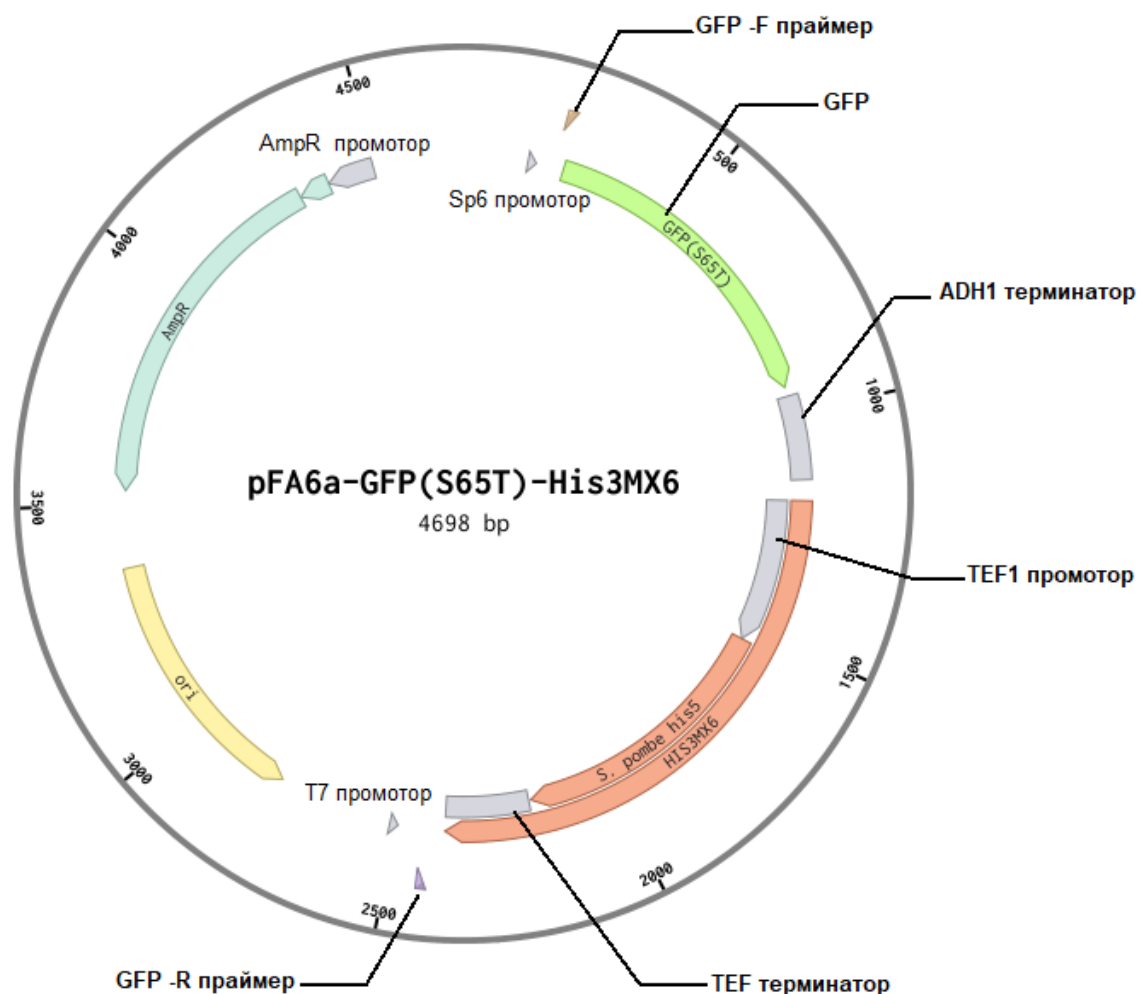


Рисунок 2.2. Карта плазмиды pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6.

Амплификация флуоресцентных конструкций

Для получения штаммов, где к белками интереса на их С-конце присоединен флуоресцентный тег, нам необходимо было амплифицировать кодирующие последовательности красного и зеленого флуоресцентных белков (RFP и GFP соответственно) совместно с участками генома, кодирующими С-конец белка, а также области генома непосредственно после гена белка интереса.

Для амплификации посредством ПЦР были написаны праймеры, приведенные в таблице ниже. Прямые праймеры содержат 50-нуклеотидную область до стоп-кодона гена интереса и 20-нуклеотидный участок, кодирующий N-конец флуоресцентного белка, обратные праймеры – 50-нуклеотидную область после стоп-кодона гена интереса и 20-нуклеотидный участок, кодирующий С-конец флуоресцентного белка. 20-нуклеотидные участки предназначены для отжига на плазмиды, содержащие полные последовательности, кодирующие флуоресцентные

белки, в процессе ПЦР и идентичны для обеих плазмид, используемых в данной работе. 50-нуклеотидные участки необходимы для встраивания амплифицированной последовательности, кодирующей флуоресцентные белки, после последовательности гена посредством гомологичной рекомбинации в процессе трансформации (см. раздел “Материалы и Методы”, подраздел “Трансформация *S. cerevisiae* с использованием 0,1 M LiAc-буфера”). Мы использовали сайт <https://www.yeastgenome.org> в качестве источника нуклеотидных последовательностей и <https://www.benchling.com> для их обработки.

Таблица 2.3. Праймеры для амплификации последовательности флуоресцентных белков и вставки после генов интереса. Заглавными буквами выделены последовательности для амплификации последовательности флуоресцентных белков с плазмид.

Название праймера	Последовательность праймера
Tom70-GFP -F	ctaaaaagattcaagaaacttagctaaattacggaacagggtttaatgCGGATCC CCGGGTAAATTA
Tom70-GFP -R	ttacttagttttgtcttctcctaaaagttttaagtttatgttactgtGAATTCGAGCT CGTTTAAAC
Idh1-GFP -F	cttctactactgacttcacgaatgaaatcatcaacaaattatctaccatgCGGATCCC CGGGTTAAATTA
Idh1-GFP -R	gtttatatataattatagataagaatttgaacacacttaagttgcagaacGAATTCGA GCTCGTTTAAAC

*заглавными буквами обозначена последовательность для амплификации GFP/RFP, строчными обозначены гомологичные участки тем, которые есть в геноме для гомологичной рекомбинации.

Праймеры были использованы в приготовлении смеси для полимеразной цепной реакции, состав в приведен в таблице ниже. Была использована полимеразная смесь Encyclo и сопутствующие реактивы компании “Евроген”.

Таблица 2.4. Составы проб для ПЦР.

Праймеры	2.5 мкл
Матрица	0.5 мкл
Вода	18.75 мкл
Буфер	2.5 мкл
Нуклеотиды	0.25 мкл
Полимераза (Encyclo)	0.5 мкл

Мы приготовили четыре пробы со смесью реактивов ПЦР, различающиеся парами праймеров и матрицей в зависимости от получаемого продукта реакции, что отражено в таблице ниже.

Таблица 2.5. Полученные пробы.

Проба	Пара праймеров	Матрица (название плазмиды)
Idh1-GFP	Idh1-GFP -F Idh1-GFP -R	pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6
Idh1-RFP	Idh1-GFP -F Idh1-GFP -R	p1079(tagGFP-tagRFP)
Tom70-GFP	Tom70-GFP -F Tom70-GFP -R	pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6
Tom70-RFP	Tom70-GFP -F Tom70-GFP -R	p1079(tagGFP-tagRFP)

ПЦР проводили по следующей программе:

1. “Hot-start” 94°C на 5:00 мин;
2. Цикл, 34 повторений:
 - a. 94°C на 0:30 мин (денатурация);
 - b. 55°C на 0:30 мин (отжиг праймеров);
 - c. 72°C на 5:30 мин (элонгация);
3. 72°C на 10:00 мин (финальная элонгация).

Электрофорез в агарозном геле

Мы использовали электрофорез для проверки того, как прошел ПЦР (в процессе амплификации флуоресцентных конструкций), а также для оценки концентрации ранее полученной плазмиды.

Готовили 1% агарозный гель (0,6 г агарозы (Amresco) на 60 мл буфера) с добавлением 3 мкл бромистого этидия (EtBr 0,1 мг/мл, Amresco) в 1х буфере ТАЕ (40 mM Трис-ацетат pH 7.6, 1mM ЭДТА). Электрофорез продуктов ПЦР осуществлялся с помощью источника питания Эльф-4 и камеры для горизонтального электрофореза Helicon в течение 20-30 мин при напряженности электрического поля 120 В. Использовались маркеры GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) и бромистый этидий в качестве интеркалирующего красителя, анализ осуществлялся с помощью трансиллюминатора GelDoc-It Imaging System.

Трансформация *S. cerevisiae* с использованием 0,1 М LiAc-буфера

Перед трансформацией клетки освежали в ночь на твердой среде YPD. Подготовка литий-ацетатного (LiAc) буфера.

Таблица 2.5. Состав LiAc буфера.

	Вода (дистиллированная, стерильная)	Tris-HCl	EDTA
Количество реагента	1116 мкл	12 мкл	12 мкл

Далее клетки суспендировали в 200 мкл свежего LiAc буфера (Таблица 2.5) и инкубировали 15 мин при 30°C в термостате. Затем суспензию клеток осаждали при 3000 rpm 3 минуты в центрифуге, отбирали буфер и ресуспендировали в 70 мкл LiAc буфера, затем инкубировали 15 мин при 30°C в термостате. После этого мы добавляли 4 мкл ДНК-носителя (сперма лосося), 40 мкл ПЦР-продукта (см. раздел “Материалы и методы”, подраздел “Аmplification флуоресцентных конструкций”) и 120 мкл 50% ПЭГ-4000, вручную перемешивали и инкубировали 30 мин при 30°C. ПЦР продукт перед этим не очищали. Далее инкубировали 15 минут при 42°C на водяной бане. После этого суспензию помещали на селективную чашку Петри (без гистидина или урацила, в зависимости от амплифицированного фрагмента ДНК). Чашку оставляли в термостате при 30°C на двое суток.

В результате трансформации происходила гомологичная рекомбинация геномного участка и амплифицированного полимеразной цепной реакцией фрагмента, что привело к замене стоп-кодона гена интереса на ген флуоресцентного белка и маркерный ген биосинтеза (Рисунок 2.3). Клоны с успешной трансформацией получали способность к росту на селективной среде, на которую была высажена суспензия трансформации.

