

На правах рукописи

Харечкина Екатерина Сергеевна

**Регуляция неспецифической  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации супероксид-аниона пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля**

03.01.04 Биохимия

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

Пушино - 2020

Работа выполнена в Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино.

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук **Круглов Алексей Георгиевич**

**Официальные оппоненты:**

**Белослудцев Константин Николаевич**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет», профессор кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии.

**Дерябина Юлия Ивановна**, кандидат биологических наук, Институт биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», заведующая лабораторией экологической и эволюционной биохимии.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита состоится « » 2020 г. 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 официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.  
Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Неспецифическая  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая митохондриальная пора (РТР) представляет собой мегаканал во внутренней мембране митохондрий (ИММ), открывание которого приводит к увеличению ее проницаемости для растворов массой менее 1,5 кДа, потере мембранного потенциала, набуханию митохондрий и разрыву их внешней мембраны. Установлено, что индукция РТР происходит при повышении концентрации кальция в матриксе, окислительном стрессе, истощении пула адениновых нуклеотидов (АН). Такие условия наблюдаются при многих патологических состояниях, включая ишемию с последующей реперфузией. По-видимому, открывание РТР является ключевым фактором, вызывающим клеточную гибель и необратимые повреждения органа. К настоящему моменту разработано лишь несколько препаратов для предотвращения постишемической гибели клеток, действие которых направлено на подавление РТР за счет связывания с ее предполагаемыми структурными элементами: (циклофилином D (CypD), транслокатором адениновых нуклеотидов (АНТ), 18-kDa транслокаторным белком (TSPO), потенциал-зависимым анионным каналом (VDAC)). Причем, только ингибитор CypD – циклоспорин А (CsA) – продемонстрировал существенный эффект в клинике. Разработать высокоэффективные лекарственные средства и полноценную терапевтическую стратегию не позволяет отсутствие полноценного знания о молекулярном строении РТР и точных механизмах ее регуляции.

Пиридиновые нуклеотиды (ПН), помимо участия в окислительно-восстановительных реакциях в качестве коэнзима, выполняют функцию сигнальных молекул широкого спектра действия. Являясь субстратами поли(АДФ-рибоза)полимераз, сиртуинов, синтаз циклической АДФ-рибозы (CD38 и CD157), НАД участвует в регуляции гомеостаза кальция, экспрессии генов в ответ на окислительный и генотоксический стресс, регуляции аутофагии, митохондриального биогенеза и клеточной гибели. Соответственно, изменение концентрации ПН и нарушение баланса НАД(Ф)/НАД(Ф)Н связаны со многими патологическими состояниями (сердечно-сосудистые, нейродегенеративные заболевания, диабет) и старением. Также известно, что ПН являются регуляторами РТР. К настоящему времени является общепринятым, что сайты их действия локализованы в матриксе митохондрий либо на матриксной стороне ИММ. Предполагается, что они оказывают аллостерический эффект, либо их защитное действие основано на восстановлении убихинона, который является регулятором поры, и глутатиона, поддерживающего восстановленное состояние критических тиолов. Однако в

научной литературе данные о способности внешних (цитозольных) ПН регулировать РТР скудны и противоречивы.

Теоретически, внешние ПН могут регулировать РТР путем связывания с аллостерическими центрами белков, входящими в состав поры, либо ее белков-регуляторов, а также через индукцию оксидоредуктазной активности белков внешних отделов митохондрий (внешней мембраны митохондрий (ОММ) и межмембранного пространства (IMS)), таких как VDAC, цитохром-b5-редуктаза (Cyb5R), синтаза оксида азота (NOS), НАДФН-оксидаза (NOX), апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), которые могут влиять на редокс процессы клетки. Кроме того, наличие в структуре молекул ПН АДФ делает переносчиков адениновых нуклеотидов (АНТ и короткий  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий митохондриальный переносчик (SCaMC)) потенциальными мишенями действия не только АДФ и АТР, но и НАД(Ф)(Н).

Известно, что пермеабиллизация митохондриальных мембран стимулирует продукцию активных форм кислорода (АФК). В патологических условиях, например, при ишемии-реперфузии, и в физиологических, при транзитном (кратковременном) открывании поры, наблюдаются так называемые «вспышки» супероксид-аниона (СА). Существует несколько гипотез их возникновения: повреждения дыхательных комплексов I, II, III, усиление скорости работы АФК-генерирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых дегидрогеназ матрикса, истощение антиоксидантной защиты в результате выхода глутатиона. Однако, роль ПН, поступающих в матрикс из цитозоля при пермеабиллизации митохондриальных мембран, в генерации АФК остается на данный момент не исследована.

#### **Цель исследования:**

Исследовать механизмы регуляции РТР и вспышек генерации супероксид-аниона, индуцированных пермеабиллизацией митохондриальных мембран, пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля.

#### **Задачи исследования:**

1. Выявить оптимальные для ингибирования РТР формы внешних пиридиновых нуклеотидов и условия ингибирования.
2. Исследовать роль VDAC в нуклеотид-зависимом ингибировании РТР.
3. Определить вклады переносчиков адениновых нуклеотидов АНТ и SCaMC в общий защитный эффект внешних пиридиновых нуклеотидов на митохондрии.
4. Оценить вклад НАД(Ф)Н в генерацию супероксид-аниона, вызванную пермеабиллизацией митохондриальных мембран.
5. Определить условия, способствующие продукции супероксид-аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран.

### **Научная новизна**

В работе изучено влияние ПН, оказываемое на индукцию РТР со стороны цитозоля, а также исследована роль внешних НАД(Ф)Н в генерации вспышек супероксид-аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран. Впервые показано, что НАДН и, в меньшей степени, НАД дозозависимо подавляют открывание РТР в терминально дифференцированных клетках, действуя через аллостерический нуклеотид-связывающий сайт, локализованный во внешних отделах митохондрий (ОММ или внешняя сторона IMM). Обнаружено, что АНТ модулирует защитное действие НАД(Н). НАД(Н) усиливает АНТ-опосредованный выход АТР из митохондрий. Впервые показано участие НАД(Ф)Н матрикса и цитозоля в генерации вспышек супероксидного аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран. Обнаружено, что главный вклад в данный процесс делают НАДФН-зависимые системы матрикса. Впервые описаны условия, способствующие появлению вспышек: пермеабиллизация митохондриальных мембран, наличие цитозольного НАД(Ф)Н и снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов в матриксе.

### **Научно-практическая значимость**

Полученные данные дают представление о ранее не известных механизмах участия пиридиновых нуклеотидов в регуляции жизнеспособности клеток при физиологических и патологических состояниях. Показано, что, с одной стороны, НАД(Н), наряду с адениновыми нуклеотидами, могут участвовать в цитопротекции путем ингибирования РТР. С другой стороны, в условиях, когда происходит пермеабиллизация митохондриальных мембран и падение уровня НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов в матриксе, НАД(Ф)<sup>+</sup>/НАД(Ф)Н могут поддерживать генерацию вспышек супероксид-аниона. Результаты исследования могут служить основой для дальнейшей идентификации нуклеотид-связывающего регулятора РТР во внешних отделах митохондрий. Идентифицируемый белок может являться перспективной мишенью для фармакологического воздействия с целью коррекции патологий, в основе которых лежит запуск клеточной гибели в результате открывания поры (например, ишемия/реперфузия) или ее ингибирование (злокачественные образования). Кроме того, установленное участие НАД(Ф)(Н) в генерации вспышек супероксид-аниона поможет выяснению процесса передачи сигналов между соседними митохондриями, результатом которого является вторичная продукция АФК и индукция РТР.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Цитозольные НАД(Н) являются аллостерическими ингибиторами РТР в терминально дифференцированных клетках. Сайт их действия расположен во внешних отделах митохондрий.