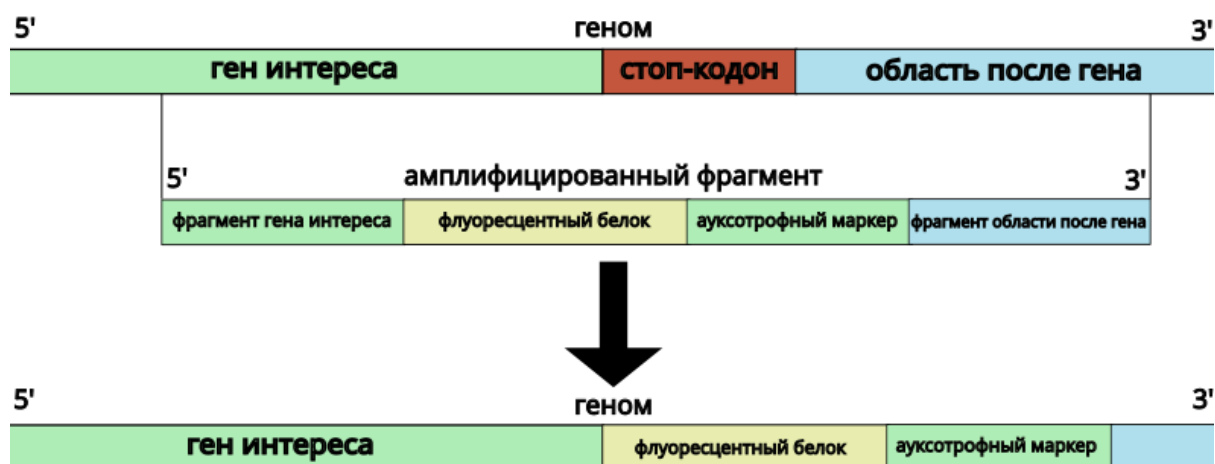


Рисунок 2.3. Схема гомологичной рекомбинации геномного участка и амплифицированного фрагмента.

Инкубация с РСР и R6G

Мы использовали РСР (1,2,3,4,5-пентахлорфенол) в качестве разобщителя митохондрий.

Эффекты РСР на митохондрии

РСР является разобщителем дыхательной цепи митохондрий. Он способен диффундировать через мембрану и переносить протоны по градиенту концентрации. Это значительно снижает синтез АТФ, т.к. АТФ-синтаза нуждается в этом градиенте. Продолженный контакт с РСР может приводить к образованию активных форм кислорода, повреждающих митохондрии. Вещества, образованные при расщеплении РСР также могут приводить к окислительным повреждениям ДНК и даже апоптозу [17].

Эффекты R6G на митохондрии

R6G – флуоресцирующий в красном спектре краситель, светящийся ярче при большем мембранном потенциале [18]. Мы использовали его для проверки того, меняется ли потенциал на внутренней мембране митохондрии при добавлении РСР. Таким образом, если при добавлении РСР потенциал падает, то яркость свечения R6G тоже падает.

Условия инкубации

Мы использовали РСР с концентрацией 60 микромоль (мкМ) на литр. Концентрация родамина 6G (R6G) – 0.55 микромоль на литр. Клетки до эксперимента растили на чашках с YPD. Количество суспензии в итоговом,

экспериментальном растворе подбиралось так, чтобы OD550 (оптическая плотность клеток в свете длиной волны 550 нм) там было равно 1.5. Сделано было ради удобства дальнейшего фотографирования. Эксперимент проводился в эппендорфах 1.5 или 2 мл при комнатной температуре в ротаторе. В качестве отрицательного контроля вместо РСР использовался тот же объем этилового спирта.

Фотографировали мы их через 1 час после добавления раствора, также в части проведенных экспериментов через 24 часа. Оценка выживаемости также была сделана после 24 часов инкубации.

Наблюдение и анализ флуоресценции

Оптическая плотность полученной суспензии клеток часто была недостаточной, клеток в поле зрения камеры микроскопа было мало, поэтому мы центрифугировали 100 мкл суспензии 5 мин со скоростью 2500 оборотов/мин, чтобы клетки выпали в осадок, далее отбирали среду, не трогая клетки, и добавляли 10 мкл буфера PBS. После этого мы перемешивали суспензию при помощи пипетирования. Таким образом получали раствор клеток с оптической плотностью в 10 раз больше исходной, которую мы использовали для создания препарата. Для фотографии мы делали препарат 2.7 мкл суспензии клеток. Фотографировали мы под флуоресцентным микроскопом Olympus BX51 (объектив 100x) с флуоресцентной системой Olympus U-RFC-T с фильтрами U-MNIBA3 для GFP и U-MNG2 для RFP с помощью программы Cell F.

Для фотографии мы фокусировались на клетках, переключались на режим флуоресценции в GFP, предварительно закрыв нижнюю лампу микроскопа.

Таблица 2.6. Используемые флуоресцентные фильтры.

Название	Фильтр возбуждения, нм	Светоделитель, нм	Заградительный фильтр, нм	Измеряемый белок
U-MNG2	530-550	570	590	RFP
U-MNIBA3	470-495	505	510-550	GFP

Включая цветную лампу на короткое время, чтобы не выгорели белки (при длительном освещении они теряют яркость), находим большое скопление клеток и выключаем лампу. Далее делали две фотографии (с использованием двух разных фильтров, U-MNG2 и U-MNIBA3), сохраняли и искали следующую группу клеток. Выдержка, на которых мы снимали фотографии, зависела от яркости свечения клеток и находилась в диапазоне

После съемки каждую фотографии мы обработали в программе GIMP: мы установили в colors >> levels максимальное значение ввода 10 (максимальное возможное – 100). Это делалось из-за того, что камера на микроскопе снимает в 12-битном формате, а GIMP использует 16-битный. Поэтому при первоначальной загрузке фотографий они выглядят крайне темными.

Чтобы получить данные о яркости митохондрий на фотографиях, мы написали макрос в программе ImageJ, который создает маску вокруг клеток, таким образом, отфильтровывая шум фона, ищет яркие точки, создает вокруг каждой область диаметром 7 пикселей (по 3 пикселя от центра в каждую сторону), и создает файл со значениями яркости каждой точки (Приложение 1). Далее мы взяли медианные значения и сравнили их в двух экспериментах.

Анализ выживаемости клеток

Клетки *S. cerevisiae* инкубировали с РСР согласно методике в подразделе “Инкубация с РСР и R6G” в течение суток, в качестве контроля использовали клетки, инкубировавшиеся в среде YPGly без РСР с этиловым спиртом в объеме, эквивалентном РСР. Затем клетки осаждали в центрифуге в течение 5 минут при 3000 rpm, ресуспендировали в буфере PBS и разбавляли до OD550=0.05. Полученную суспензию окрашивали раствором пропидия йодида (PI), конечная концентрация 0.5мкг/мл, в течение 10 минут. В качестве контроля на автофлуоресценцию использовали неокрашенные клетки, а также в качестве положительного контроля (мертвые клетки) были использованы клетки, инкубированные в 70%-ном растворе этилового спирта 20 минут при температуре 4°C. Анализ уровня флуоресценции PI производился на проточном цитофлуориметре CytoFlex при помощи фильтра PE. Для обработки данных, полученных с цитофлуориметра, мы использовали программу CytExpert.

PI (пропидий йодид) – интеркалирующий краситель. Он не может проходить через целую цитоплазматическую мембрану, поэтому в живые клетки он не проходит, и, следовательно, не окрашивает их. В остатках же мертвых клеток он соединяется с ДНК, и, следовательно, ярко флуоресцирует [19]. Так как PI светится в красном спектре (600-700 нм) [20], там же, где и RFP, мы изучали выживаемость одиночных штаммов (только с одним белком, помеченным GFP, т.е. IDH1-GFP и TOM70-GFP), чтобы излучение RFP не влияло на результаты измерения.

Получение кривых роста *S. cerevisiae*

Клетки освежали в жидкой среде YPD или YPGly в течение 4 часов, затем разводили полученные культуры до оптической плотности OD₅₅₀=0.05.

Клеточную суспензию наносили в лунки плашки Eppendorf по 100 мкл и измеряли оптическую плотность с помощью планшетного спектрофотометра SPECTROstar Nano.

Результаты и обсуждение

Полученные штаммы

Таблица 3.1 Полученные штаммы

Название штамма	Генотип	Способ получения
IDH1-RFP	<i>ade2-101 his3-11 trp1-1 URA can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+ MATa</i>	Трансформация IDH1-GFP ПЦР-продуктом с плазмиды p1079(tagGFP-tagRFP) с праймерами Idh1-GFP -F и Idh1-GFP -R
TOM70-GFP	<i>ade2-101 HIS trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+ MATa</i>	Трансформация w303 ПЦР-продуктом с плазмиды pFA6a-GFP-HIS3MX6 с праймерами Tom70-GFP -F и Tom70-GFP -R
TOM70-RFP	<i>ade2-101 his3-11 trp1-1 URA can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+ MATa</i>	Трансформация w303 ПЦР-продуктом с плазмиды p1079(tagGFP-tagRFP) с праймерами Tom70-GFP -F и Tom70-GFP -R
IDH1-GFP TOM70-RFP	<i>ade2-101 his3-11 TRP URA can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+ MATa</i>	Трансформация IDH1-GFP ПЦР-продуктом с плазмиды p1079(tagGFP-tagRFP) с праймерами Tom70-GFP -F и Tom70-GFP -R
TOM70-GFP IDH1-RFP	<i>ade2-101 HIS trp1-1 URA can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+ MATa</i>	Трансформация IDH1-RFP ПЦР-продуктом с плазмиды pFA6a-GFP-HIS3MX6 с праймерами Tom70-GFP -F и Tom70-GFP -R