2. АНТ модулирует ингибиторное действие НАД(Н), оказываемое на РТР. Цитозольные НАД и НАДН усиливают АНТ-опосредованный выход АТР из митохондрий.

3. В пермеабелизованных митохондриях окисление НАДФН и НАДН до определенных значений редокс-потенциала сопровождается генерацией вспышек супероксид-аниона. Главный вклад в данный процесс делают НАДФН-зависимые системы матрикса.

4. Условиями, способствующими генерации вспышек супероксид-аниона в митохондриях, являются: пермеабелизация мембран (по любому механизму), доступность цитозольного НАД(Ф)Н и снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов.

### **Личный вклад диссертанта**

Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

### **Связь с государственными программами**

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 19-04-00327-а), РНФ (№ 17-75-10122), Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 14.Z50.31.0028).

### **Апробация диссертации**

Результаты работы были представлены в качестве докладов или стендовых сообщений на следующих научных мероприятиях: Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология наука XXI века» (Пущино, Россия, 2017, 2018, 2019 гг.); 2-ая Международная научная конференция «Science of the Future» (Казань, Россия, 2016); EMBO/FEBS Course Mitochondria in Life, Death and Disease (Фазано (Бр.), Италия, 2017); 20th ISANH International conference on oxidative stress, redox homeostasis and antioxidants Parix Redox (Париж, Франция, 2018); 10th World Congress on Targeting Mitochondria (Берлин, Германия, 2019).

## **Публикации**

По результатам работы опубликовано 4 статьи в научных журналах, включенных в перечень ВАК, 3 из них входят в базы данных WoS, Scopus, РИНЦ и 1 – в РИНЦ. Кроме того, опубликована 1 монография и 7 публикаций в материалах всероссийских и международных конференций.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа содержит введение, литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и список литературы. Работа изложена на 123 страницах, содержит 27 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 321 источник отечественной и зарубежной литературы.

## **Список сокращений**

АН – адениновые нуклеотиды, АНТ – транслоказа адениновых нуклеотидов, БК – бонгкрековая кислота, ВПМН – время полумаксимального набухания, КАТР – карбоксиатрактилозид, ПН – пиридиновые нуклеотиды, СА – супероксид-анион, ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусной кислоты, IMM – внутренняя мембрана митохондрий, НК – гексокиназа, MCLA – 3,7-дигидро -2-метил-6-(4-метоксифенил)имидазол[1,2-а]пирозин-3-дин, OMM – внешняя мембрана митохондрий, РТР –  $Ca^{2+}$ -зависимая неспецифическая митохондриальная пора, RLM – митохондрии печени крысы, SCaMC – короткий  $Ca^{2+}$ -связывающий митохондриальный переносчик, VDAC – потенциал-зависимый анионный канал, TRP<sup>+</sup> - тетрафенилфосфоний.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объект исследования.** В работе были использованы культуры клеток (HEp-2, THP-1, MEF, HEK293T), выделенные гепатоциты и кардиомиоциты крыс, а также интактные митохондрии печени крыс.

**Культуры клеток.** Клетки MEF, HEK293T, HEp-2 росли в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 80 мг/л гентамицина и 20 мМ бикарбоната натрия. THP-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением  $2 \times 10^{-5}$  М 2-меркаптоэтанола, 10% FBS, 80 мг/л гентамицина. Все культуры клеток содержались в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

**Гепатоциты** выделяли из печени крыс путем перфузии печени раствором коллагеназой IV типа и дальнейшим центрифугированием (50 g, 2 мин при 4°C) [Herman *et al.*, 1988].

**Кардиомиоциты** получали разрушением ткани сердца протеазой XIV типа, коллагеназой IV типа и дальнейшим центрифугированием (700 g, 1 мин) [Maltsev *et al.*, 2014].

**Митохондрии** (rat liver mitochondria, RLM) выделяли из печени самцов крыс стандартным методом дифференциального центрифугирования [Johnson *et al.*, 2005].

**Оценку количества повреждённых митохондрий** проводили путем сравнения скорости восстановления добавленного цитохрома *c* условно интактными митохондриями и полностью пермеабелизованными порообразующим белком аламетицином.

**Количество белка** в митохондриях определяли биуретовым методом [Walker *et al.*, 1994].

**Пермеабелизацию митохондриальных мембран** индуцировали добавлением высоких концентраций кальция (обычно 20-200 мкМ), порообразующего белка аламетицина, а также добавлением среды с низкой осмолярностью (менее 300 мОсм).

**Размер пор во внутренней мембране митохондрий** определяли с помощью теста на исключаемый размер молекул растворенных веществ (абсорбция, 550 нм) при добавлении растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ) с разной молекулярной массой (200-8000 Да).

**Регистрацию высокоамплитудного набухания митохондрий** проводили с помощью планшетного ридера (Infinite 200 Tecan). Набухание митохондрий регистрировали по изменению светопоглощения митохондриальной суспензии при  $\lambda = 550$  нм.

**Потребление кислорода, трансмембранный потенциал и кальциевую емкость митохондрий** определяли с использованием термостатируемой ячейки со встроенными электродами: кислородным, ионселективными тетрафенилфосфониевым и кальциевым.

**Содержание АТФ в митохондриальной суспензии** было измерено с помощью АТФ Biomass Kit HS в соответствии с инструкцией производителя.

**Окисление НАД(Ф)Н** регистрировали по интенсивности флуоресценции (Ex 340/Em 460–480 нм).

**Редокс-потенциалы НАД(Ф)/НАД(Ф)Н** рассчитывали по уравнению Нернста.

**Уровень супероксид-аниона** измеряли по СОД-зависимой хемилюминесценции высокоселективного зонда 2-метил-6-(*p*-метоксифенил)-3,7-дигидроксиимидазол[1,2-пиразин-3-он (MCLA) в концентрации 10-20 мкМ [Kambayashi *et al.*, 2003].

**Уровень пероксида водорода** измеряли с помощью флуоресцентного зонда Amplex Red по накоплению флуоресцирующего продукта резорфина [Perschke *et al.*, 1961].

**Активность аконитазы** измеряли путем регистрации флуоресценции при восстановлении НАДФ в изоцитратдегидрогеназной реакции [Gardner *et al.*, 2002].

**Экспрессию белков** определяли с помощью метода вестерн-блот.

**Статистическая обработка:** результаты исследований представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего для трех экспериментов, как минимум. Статистическую значимость (*p*) рассчитывали с помощью критерия Манна-Уитни.



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние добавленных ПН на индукцию неспецифической $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры

Для измерения открывания РТР в настоящей работе были применены два разных метода: измерение кальциевой емкости и регистрация ЭГТА- и CsA-чувствительного высокоамплитудного набухания. Поскольку набухание представляет собой динамичный процесс, для его количественной оценки удобно применять два параметра: время полумаксимального набухания (ВПМН) и амплитуду набухания в конкретное время после добавки  $\text{Ca}^{2+}$ . Способ определения данных параметров продемонстрирован на рис. 1 на примере влияния различных концентраций НАДН на набухание RLM. Мы полагаем, что ВПМН отражает время после добавки  $\text{Ca}^{2+}$ , при котором РТР индуцирована в 50% митохондрий в образце, тогда как амплитуда набухания отражает долю набухших митохондрий в суспензии.

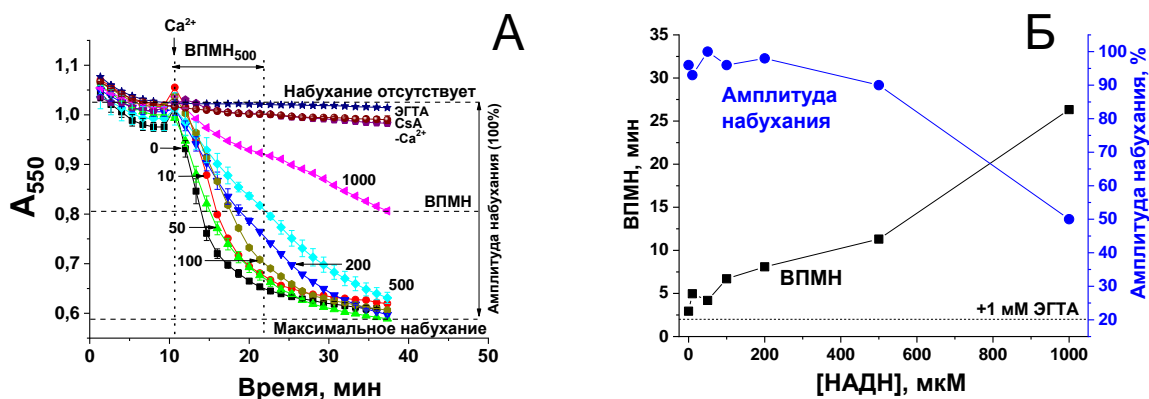
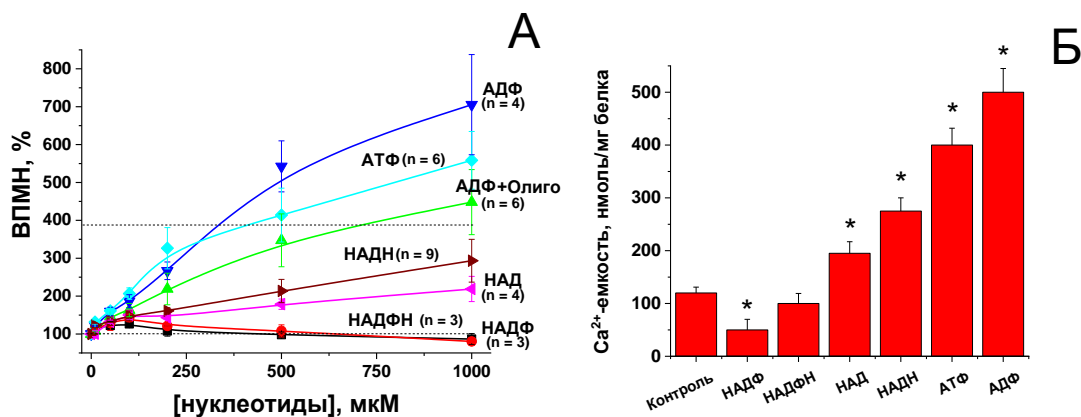


Рис. 1. Количественная оценка индукции РТР путем определения ВПМН и амплитуды набухания митохондрий. А. Стандартные кривые  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного набухания митохондрий в присутствии и отсутствии НАДН. Митохондрии (0.5 мг/мл) помещали в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ глутамат, 5 мМ малат, 10 мкМ ЭГТА и, где указано, 1 мМ ЭГТА, 1 мкМ CsA и НАДН в указанных концентрациях. Стрелкой показана добавка 30 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ . Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ). Горизонтальные пунктирные линии показывают значения абсорбции, соответствующие нулевому, полумаксимальному и максимальному набуханию. Вертикальные пунктирные линии показывают ВПМН в присутствии 500 мкМ НАДН ( $\text{ВПМН}_{500}$ ). Б. Зависимость среднего ВПМН и средней амплитуды набухания от концентрации НАДН для эксперимента на панели А. Нижняя пунктирная линия показывает амплитуду РТР-независимого набухания митохондрий (в присутствии 1 мМ ЭГТА). Верхняя пунктирная линия показывает время окончания регистрации.

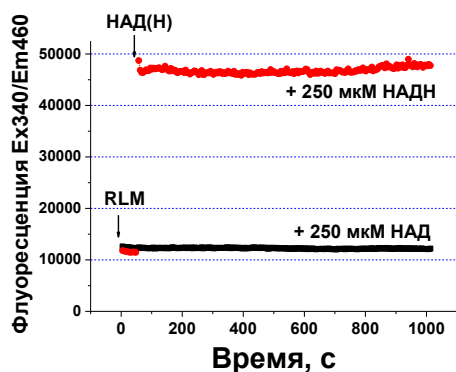
**Влияние ПН на индукцию РТР в изолированных митохондриях печени крыс.** На рис. 2 представлены данные об эффекте добавленных ПН и АН на набухание и  $\text{Ca}^{2+}$ -емкость митохондрий печени крыс. АН ингибировали открывание РТР и их действие было дозозависимым. Максимальный защитный эффект наблюдался при миллимолярных концентрациях, характерных для цитозоля клетки и превышающих необходимые для связывания с АНТ. НАД(Н) и НАДФ(Н) по-разному действовали на индукцию РТР.

НАДН и НАД так же, как и АН, дозозависимо ингибировали открывание РТР. В 1 мМ концентрации они увеличивали ВПМН в 2.9 (НАДН) и 2.2 (НАД) раза (А). Кроме того, данные нуклеотиды увеличивали  $\text{Ca}^{2+}$ -емкость митохондрий в 2.3 (НАДН) и 1.6 (НАД) раз (Б). НАДФН и НАДФ в низких концентрациях (50-200 мкМ) слабо ингибировали индукцию РТР (А). В высоких концентрациях (0.5-1 мМ), наоборот, оказывали слабый стимулирующий эффект.



**Рис. 2.** Эффект различных нуклеотидов на набухание (А) и  $\text{Ca}^{2+}$ -емкость (Б) митохондрий печени крыс. RLM (0.75 (А) и 1 (Б) мг/мл) были помещены в стандартную КСI-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). А. Суспензию митохондрий помещали в ячейки планшета, в которые были добавлены, где указано, олигомицин (2.5 мкг/мл, Олиго) и нуклеотиды в обозначенных концентрациях и инкубировали в течении 5 мин перед добавкой 20 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$ . Значения выше пунктирной линии были получены путем экстраполяции кривых абсорбции. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n \geq 3$ ). Б. Концентрация нуклеотидов равна 1 ммоль/л. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3-6$ ) для трех независимых экспериментов. \* -  $p < 0.01$  по сравнению с контролем.