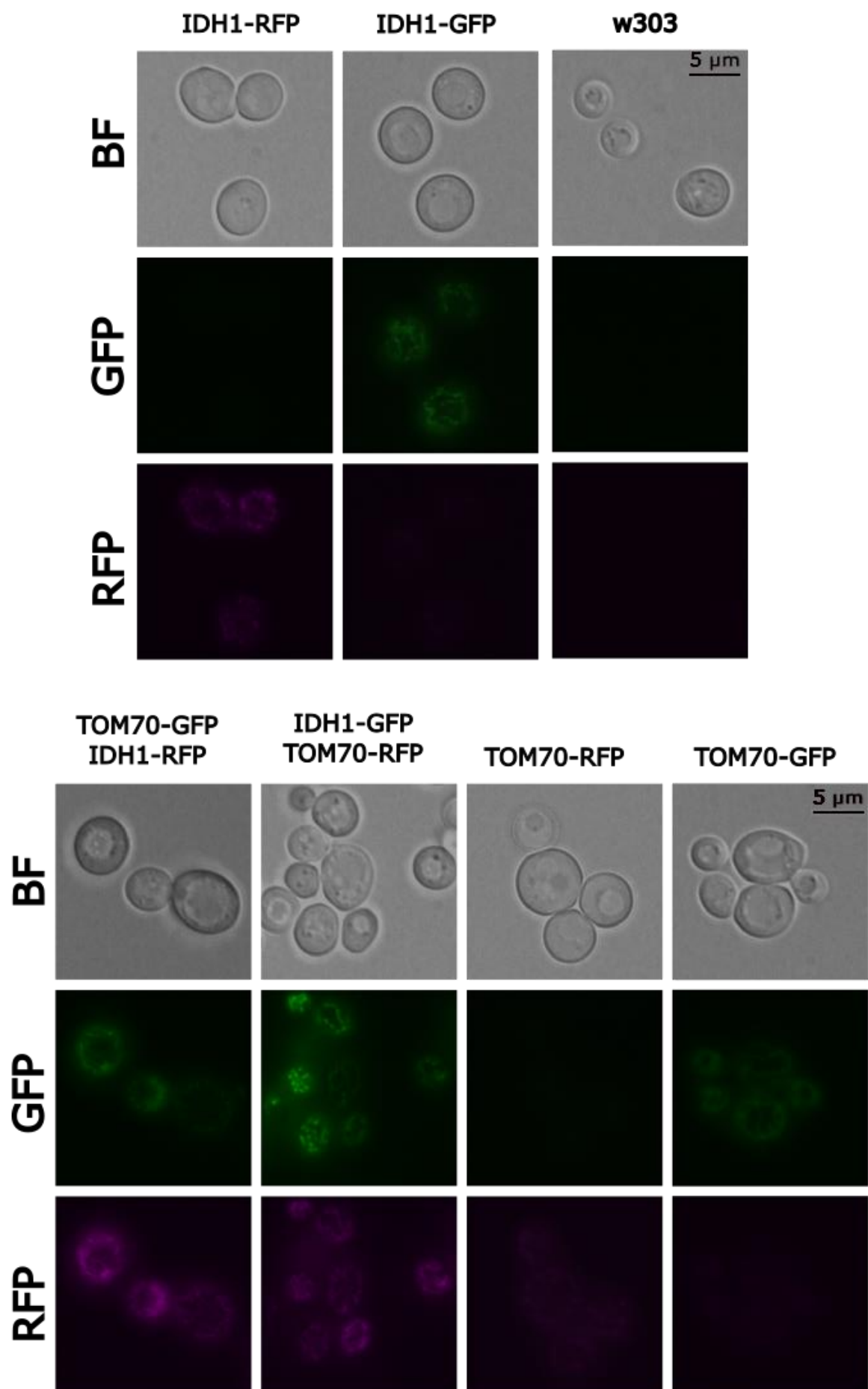


Рисунок 3.1. Полученные штаммы под флуоресцентным микроскопом.

В ходе нашей работы мы получили 6 новых штаммов дрожжей (Таблица 3.1). Правильное прохождение трансформации было проверено на флуоресцентном микроскопе (Рисунок 3.1). Небольшое свечение в тех спектрах, в которых его быть не должно (нет белка, светящегося в этом спектре), — результат автофлуоресценции клеток. Автофлуоресценция присуща всем клеткам дрожжей и происходит от эндогенных флуорофоров, таких как триптофан, пиридоксин и рибофлавин [21].

Анализ роста штаммов

Мы сравнили кинетику роста полученных штаммов на планшетном спектрофотометре (см. раздел “Материалы и методы”). На Рисунке 3.2 заметно, что скорость увеличения оптической плотности и итоговая оптическая плотность почти всех штаммов в среде YPD существенно не отличается от таковых для родительского штамма w303. Более высокая оптическая плотность штамма IDH1-GFP TOM70-RFP в стационарной фазе может быть вызвана отличным от остальных представленных штаммов генотипом (штамм самостоятельно синтезирует как триптофан, так и урацил), а также большей изначальной оптической плотностью. Таким образом, добавление флуоресцентных меток на белки митохондрий не привело к значительному снижению скорости роста дрожжей при использовании глюкозы в качестве источника углерода.

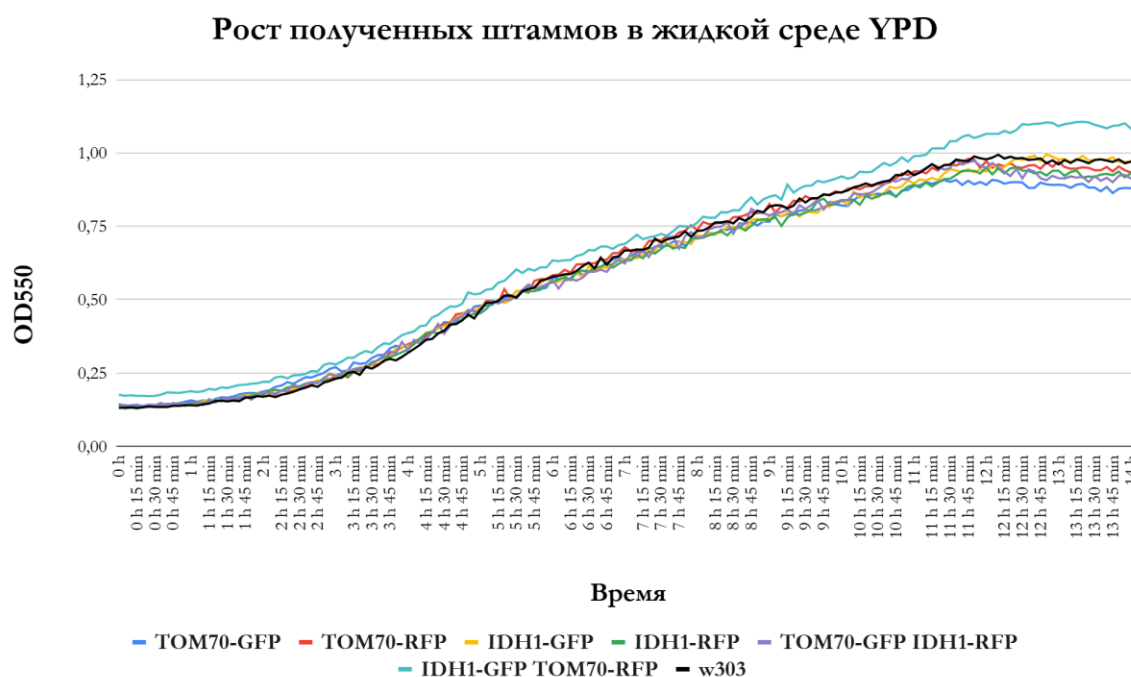


Рисунок 3.2. Рост полученных штаммов в жидкой среде YPD.

На Рисунке 3.3 также заметно, что скорость роста и итоговое OD в YPGly у всех штаммов схожее. Ни один из штаммов, в отличие от дрожжей

на YPD, за 14 часов не вышел на плато. Это связано с тем, что дрожжи способны быстрее высвободить энергию из глюкозы, нежели из глицерина, который потребляется при помощи более медленных путей захвата из окружающей среды и метаболизма [22]. Это приводит к тому что скорость роста дрожжей на средах с глицерином в качестве источника углерода — ниже.

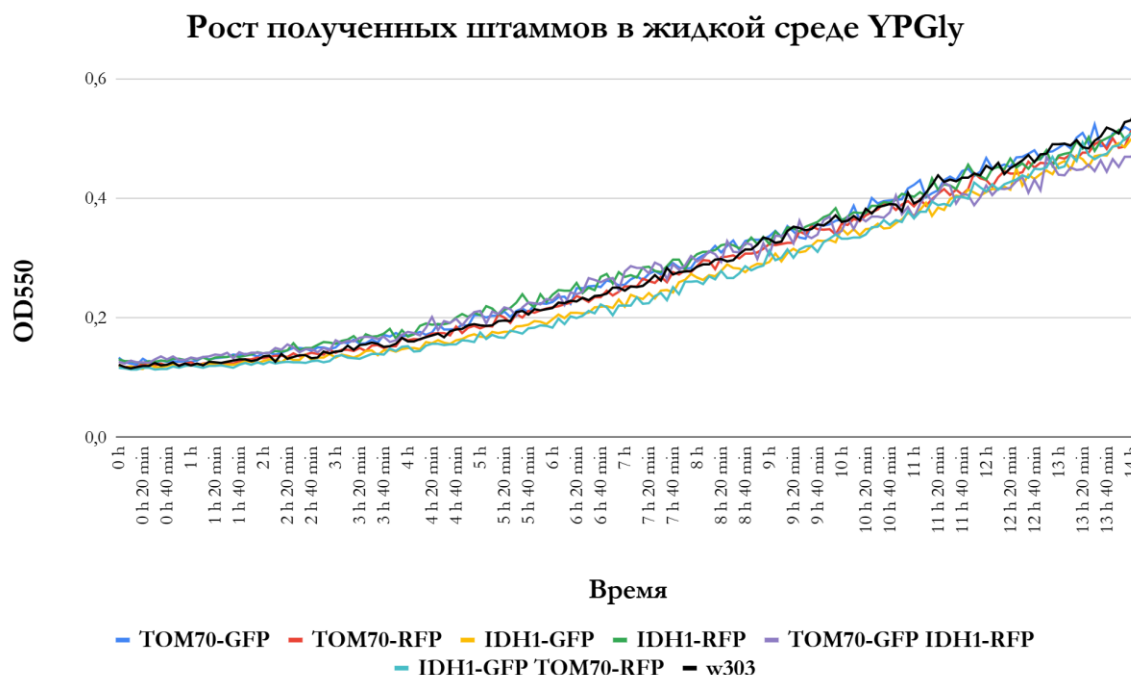


Рисунок 3.3. Рост полученных штаммов в жидкой среде YPGly.

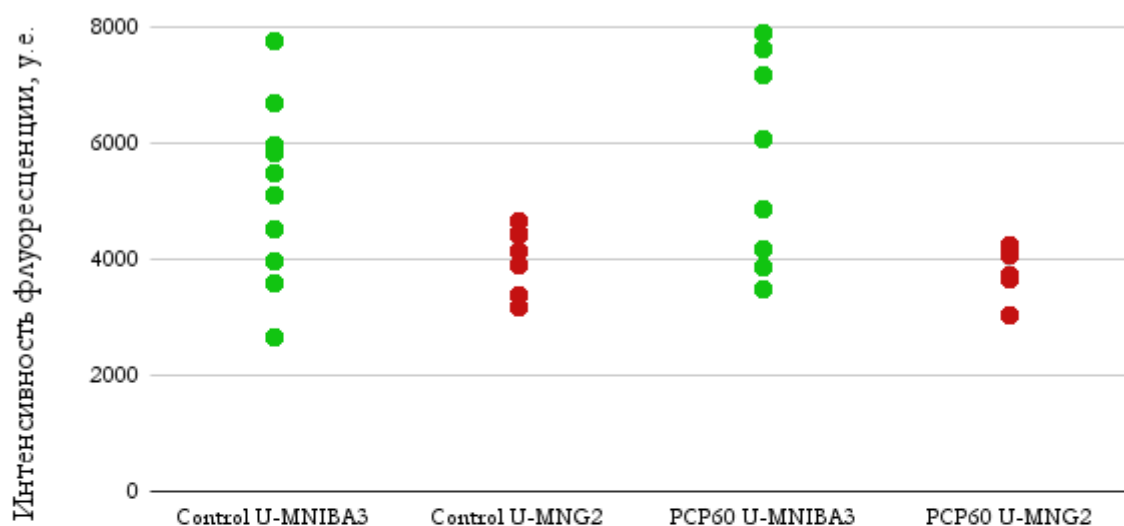
Анализ относительного содержания Tom70 и Idh1 при добавлении разобщителя РСР

Для того чтобы определить влияние разобщения дыхания и фосфорилирования в клетках дрожжей на соотношение содержания белков Tom70 и Idh1 в митохондриях, мы инкубировали полученные штаммы IDH1-GFP TOM70-RFP и TOM70-GFP IDH1-RFP с протонофором РСР (см. раздел “Материалы и методы”, подраздел “Инкубация с РСР и R6G”) в течение суток. РСР способен свободно диффундировать через мембрану и переносить протоны по градиенту концентрации, что разобщает процессы клеточного дыхания и фосфорилирования, снижая электрохимический потенциал на внутренней мембране митохондрий.

По прошествии часа IDH1-GFP TOM70-RFP не обнаруживает значительных изменений во флуоресцентных сигналах белков, большой разброс полученных значений при суточной инкубации в контрольных образцах не позволяет сделать достоверных выводов о содержании белков (см. Рисунок 3.4).

IDH1-GFP TOM70-RFP

A 1h



B 24h

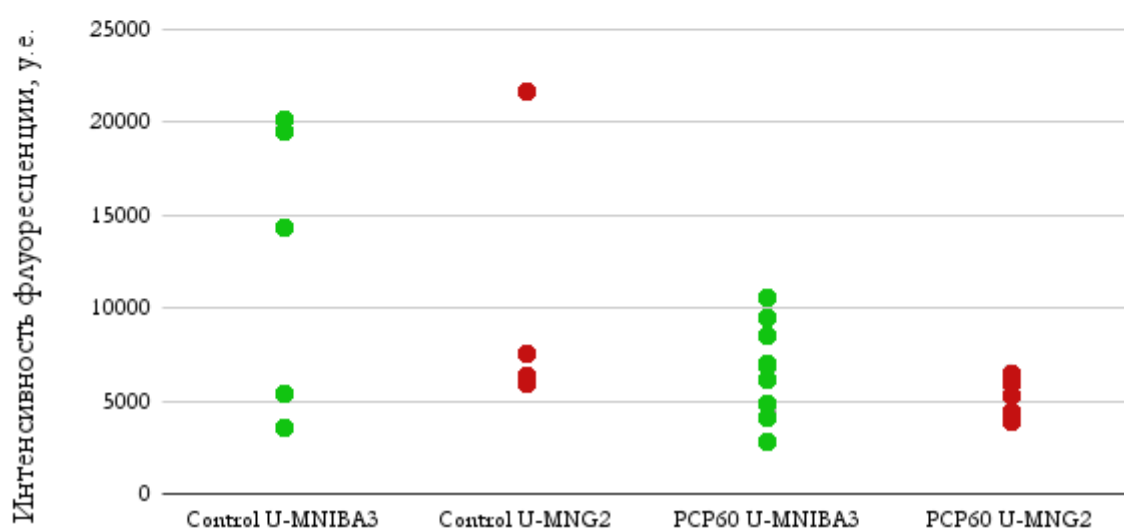


Рисунок 3.4. Интенсивность флуоресценции штамма IDH1-GFP TOM70-RFP в разных условиях. Инкубация: A(1h) – 1 час, B(24h) – сутки. у.е. – условные единицы.

PCP60 – инкубация с РСР в концентрации 60 мкМ

U-MNIBA3 – фильтр эмиссии флуоресценции в зеленом спектре.

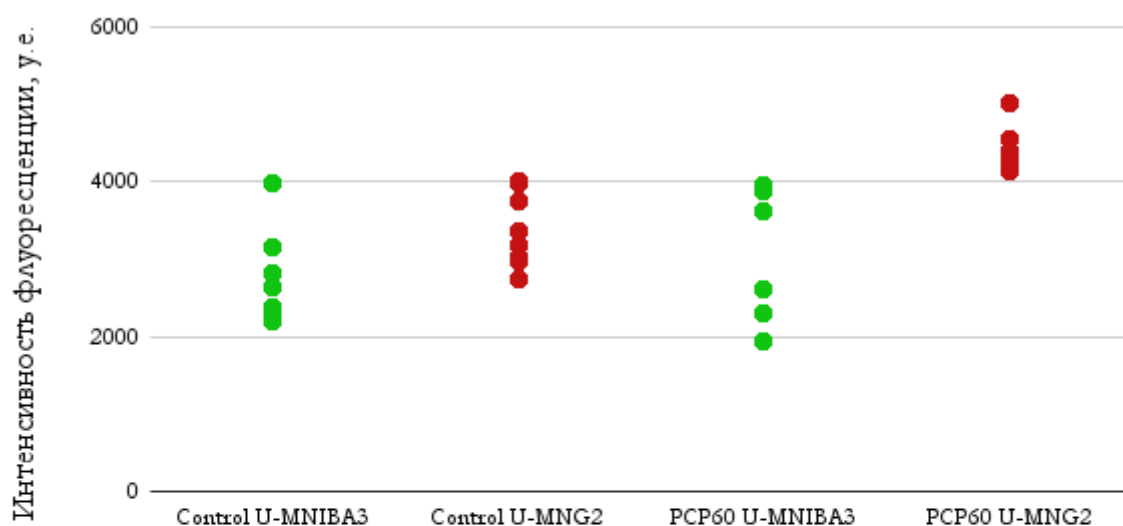
U-MNG2 – фильтр эмиссии флуоресценции в красном спектре.

Точками обозначены медианные значения интенсивности флуоресценции на одной фотографии.

Как часовая, так и суточная инкубация TOM70-GFP IDH1-RFP показывает, что сигнал Idh1-RFP увеличивается при добавлении РСР в среду (см. Рисунок 3.5).

TOM70-GFP IDH1-RFP

A 1h



B 24h

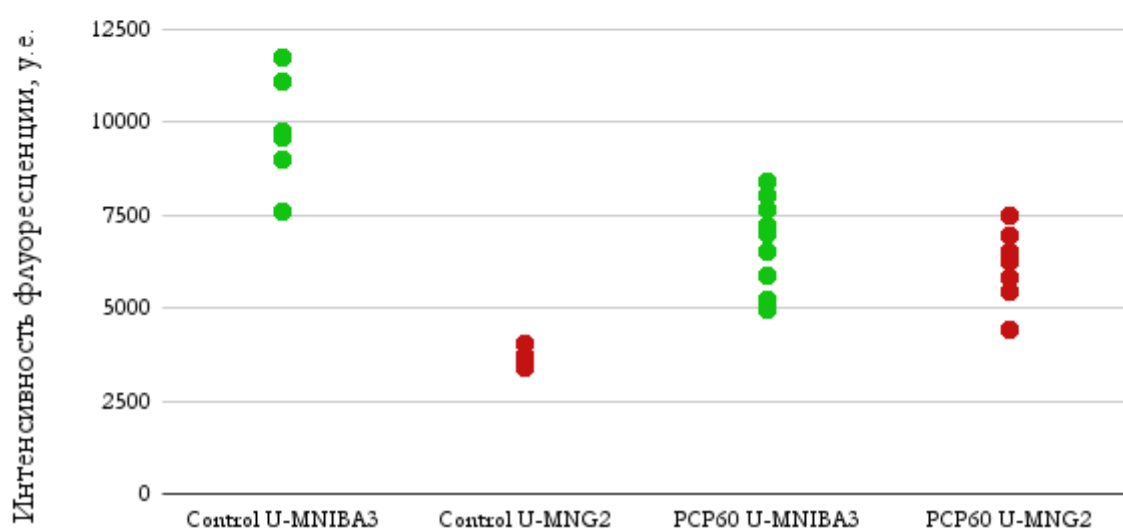


Рисунок 3.5. Интенсивность флуоресценции штамма TOM70-GFP IDH1-RFP в разных условиях. Инкубация: A(1h) – 1 час, B(24h) – сутки. у.е. – условные единицы.

PCP60 – инкубация с РСР в концентрации 60 мкМ

U-MNIBA3 – фильтр флуоресценции в зеленом спектре.

U-MNG2 – фильтр флуоресценции в красном спектре.

Точками обозначены медианные значения интенсивности флуоресценции на одной фотографии.

Поскольку Idh1 – белок митохондриального матрикса, его импорт является потенциал-зависимым (см. раздел “Обзор литературы”, подраздел “Митохондрии, строение и функции”, подраздел “Импорт Idh1 в матрикс”). Мы ожидали, что протонофор РСР, снижающий митохондриальный потенциал, затруднит импорт Idh1 в митохондрии, что приведёт к снижению сигнала от его флуоресцентного тега в митохондриях со

временем. Tom70, в свою очередь, локализуется во внешней митохондриальной мембране, импорт в которую не требует потенциала на внутренней митохондриальной мембране, поэтому мы ожидали, что добавление РСР на сигнал его флуоресцентного тега не повлияет.