Теоретически внешний НАД(Н) может ингибировать индукцию РТР прямо, связываясь с аллостерическим сайтом регуляции, либо опосредованно, влияя на работу НАД(Н) – зависимых дегидрогеназ внешних отделов митохондрий. Значения  $K_m$  оксидоредуктаз для НАД(Н) лежат в диапазоне 1-100 мкМ. Однако в наших условиях самое сильное подавление открывания РТР наблюдается при миллимолярных концентрациях НАД(Н), что указывает на аллостерический сайт действия. Регистрация флуоресценции ПН показала, что митохондрии не окисляют и не восстанавливают внешний НАД(Н) (рис. 3).



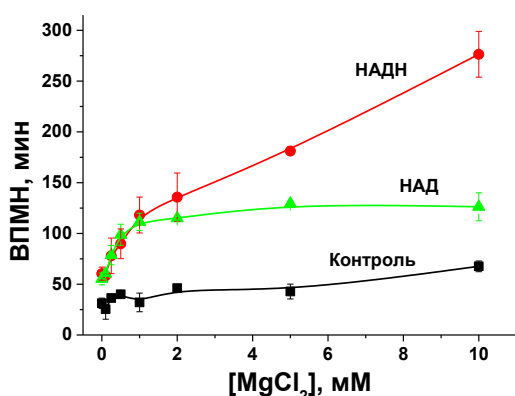
**Рис. 3.** Ингибирование индукции РТР не требует окисления и восстановления внешнего НАД(Н). Показана динамика флуоресценции ПН в суспензии митохондрий в присутствии 250 мкМ НАД и НАДН. RLM (0.5 мг/мл) помещали в стандартную КСI-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Показаны типичные кривые одного из трех аналогичных экспериментов.

Таким образом, эффект НАД(Н) не связан с работой какой-либо НАД(Н)-зависимой оксидоредуктазы и данные нуклеотиды ингибируют открывание РТР путем связывания с внешним аллостерическим регуляторным сайтом.

Таким образом, НАДН и НАД, действуя со стороны цитозоля, оказывают ингибирующее действие на индукцию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой неспецифической поры в изолированных митохондриях и этот эффект сравним с действием АН. Так как НАД(Н) не способны проникать в матрикс, полученные данные указывают на то, что во внешних отделах митохондрий существует ранее неизвестный НАД(Н) – зависимый аллостерический регулятор РТР.

**Влияние  $\text{Mg}^{2+}$  на подавление открывания РТР с помощью НАД(Н).** Известно, что открывание РТР ингибируется добавлением ионов  $\text{Mg}^{2+}$ . Также показано, что он увеличивает ингибиторный эффект АН, оказываемый на индукцию поры. При этом механизм действия  $\text{Mg}^{2+}$  на РТР точно не определен. Предполагается, что он может конкурировать с  $\text{Ca}^{2+}$  за сайты связывания на компонентах поры.

В наших условиях ингибиторное действие НАД(Н) было обнаружено в среде, содержащей 2 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  (см. рис. 2). На рис. 4 показано, что  $\text{Mg}^{2+}$  в концентрациях от 100 мкМ до 10 мМ постепенно увеличивал ВПМН митохондрий и линейно усиливал ингибирование РТР, вызванное 1 мМ НАДН.  $\text{Mg}^{2+}$  в концентрациях до 2 мМ линейно увеличивал защитное действие НАД без полного ингибирования РТР.

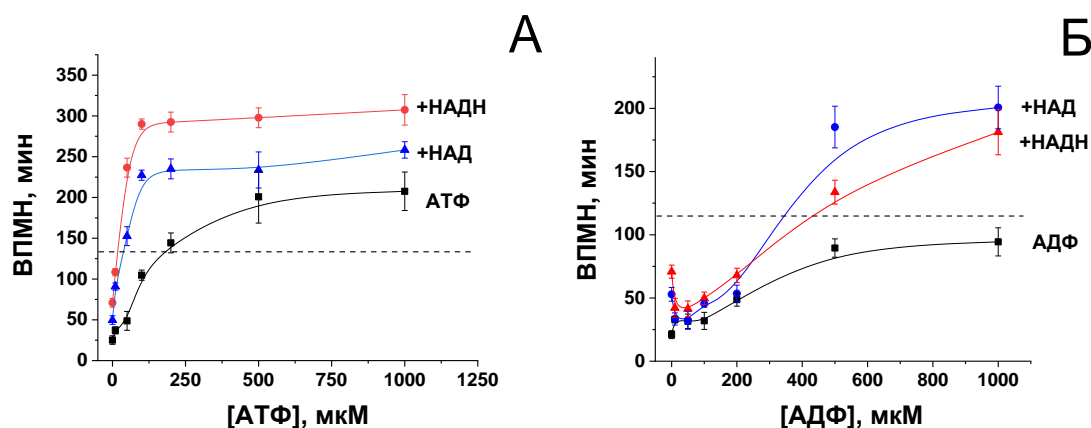


**Рис. 4. Эффект  $\text{Mg}^{2+}$  на НАД(Н)-зависимое ингибирование открывания РТР.** Митохондрии (0.75 мг/мл) помещали в стандартную КСI-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 10 мкМ ЭГТА, ротенон (2 мкг/мл) и, где указано, 1мМ НАД(Н) и  $\text{MgCl}_2$  в различных концентрациях. Открывание РТР индуцировали путем добавления  $\text{Ca}^{2+}$  (37.5 нмоль/мг белка). Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (n=9).

Способность НАД(Н) и  $\text{Mg}^{2+}$  синергично подавлять РТР может указывать либо на взаимодействие комплекса  $\text{Mg}$ -НАД(Н) с внешним регулятором РТР или на их синергичный эффект, оказываемый на различные сайты. Можно предположить, что  $\text{Mg}^{2+}$  в матриксе конкурирует с  $\text{Ca}^{2+}$  за связывающий сайт, тогда как НАДН действует на внешний регуляторный сайт. С другой стороны, в наших условиях наблюдается линейное увеличение защитного эффекта НАДН при росте концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  до 10 мМ. Такой

эффект, возможно, указывает на действие на внешний регуляторный сайт РТР образующихся комплексов Mg-НАДН. Ранее было показано, что величина  $K_d$  НАДН для  $Mg^{2+}$  может равняться 80 мМ [Lee *et al.*, 1996]. Эффект НАД плюс  $Mg^{2+}$  был менее выраженным, так как  $K_d$  НАД для  $Mg^{2+}$  может быть даже выше, чем для НАДН [Lee *et al.*, 1996].

**Сочетанный эффект добавленных НАД(Н) и АН на индукцию РТР.** Адениновые нуклеотиды являются мощными ингибиторами РТР. Мы проверили, каким образом они влияют на проявление защитного эффекта НАД(Н) (рис. 5). АТФ в низких концентрациях ( $\leq 250$  мкМ) увеличивал ВПМН RLM в присутствии 1 мМ НАДН (в 1.5 – 4.1 раз) и 1 мМ НАД (в 1.5 – 4.7 раз) (А). Напротив, АДФ в низких концентрациях снижал ВПМН в присутствии НАДН и НАД (до 1.7 и 1.6 раз, соответственно) (Б). АН в высоких концентрациях (0.5–1 мМ) мощно подавляли набухание митохондрий в присутствии НАД(Н), при этом АТР в концентрациях  $\geq 0.5$  мМ полностью предотвращал набухание.