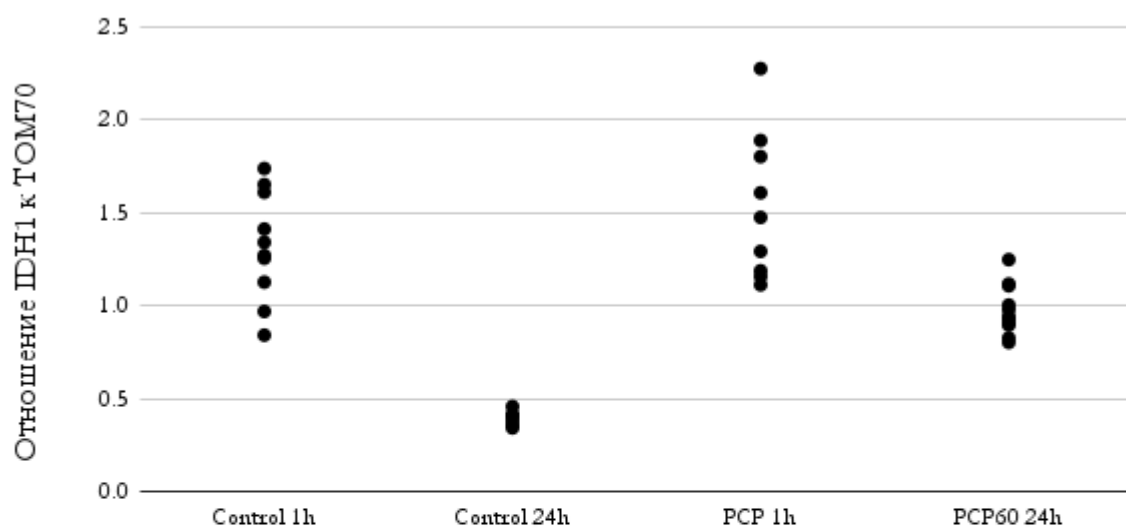
Несмотря на то, что время инкубация значительно дольше чем ожидаемое время жизни Idh1, ни в одном из штаммов мы не наблюдаем достоверного снижения сигнала Idh1 при добавлении РСР относительно сигнала в контрольном образце (см. Рисунок 3.4 и Рисунок 3.5). Отсутствие снижения содержания Idh1 может быть вызвано увеличением синтеза белков, отсутствием влияния РСР на импорт Idh1 в матрикс или снижением деградации белка. Поскольку РСР разобщает дыхание и фосфорилирование в митохондриях, значительно снижая эффективность синтеза АТФ, увеличение белкового синтеза не представляется вероятным. Угнетение разобщителями импорта белков во внутреннюю мембрану и матрикс митохондрий многократно описано в литературе (например, [23] и [24]). Митохондриальные белки деградируют двумя путями – в процессе митофагии и под действием митохондриальных протеаз [25], влияние РСР на оба процесса требует дальнейшего изучения.

Соотношение сигналов Idh1/Tom70 соответствует (см. Рисунок 3.6) рассмотренным ранее данным. Соотношение падает от менее длительной инкубации с РСР к более длительной, что соответствует нашим ожиданиям, однако сравнение образцов с разобщителем и контрольных образцов не показывает снижение соотношения при добавлении РСР.

В обоих штаммах сигнал флуоресцентно тегированного Tom70 стабильнее при различных условиях, что делает его более подходящим кандидатом для оценки содержания и локализации митохондриального белка в экспериментах по оценке структуры и функций митохондрий.

IDH1 к TOM70

А TOM70-GFP IDH1-RFP



В IDH1-GFP TOM70-RFP

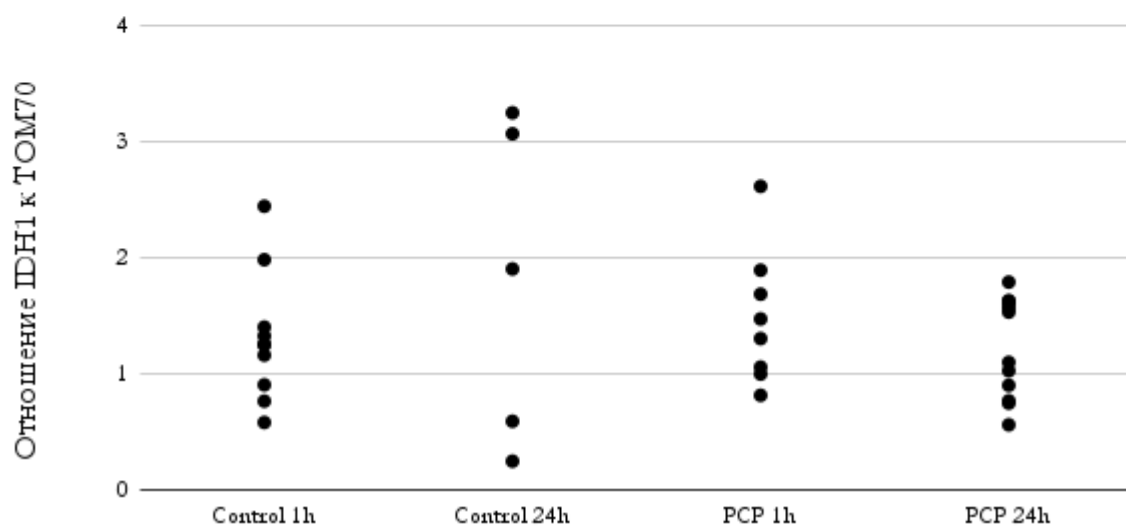


Рисунок 3.6. Отношение интенсивности флуоресценции IDH1 к TOM70 в разных условиях. А – штамм TOM70-GFP IDH1-RFP, В – штамм IDH1-GFP TOM70-RFP.

PCP60 – инкубация с PCP в концентрации 60 мкМ.

Точками обозначены медианные значения интенсивности флуоресценции на одной фотографии.

Подтверждение снижения мембранного потенциала митохондрий при добавлении РСР

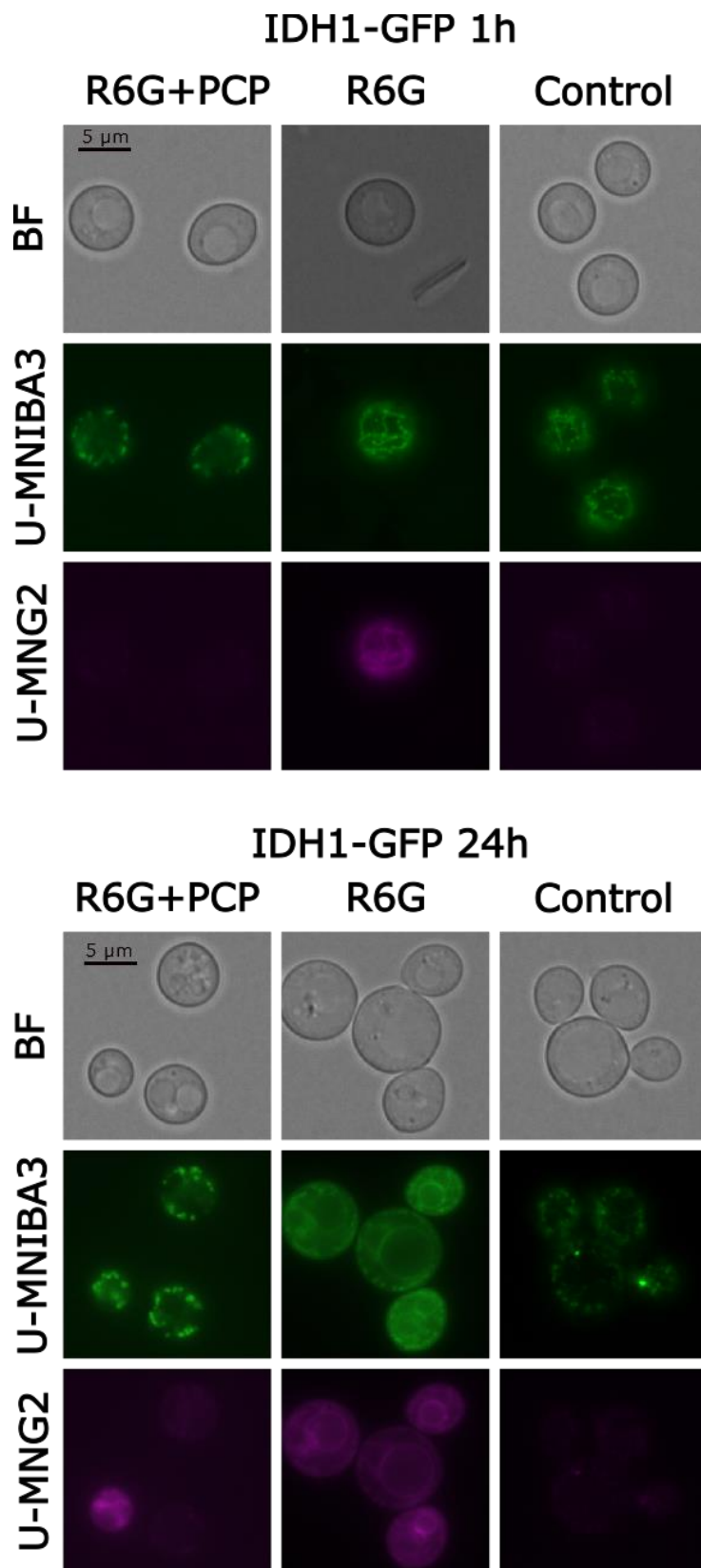


Рисунок 3.7. Эксперимент с IDH1-GFP.

1h – инкубация в течение 1 часа, 24h – в течение суток.
 U-MNIBA3 – фильтр флуоресценции в зеленом спектре.
 U-MNG2 – фильтр флуоресценции в красном спектре.
 РСР60 – инкубация с РСР в концентрации 60 мкМ.

Для подтверждения того, что РСР в используемой концентрации действительно снижает величину митохондриального потенциала, мы использовали родамин 6G (см. раздел “Материалы и Методы”, подраздел “Инкубация с РСР и R6G”). Флуоресценцию R6G мы наблюдали в канале фильтра U-MNG2, поэтому в эксперименте были использованы штаммы IDH1-GFP и TOM70-GFP без красного флуоресцентного белка. Рисунок 3.7 и Рисунок 3.8 демонстрируют наблюдаемую флуоресценцию родамина в этих штаммах в присутствии и отсутствии РСР.

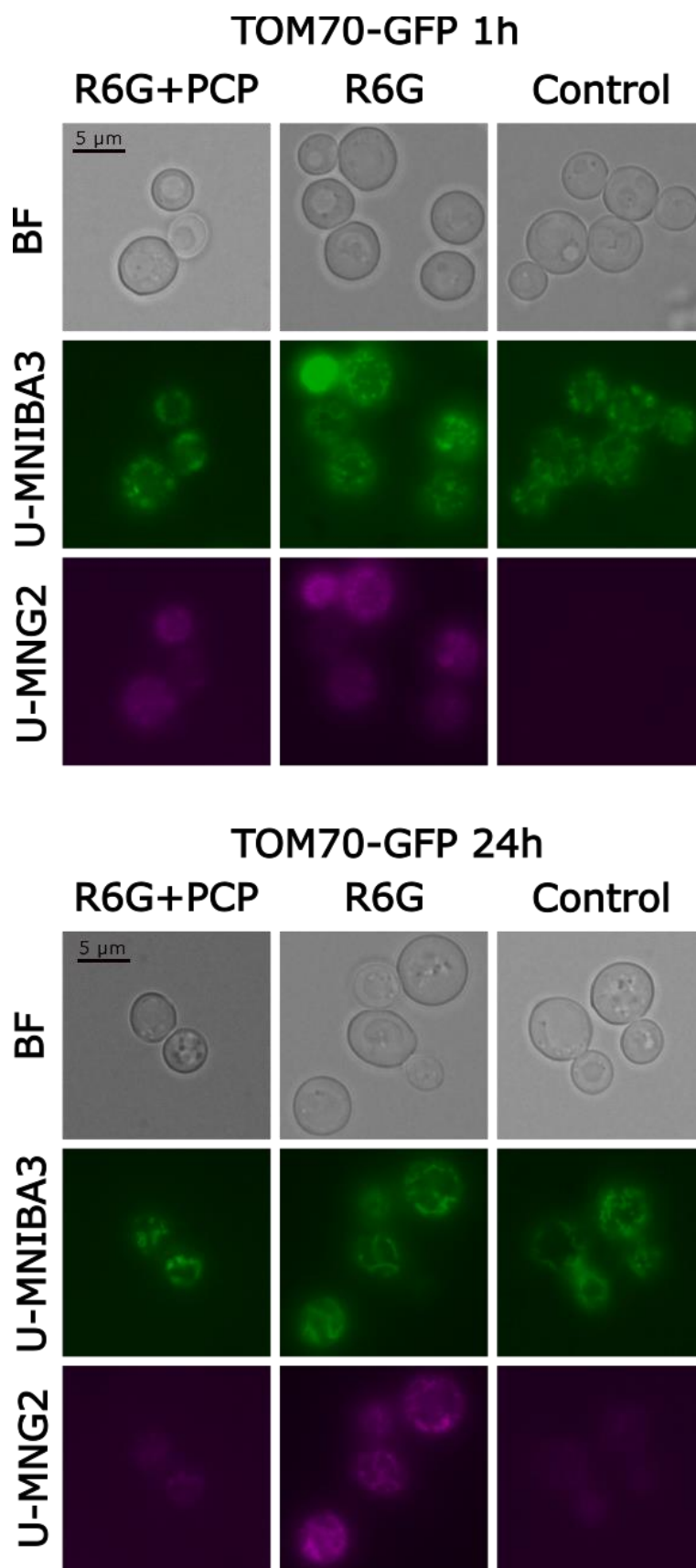


Рисунок 3.8. Эксперимент с TOM70-GFP. 1h – инкубация в течение 1 часа, 24h – в течение суток.

U-MNIBA3 – фильтр флуоресценции в зеленом спектре.

U-MNG2 – фильтр флуоресценции в красном спектре.

PCP60 – инкубация с PCP в концентрации 60 мкМ.

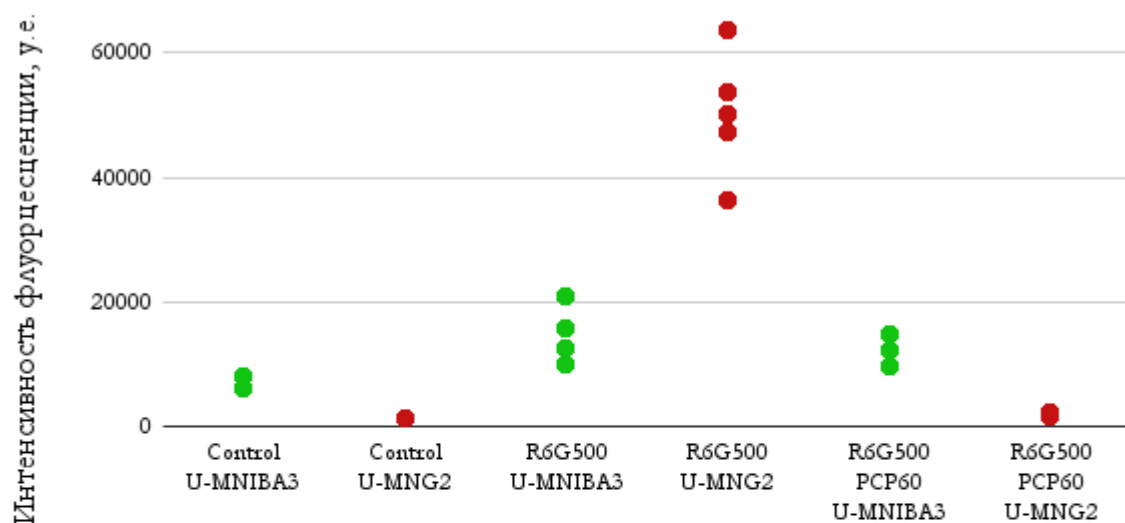
На Рисунке 3.9 представлены медианы интенсивности флуоресценции штамма IDH1-GFP в разных условиях. При этом видно, что в контроле в канале U-MNIBA3 сигнал есть, но не сильный, в канале U-MNG2 – почти нет. Это объясняется наличием в этом штамме GFP и автофлуоресценцией соответственно. Это верно при измерении как через час, так и через сутки.

В клетках, окрашенных R6G без РСР, U-MNG2 светится ярче, чем U-MNIBA3, однако оба светятся ярче, чем контроль. Это объясняется тем, что R6G флуоресцирует в основном в спектре U-MNG2, однако его диапазон (400-600 нм) перекрывается и с диапазоном U-MNIBA3 (500-700 нм) [22].

Яркость R6G зависит от потенциала на внутренней мембране митохондрии (см. раздел “Материалы и методы”, подраздел “Инкубация с РСР и R6G. Эффекты R6G на митохондрии”). Для обоих исследованных штаммов (Рисунок 3.9 и Рисунок 3.10) верно, что в образцах без митохондриального разобщителя РСР интенсивность флуоресценции R6G высока, тогда как в образцах с РСР сигнал в канале U-MNG2 падает до уровня контрольного образца без родамина, что означает что РСР в концентрации 60 мкМ действительно снижает митохондриальный потенциал и разобщает клеточное дыхание и фосфорилирование.

IDH1-GFP

A 1h



B 24h

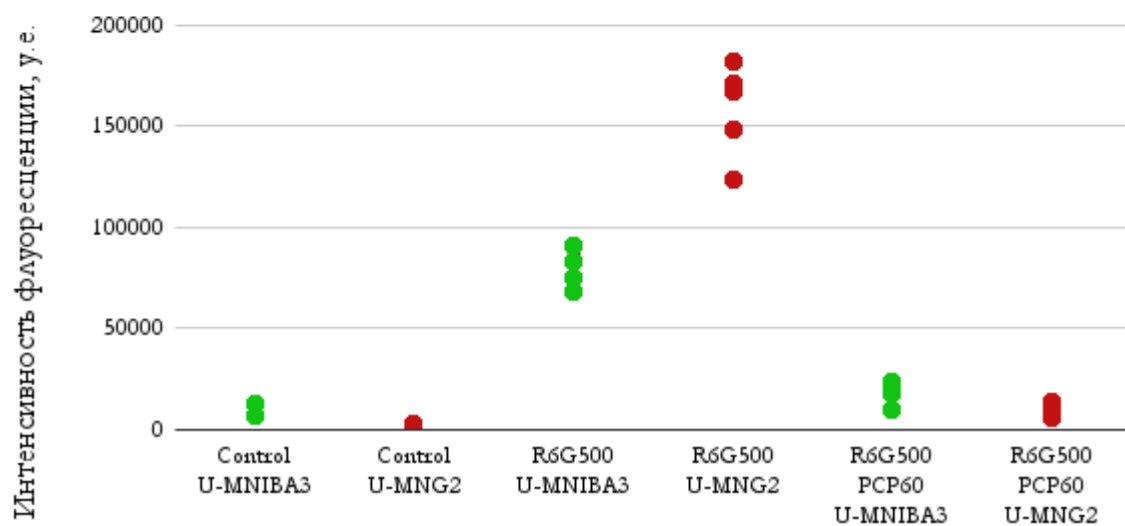


Рисунок 3.9. Интенсивность флуоресценции штамма IDH1-GFP в разных условиях.

Инкубация: A(1h) – 1 час, B(24h) – сутки. у.е. – условные единицы.

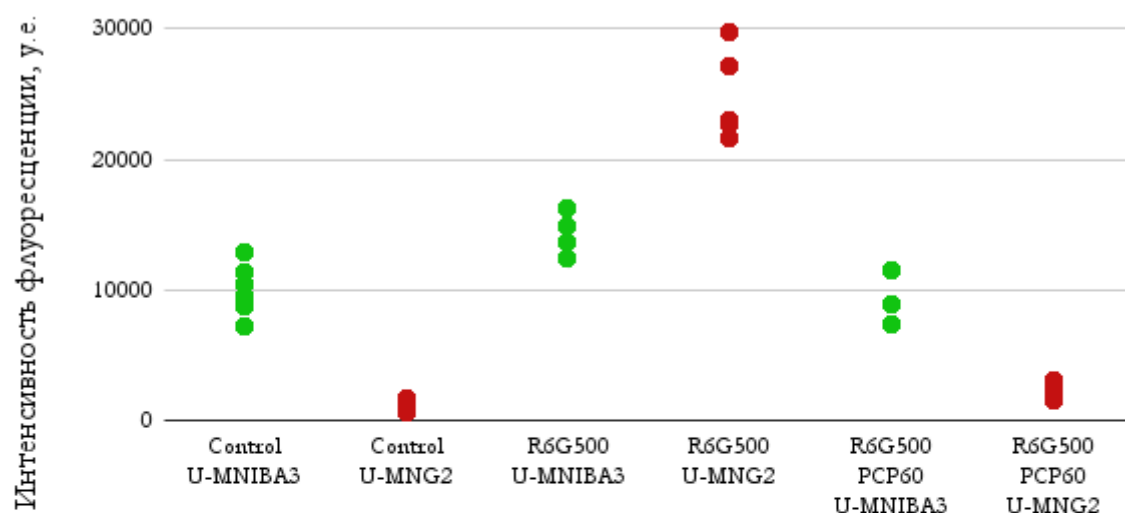
U-MNIBA3 – фильтр флуоресценции в зеленом спектре.

U-MNG2 – фильтр флуоресценции в красном спектре.