**Рис. 5. Комбинированный эффект НАД(Н) и АН на ВПМН митохондрий.** RLM (0.75 мг/мл) помещали в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ  $MgCl_2$ , 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Открывание РТР индуцировали путем добавления 40 мкМ  $Ca^{2+}$ . Где указано, среда измерения содержала 1 мМ НАДН, 1 мМ НАД, а также АН в указанных концентрациях. В АДФ-содержащие образцы был добавлен олигомицин (2.5 мкг/мл). Значения выше пунктирной линии были получены путем экстраполяции кривых абсорбции. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (n=9).

Инкубация RLM при одновременном добавлении НАДН (1мМ) и АТР (1мМ) или НАДН (1мМ) и АДФ (1мМ) приводила к аддитивному увеличению  $Ca^{2+}$ - емкости митохондрий, которая была равна: НАДН = 275, АТР = 400, АДФ = 500, НАДН+АТР = 650, НАДН+АДФ = 650, контроль = 120 (указаны средние значения, нмоль/мг белка.).

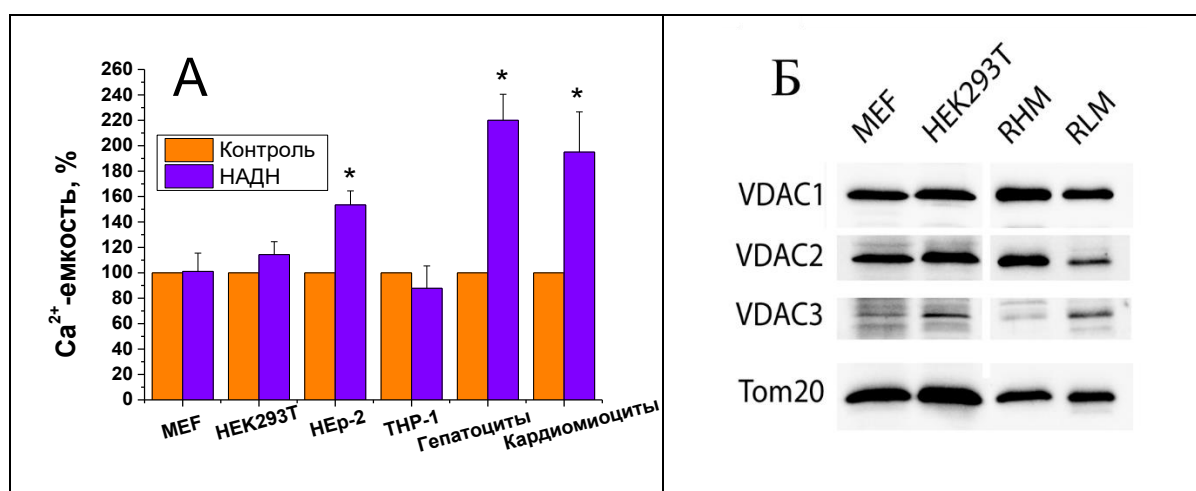
Таким образом, защитное действие НАД(Н) и АН (в концентрациях  $\geq 250$  мкМ) осуществляется через разные сайты, поскольку их совместный эффект равен сумме индивидуальных эффектов. НАД(Н) и АДФ (в концентрациях  $\leq 250$  мкМ) действуют антагонистично, что указывает на конкуренцию за один сайт, возможно, АНТ.

### Эффект НАДН на $\text{Ca}^{2+}$ -емкость митохондрий пермеабелизованных клеток.

Среди НАД(Н)-связывающих белков внешних отделов митохондрий VDAC1 представляется наиболее подходящим кандидатом на роль НАД(Н)-зависимого регулятора РТР. Он является регулятором РТР и, предположительно, входит в состав поры [Chinopoulos, 2018]. Также он взаимодействует с другими регуляторами РТР: белками (АНТ, гексокиназа (HK), глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (GAPDH)) [Abu-Namad *et al.*, 2008; Allouche *et al.*, 2012; Tarze *et al.*, 2007], дивалентными катионами ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) [Báthori *et al.*, 2006] и нуклеотидами (АТФ/АДФ) [Villinger *et al.*, 2014; Yehezkel *et al.*, 2006]. Кроме того, ранее было показано, что НАД(Н) способен снижать проницаемость VDAC для  $\text{Ca}^{2+}$  и других малых ионов [Rostovtseva *et al.*, 2002].

Для определения роли канала VDAC в НАДН-зависимом ингибировании РТР была проанализирована зависимость эффекта нуклеотида от уровня экспрессии изоформ VDAC в эмбриональных (MEF, HEK293T), раковых (HEp-2, THP-1) и дифференцированных клетках (изолированные гепатоциты и кардиомиоциты крыс).

НАДН не влиял на  $\text{Ca}^{2+}$ -емкость пермеабелизованных с помощью дигитонина эмбриональных и раковых клеток, но увеличивал данный параметр в гепатоцитах (в 2.2 раза) и в кардиомиоцитах (в 1.9 раз) (рис. 6, А). В то же время, как эмбриональные, так и дифференцированные клетки несли полный набор изоформ VDAC (В).



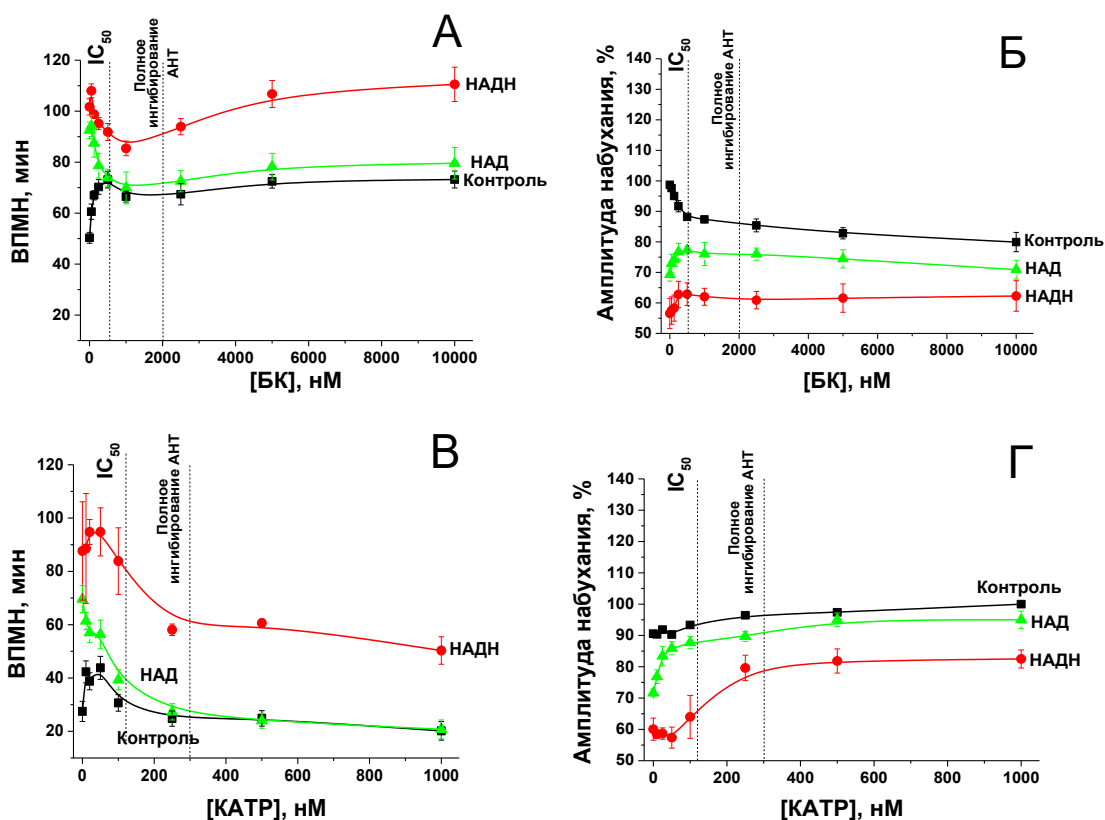
**Рис. 6. Влияние НАДН на  $\text{Ca}^{2+}$ -емкость митохондрий в эмбриональных, раковых и дифференцированных клеточных линиях.** Перед измерением клетки были отмыты в стандартной среде инкубации и пермеабелизованы дигитонином (10 мкМ/млн клеток). **А.** 100%  $\text{Ca}^{2+}$ -емкость соответствует  $47.8 \pm 5.8$  (MEF),  $56.5 \pm 7.3$  (HEK293T),  $41.7 \pm 15.8$  (HEp-2),  $73.3 \pm 6.7$  (THP-1),  $128.6 \pm 34.1$  (гепатоциты) и  $168.3 \pm 40.5$  нмоль/млн клеток (кардиоциты). **Б.** В гель добавляли 40 мкг белка лизатов MEF и HEK293T и 10 мкг белка RLM и RHM.

Ранее было показано, что НК I и II, тубулин и GAPDH сверхэкспрессируются в недифференцированных раковых клетках и повышают их жизнеспособность [Halestrap *et*

*al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2018]. Если НАДН и данные белки конкурируют за общий сайт связывания на молекуле VDAC, их диссоциация будет увеличивать чувствительность РТР к НАДН. Однако реагенты, вызывающие диссоциацию НК и VDAC, а именно, глюкозо-6-фосфат и метил ясонат, не увеличили защитный эффект НАДН на клетки MEF и НЕК293Т. Также эффекта не оказал эрастин, индуцирующий диссоциацию тубулина.

Полученные данные указывают на то, что способность НАДН подавлять открывание РТР может зависеть от степени дифференцировки клеток. Кроме того, результаты не подтверждают роль VDAC в НАД(Н)-зависимом ингибировании открывания РТР, либо указывают на действие его партнера – антагониста НАД(Н).

**Эффект ингибиторов АНТ на подавление открывания РТР внешними ПН.** Для оценки участия АНТ в НАД(Н)-опосредованном ингибировании РТР был исследован эффект его конформационно-специфических ингибиторов карбоксиатрактилозида (КАТР) и бонкрековой кислоты (БК) на защитное действие нуклеотидов. КАТР стабилизирует АНТ в цитозольной «с»-конформации, БК – в «т»-конформации [Haworth, Hunter, 2000].



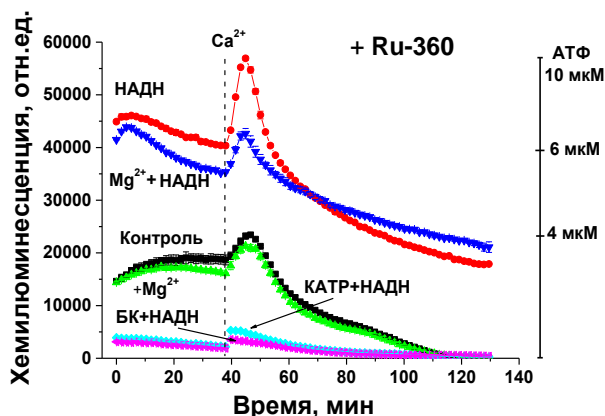
**Рис. 7. Эффект КАТР и БК на НАД(Н)-зависимое подавление открывание РТР.** Митохондрии (0.75 мг/мл) помещали в стандартную KCl-среду, содержащую 5 мМ сукцинат, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мкМ ЭГТА и ротенон (2 мкг/мл). Концентрация нуклеотидов равна 1 мМ. КАТР был добавлен одновременно с нуклеотидами, БК за 5 мин. После 5 мин инкубации с нуклеотидами был добавлен Ca<sup>2+</sup> (35 нмоль/мг белка). Амплитуда набухания (Б и Г) была определена на 150 мин инкубации. Показаны типичные данные одного из двух аналогичных экспериментов, каждый из которых состоял из трех титрований. Представленные данные есть среднее ± стандартная ошибка среднего (n=3).

Сначала были определены концентрации кислот, индуцирующие максимальное и полумаксимальное ( $IC_{50}$ ) ингибирование АНТ, путем измерения их влияния на АДФ-стимулированное дыхания ( $V_3-V_{\text{олиго}}$ ). КАТР подавлял АНТ с  $IC_{50}$ , равной  $\sim 120$  нМ, БК – 540 нМ. 2 мкМ БК и  $\sim 300$  нМ КАТР полностью ингибировали АНТ.

На рис. 7 показано, что при стабилизации 50% АНТ в «с»- (В и Г), либо «т»-конформации (А и Б) добавление НАД не вызывает увеличения ВПМН, и слабо снижает амплитуду набухания только в случае БК (А-Г). Защитный эффект НАДН остается сильным. В условиях полного ингибирования АНТ НАД не оказывает влияния на ВПМН и слабо снижает амплитуду набухания в присутствии БК. Полная стабилизация транслокатора в «т»-конформации не оказывает влияния на защитное действие НАДН. КАТР снижает ВПМН для НАДН в 2 раза и увеличивает амплитуду набухания на 20%, но не подавляет полностью эффект нуклеотида.

Таким образом, конформация АНТ модулирует защитный эффект НАД(Н) в отношении РТР. При этом 100% - ингибирование переносчика в любой конформации почти полностью подавляет эффект НАД. Эти данные можно интерпретировать двояко. Во-первых, как действие НАД(Н) через два сайта: НАД – через АНТ и НАДН через АНТ и дополнительный сайт. Во-вторых, это может говорить о разной способности НАДН и НАД вызывать конформационные изменения регулятора РТР. АНТ может быть мишенью прямого воздействия НАД(Н), либо нуклеотиды могут действовать на белок, находящийся в комплексе с АНТ и регулирующий его конформационное состояние.

**Активация выхода АТФ из митохондрий при действии НАД(Н).** Ранее было показано, что  $Ca^{2+}$  может активировать выход  $MgATP^{2-}$  из матрикса через  $SCaMC$  (в обмен на внешний  $НАДФ^{2-}$  или Фн), что должно снижать  $Ca^{2+}$ -буферную емкость матрикса и индуцировать открывание РТР [Hagen *et al.*, 2003]. Мы проверили, может ли НАД(Н) ингибировать выход АТФ из RLM и, тем самым, увеличивать  $Ca^{2+}$ -буферную емкость матрикса.



**Рис. 8. НАДН активирует выход АТФ из митохондрий.** Стандартная среда инкубации содержала 20% АТР-реагент, 5 мМ сукцинат, 2 мкг/мл ротенон, 10 мкМ ЭГТА и 250 нМ Ru-360. Концентрация митохондрий в суспензии равна 0.7 мг/мл. Где указано, среда также содержала 1 мкМ КАТР, 10 мкМ БК, 2 мМ НАДН, 2 мМ НАДН и 2 мМ  $Mg^{2+}$ . Вертикальная пунктирная линия обозначает добавку 100 мкМ  $Ca^{2+}$ . Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ).