PCP60 – инкубация с РСР в концентрации 60 мкМ

TOM70-GFP

A 1h



B 24h

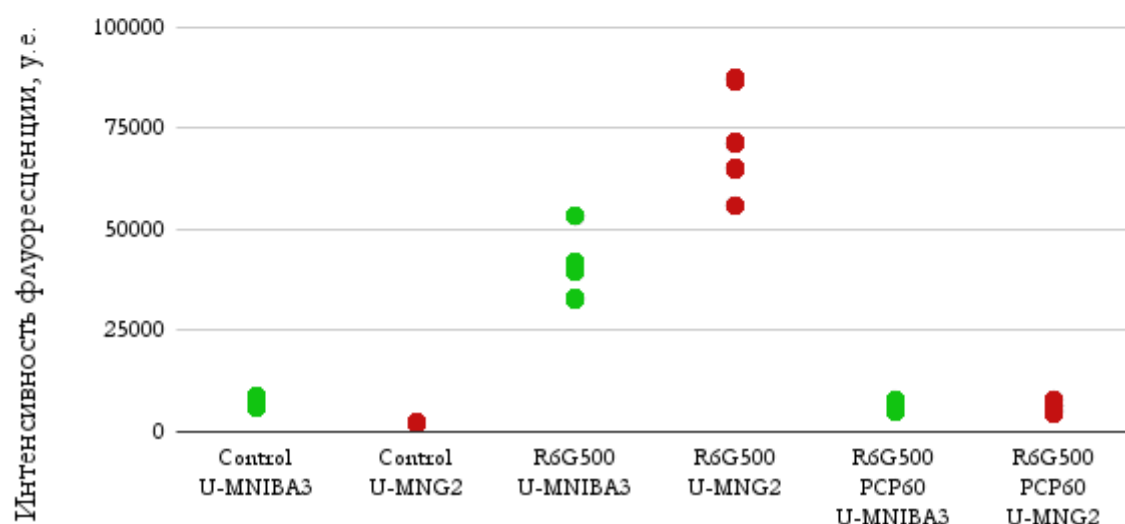


Рисунок 3.10. Интенсивность флуоресценции штамма TOM70-GFP в разных условиях.

Инкубация: A(1h) – 1 час, B(24h) – сутки. у.е. – условные единицы.

U-MNIBA3 – фильтр флуоресценции в зеленом спектре.

U-MNG2 – фильтр флуоресценции в красном спектре.

PCP60 – инкубация с РСР в концентрации 60 мкМ

Анализ выживаемости штаммов

После инкубации с РСР, длившейся 24 часа (см. раздел “Материалы и методы”, подраздел “Анализ выживаемости клеток”), была оценена выживаемость полученных нами штаммов. Это нужно было, чтобы убедиться в жизнеспособности клеток в присутствии разобщителя. Для этого мы окрашивали клетки флуоресцентным зондом пропидий йодидом (PI) и оценивали накопление этого зонда в клетках с помощью проточной

цитофлуорометрии. PI накапливается в мертвых клетках, а из живых клеток откачивается.

На Рисунке 3.11 представлена статистика выживаемости клеток штамма IDH1-GFP. На Рисунке 3.11 (А) видно, что, хотя интенсивность флуоресценции мертвых клеток и клеток без РСР (названы PI) пересекаются, они делят график на 2 части. График же РСР60 (Рисунок 3.11 (В)) имеет два пика – один в области живых клеток, один в области мёртвых. По части В видно, что мёртвые клетки составляют лишь 3.96% всех клеток. Почти все свечение клеток, окрашенных лишь PI, объясняется автофлуоресценцией, так как совпадает с графиком неокрашенных клеток (Приложение 2 (А)).

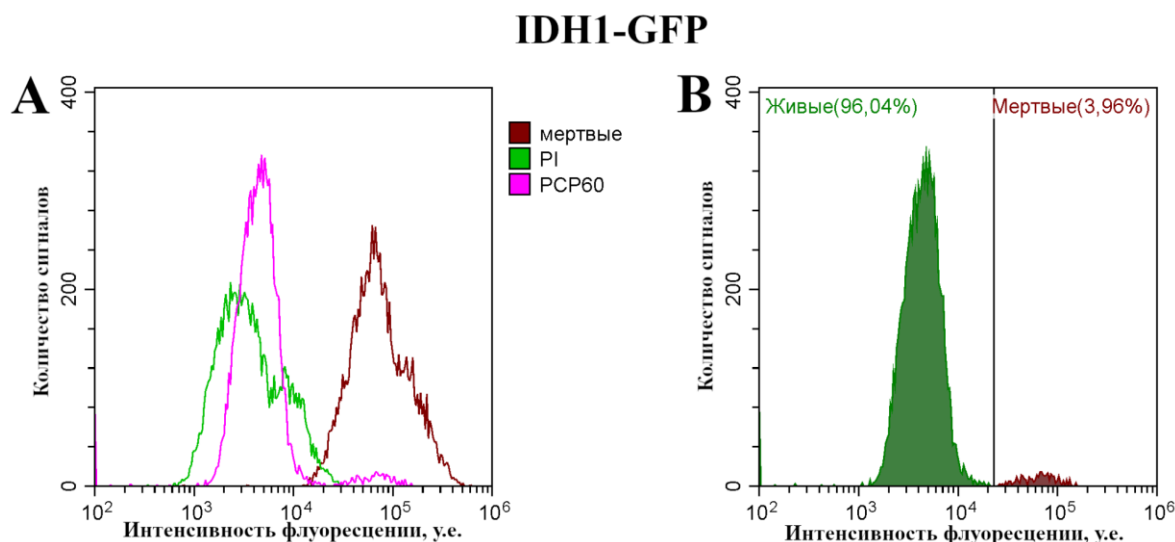


Рисунок 3.11. Выживаемость штамма IDH1-GFP. У.е. – условные единицы.

А: мертвые – мертвые клетки, полученные инкубацией в 70% этиловом спирте, окрашенные PI

PI – клетки без РСР, окрашенные PI

PCP60 – живые клетки в присутствии РСР (60 мкМ), окрашенные PI

В: выживаемость клеток PCP60.

TOM70-GFP

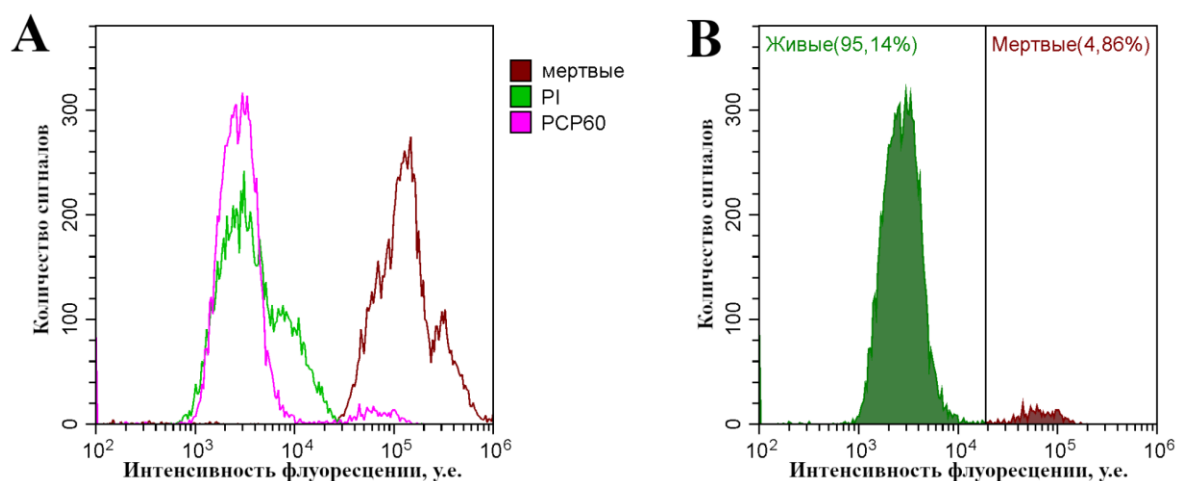


Рисунок 3.12. Выживаемость штамма TOM70-GFP. У.е. – условные единицы.

А: мертвые – мертвые клетки, полученные инкубацией в 70% этиловом спирте, окрашенные PI

PI – клетки без RCP, окрашенные PI

RCP60 – живые клетки в присутствии RCP (60 мкМ), окрашенные PI

В: выживаемость клеток RCP60.

В случае TOM70-GFP на Рисунке 3.12 (А) кривые мертвых клеток и клеток без RCP (PI) не пересекаются. Доля же мертвых клеток составляет 4.86% (Рисунок 3.12 (В)).

Таким образом, добавление RCP в концентрации 60 мкМ летально лишь для малого процента клеток.

Выводы

В соответствии с поставленными в работе задачами на основе полученных результатов мы можем сделать следующие выводы:

1. Флуоресцентное тегирование белков Tom70 и Idh1 существенно не влияет на рост штаммов на сбраживаемой и несбраживаемой средах.
2. Нам не удалось подтвердить гипотезу о том, что протонофор понижает содержание Idh1 в матриксе митохондрий.
3. Содержание Tom70 в митохондриях в меньшей степени зависит от условий инкубации и величины потенциала внутренней мембраны митохондрий, и потому он более подходит для использования в экспериментах по оценке структуры и функций митохондрий в качестве маркерного митохондриального белка.

Благодарности

Мы благодарим Сергея Менделевича Глаголева за организацию лабораторной практики и поиск рецензента. Мы благодарны Дмитрию Алексеевичу Кнорре, Ксении Викторовне Галкиной и Елене Дмитриевне Суриковой за научное руководство, а также сотрудников лаборатории фотохимии биомембран за помощь в проведении экспериментов.

Список литературы

- [1]. Wiedemann N., Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, 86 (1): 685–714.
- [2]. Geissler A., Krimmer T., Bömer U., Guiard B., Rassow J., Pfanner N. Membrane Potential-Driven Protein Import into Mitochondria. *Mol Biol Cell*, 2000, 11 (11): 3977–3991.
- [3]. Palmer C. S., Anderson A. J., Stojanovski D. Mitochondrial protein import dysfunction: mitochondrial disease, neurodegenerative disease and cancer. *FEBS Lett*, 2021, 595 (8): 1107–1131.
- [4]. Franco-Iborra S., Cuadros T., Parent A., Romero-Gimenez J., Vila M., Perier C. Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (11): 1–17.
- [5]. Sherman F. [1] Getting started with yeast. in *Methods in Enzymology* vol. 194 p. 3–21. Burlington, Academic Press, 1991, - 933 p., ill.
- [6]. Ji Q., Mai J., Ding Y., Wei Y., Ledesma-Amaro R., Ji X. Improving the homologous recombination efficiency of *Yarrowia lipolytica* by grafting heterologous component from *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 11: e00152.
- [7]. Liu H., Styles C. A., Fink G. R. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, 1996, 144 (3): 967–978.
- [8]. Malina, C., Larsson, C., Nielsen, J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Research*, 2018, 18 (5): foy040.
- [9]. Pfanner, N., Warscheid, B., Wiedemann, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 2019(20): 267–284.
- [10]. Herrmann J. M., Riemer J. The Intermembrane Space of Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 13 (9): 1341–1358.