$\text{Ca}^{2+}$  в присутствии Ru-360, ингибитора кальциевого унипортера, активировал выход АТР, возможно, путем активации SCaMC (рис. 8). Добавка НАДН и НАД стимулировала выход АТФ из RLM (рис. 8, показан эффект НАДН). КАТР и БК подавляли НАД(Н)-стимулируемый выход АТФ, следовательно, он осуществлялся за счет работы АНТ.  $\text{Mg}^{2+}$  в присутствии и отсутствии НАД(Н) оказывали минимальный эффект на выход АТФ.

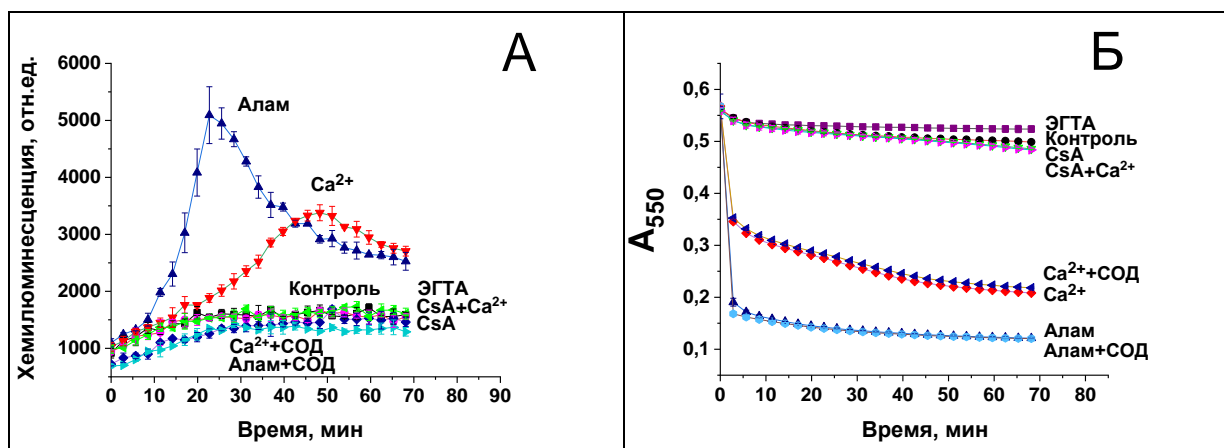
Таким образом, НАД(Н), прямо, либо путем связывания с партнерами АНТ, усиливают выход АН через АНТ и не подавляют  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированный выход АТФ. Следовательно, механизм подавления РТР внешним НАД(Н) не связан с накоплением АН в матриксе и SCaMC не является НАД(Н)-связывающим регуляторным сайтом.

## **2. Регуляция всплеск СА, индуцированных пермеабиллизацией митохондриальных мембран, внешним НАД(Ф)Н**

Известно, что  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое открывание РТР стимулирует генерацию АФК, в том числе, СА, в изолированных митохондриях [Andrienko *et al.*, 2016; Leverve *et al.*, 2004]. На данный момент механизмы данного явления остаются не выясненными. Мы предположили, что ПН, которые являются субстратами митохондриальных оксидоредуктаз и регуляторами редокс-состояния среды, могут вносить большой вклад в генерацию АФК при поступлении в матрикс из-за пермеабиллизации IMM. При исследовании данного вопроса для детекции СА был использован высокочувствительный хемоллюминесцентный зонд MCLA. Эксперименты были выполнены на митохондриях печени крыс.

***Активация продукции АФК при пермеабиллизации митохондриальных мембран.*** Для пермеабиллизации митохондриальных мембран мы использовали пороформирующий белок аламетицин, а также высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , вызывающие открывание РТР. Оба метода индукции пермеабиллизации приводили к набуханию митохондрий (рис. 9, Б), которое сопровождалось продукцией СА (А). Продукция АФК и набухание в митохондриях, пермеабиллизованных с помощью аламетицина, были намного сильнее, чем в обработанных  $\text{Ca}^{2+}$  органеллах. Причиной этого может являться пермеабиллизация IMM во всей популяции митохондрий при добавлении аламетицина. Также в процессе открывания РТР происходит окисление ПН матрикса [Brunner *et al.*, 2001] и они не могут поддерживать генерацию АФК.





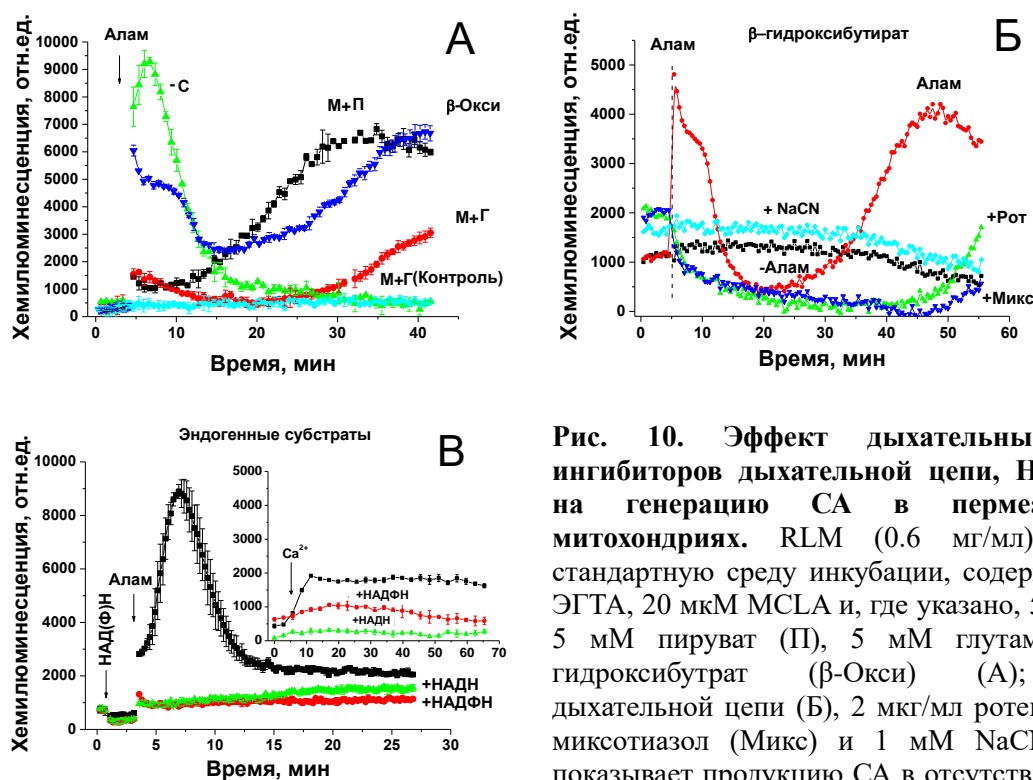
**Рис. 9. Пермеабиллизация митохондриальных мембран вызывает продукцию СА.** RLM (0.5 мг/мл) были помещены в среду инкубации, содержащую 5 мМ малат, 5 мМ пируват, 10 мкМ ЭГТА и 20 мкМ MCLA (А). Суспензию помещали в ячейки, содержащие, где указано, 40 мкг/мл аламеицин (Алам), 1 мкМ CsA, 1 мМ ЭГТА, 50 мкМ CaCl<sub>2</sub>, СОД (100 ед./мл), CsA плюс Ca<sup>2+</sup> и СОД плюс Ca<sup>2+</sup>. Регистрация MDCL (А) и Ca<sup>2+</sup>- и аламетицин-индуцированного набухания (Б) проводилась одновременно. Показаны типичные данные одного из четырех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее ± стандартная ошибка среднего (n=3).