- [11]. Rich P. R., Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays in Biochemistry*, 2010, 470: 1–23.
- [12]. Rintala E. Effects of oxygen provision on the physiology of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Dissertation. Espoo, VTT Technical Research Centre of Finland, 2010. - 82 pg, ill.
- [13]. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakireva A.V., Juhaszova M., Sollott S.J., Zorov D.B. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 2018, 552: 50–59.
- [14]. Becker T., Pfannschmidt S., Guiard B., Stojanovski D., Milenkovic D., Kutik S., Pfanner N., Chris Meisinger C., Wiedemann N. Biogenesis of the Mitochondrial TOM Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (1): 120–127.
- [15]. Cupp J. R., McAlister-Henn L. NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning, nucleotide sequence, and disruption of the IDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (33): 22199–22205.
- [16]. Cupp, J. R., McAlister-Henn, L. Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (23): 16417–16423.
- [17]. Markovich Z.R., Hartman J.H., Ryde I.T., Hershberger K.A., Joyce A.S., Ferguson P.L., Meyer J.N. Mild pentachlorophenol-mediated uncoupling of mitochondria depletes ATP but does not cause an oxidized redox state or dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Current Research in Toxicology*, 2022, 3: 100084 .
- [18]. Mandalà M., Serck-Hanssen G., Martino G., Helle K. B. The Fluorescent Cationic Dye Rhodamine 6G as a Probe for Membrane Potential in Bovine Aortic Endothelial Cells. *Analytical Biochemistry*, 1999, 274 (1): 1–6.

- [19]. Crowley L.C., Scott A.P., Marfell B.J., Boughaba J.A., Chojnowski G., Waterhouse N.J. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 2016 (7): 647-651.
- [20]. https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/rhodamine_6g
- [21]. Maslanka R., Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 146: 55–60.
- [22]. Klein M., Swinnen S., Thevelein J. M., Nevoigt E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*, 2017, 19 (3): 878–893.
- [23]. Geissler A. *et al.* Membrane Potential-Driven Protein Import into Mitochondria: The Sorting Sequence of Cytochrome *b*₂ Modulates the $\Delta\psi$ -Dependence of Translocation of the Matrix-targeting Sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 11: 3977–3991.
- [24]. Reid G. A. & Schatz, G. Import of proteins into mitochondria. Yeast cells grown in the presence of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone accumulate massive amounts of some mitochondrial precursor polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257: 13056–13061.
- [25]. Bota D. A. & Davies, K. J. A. Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion*, 2001, 1 (1): 33-49.

Приложения

Приложение 1. Макрос, использованный нами в ImageJ для обработки фотографий: <https://github.com/Ivanconcorde/ImageJ-fluorescent-analyzer>.

Мы открывали изображение в ImageJ. Далее запускали скрипт (Macro_triangle.ijm). Сначала тот делал копию изображения для создания маски на ней (маской будем называть только область, отделяющую клетки от фона, областями будем называть точки максимума и области вокруг них, где производилось измерение), что показано на части А рисунка 4.1. После изображение размывалось по Гауссу (В на рисунке 4.1), при помощи функции “Auto Threshold” клетки заполняются белым, затем фон заливается черным (С на рисунке 4.1). Это превращается в маску, которая применяется на исходное изображение (D на рисунке 4.1). С этого момента поиск максимумов производится только внутри нее. Мы делали это, чтобы программа не включала в число митохондрий помехи.

На оригинальном изображении производился поиск точек локального максимума (функцией Find maxima). При этом использовался некоторый порог. Он не всегда был постоянным и зависел от яркости изображения. Выбирали мы его таким образом, чтобы выделение включали все митохондрии, однако не включали шума вокруг или следов автофлуоресценции. Вокруг точек максимума мы брали небольшую область диаметром 7 пикселей, внутри которой производились измерения (Е на рисунке 4.1). Измерения каждой области записывались в .csv файл, затем скрипт закрывал и очищал все окна, кроме главного изображения, чтобы можно было проверить, правильно ли сработала программа. После этого запускали другой скрипт (close.ijm), который закрывал оставшиеся окна.

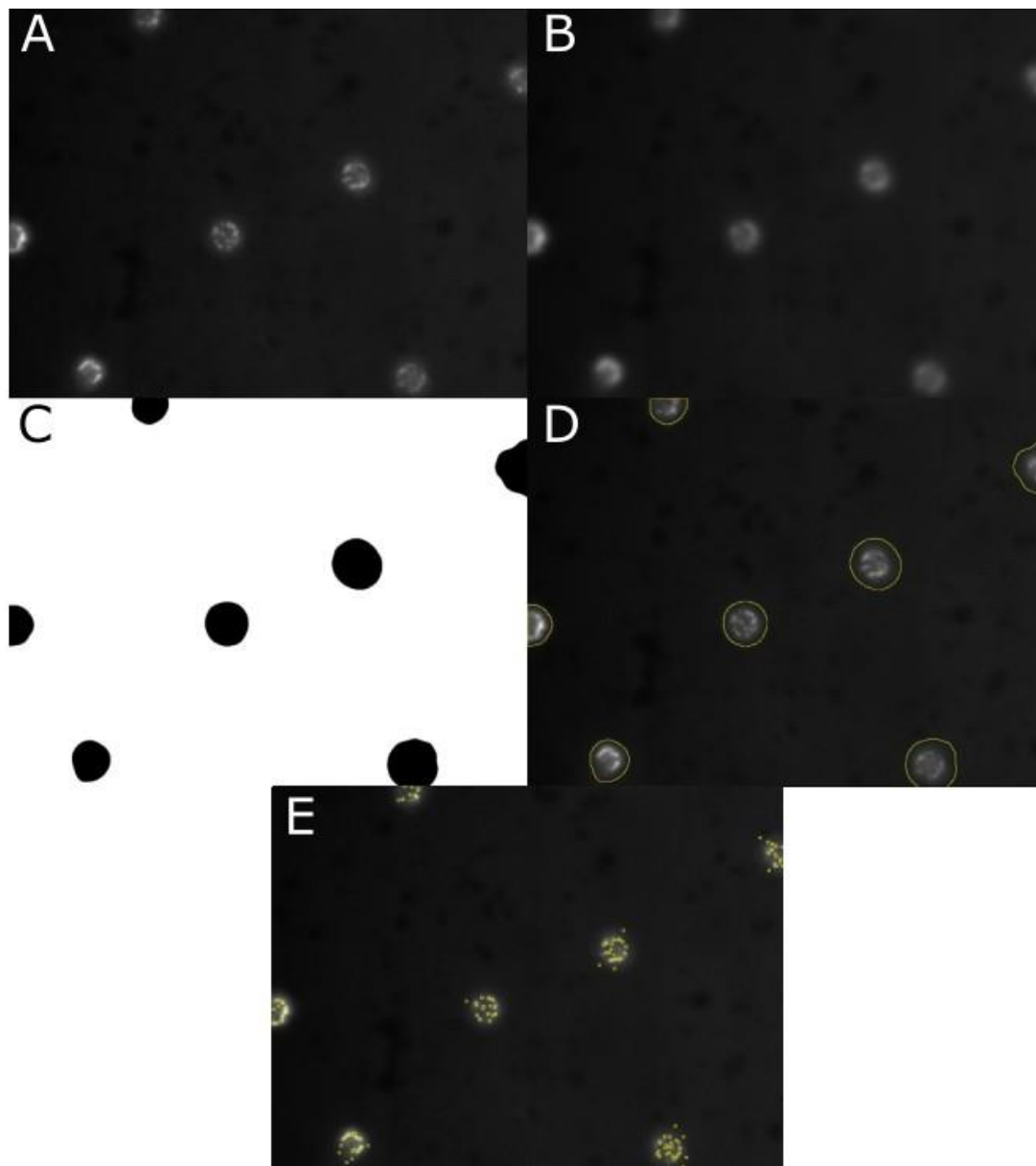


Рисунок 4.1. Процесс получения маски. А – исходное изображение, В – размытая копия изображения, С – маска, D – маска, наложенная на исходное изображение, Е - точки максимума и области вокруг них.

Приложение 2. Дополнительные графики.

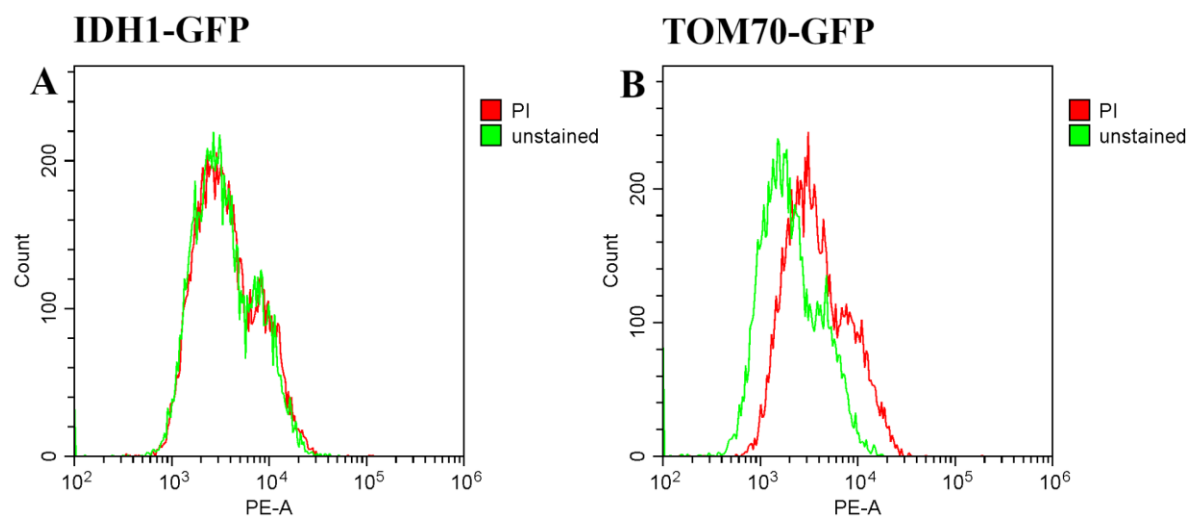


Рисунок 4.2. Выживаемость клеток. А – IDH1-GFP, В – TOM70-GFP. PI – окрашенные при помощи PI (500 мкМ) клетки, unstained – неокрашенные ничем (график – автофлуоресценция).