Большой эффект аламетицина по сравнению с Ca<sup>2+</sup> позволяет предположить, что в основе усиления генерации АФК не лежит работа Ca<sup>2+</sup>-активируемых дегидрогеназ матрикса и РТР-зависимые изменения в структуре дыхательных комплексов. Основываясь на описанных выше результатах, можно заключить, что пермеабиллизация ИММ вызывает сильное увеличение генерации АФК независимо от того, чем она индуцирована (аламетицин или кальций).

*Эффект дыхательных субстратов и ингибиторов дыхательной цепи на продукцию СА в пермеабиллизованных митохондриях.* НАД(Ф)Н являются донорами электронов для митохондриальных АФК-генерирующих ферментов. Пермеабиллизация мембран может вызывать ускорение окисления и выход субстратов дыхания, а также выход ПН. В результате НАД(Ф)Н получает доступ к дегидрогеназам внешних компарментов (AIF1, цитохром-b5-редуктаза 3, NOX4). Все эти условия могут способствовать кратковременной вспышке СА. Поэтому мы предположили, что добавление дыхательных субстратов, а также НАДН, НАДФН и ингибиторов их окисления будет поддерживать продукцию СА в пермеабиллизованных митохондриях.

Аламетицин вызывал быструю активацию генерации СА в отсутствии добавленных субстратов (-С) (рис. 10). Субстраты НАД- и НАДФ- зависимых дегидрогеназ (β-гидроксibuтират, малат, глутамат, пируват) задерживали и снижали максимальную продукцию СА (А). Ингибиторы дыхательной цепи (ротенон, миксотиазол, цианид) также сильно замедляли появление пика продукции СА (Б). И НАДН, и НАДФН в высоких

концентрациях относительно слабо стимулировали продукцию СА, но полностью подавляли появление его вспышки (В).

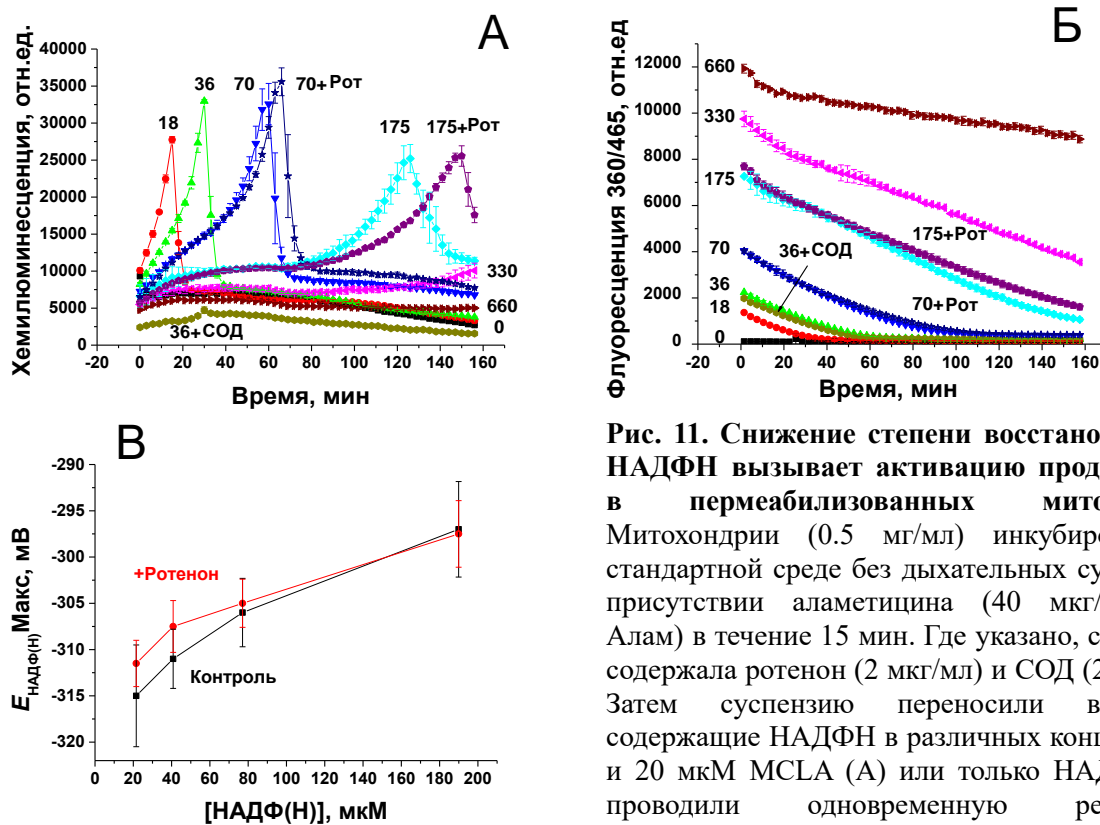


**Рис. 10.** Эффект дыхательных субстратов, ингибиторов дыхательной цепи, НАДН, НАДФН на генерацию СА в пермеабилizованных митохондриях. RLM (0.6 мг/мл) помещали в стандартную среду инкубации, содержащую 10 мкМ ЭГТА, 20 мкМ МСЛА и, где указано, 5 мМ малат (М), 5 мМ пируват (П), 5 мМ глутамат (Г), 5 мМ гидроксибутират ( $\beta$ -Окси) (А); ингибиторы дыхательной цепи (Б), 2 мкг/мл ротенон (Рот), 2 мМ миксотиазол (Микс) и 1 мМ NaCN. Линия «-С» показывает продукцию СА в отсутствии дыхательных субстратов. Контрольные ячейки содержали СОД (200

ед./мл). Стрелки 30 мкг/мл аламетитина (Алам), 2 мМ НАДН и 2 мМ НАДФН (В). Представлена СОД-чувствительная часть сигнала MDCL. Вставка на панели В показывает эффект 1 мМ НАДН и НАДФН на генерацию СА в митохондриях, пермеабилizованных с помощью  $Ca^{2+}$ . Показаны типичные данные одного из четырех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (n=3).

По-видимому, условия, способствующие поддержанию митохондриальных НАД(Ф)Н-связывающих редокс-центров в восстановленном состоянии, предотвращают вспышки СА. Поэтому далее было исследовано влияние редокс-состояния НАД(Ф)Н на генерацию СА.

**Генерация вспышек СА в пермеабилizованных митохондриях в присутствии НАД(Ф)Н.** Для более подробного исследования эффекта НАД(Ф)Н было оценено влияние различных концентраций данного нуклеотида на генерацию СА. Добавление 18 мкМ НАДФН к предварительно пермеабилizованным митохондриям вызывало незамедлительную сильную активацию продукцию СА (вспышку) (рис. 11, А). Увеличение концентрации НАДФН постепенно отодвигало начало генерации СА и при 660 мкМ НАДФН полностью предотвращало появление вспышки на всем протяжении эксперимента. Регистрация флуоресценции ПН показала, что пик генерации СА появлялся только тогда, когда основной пул НАДФН был окислен (Б).



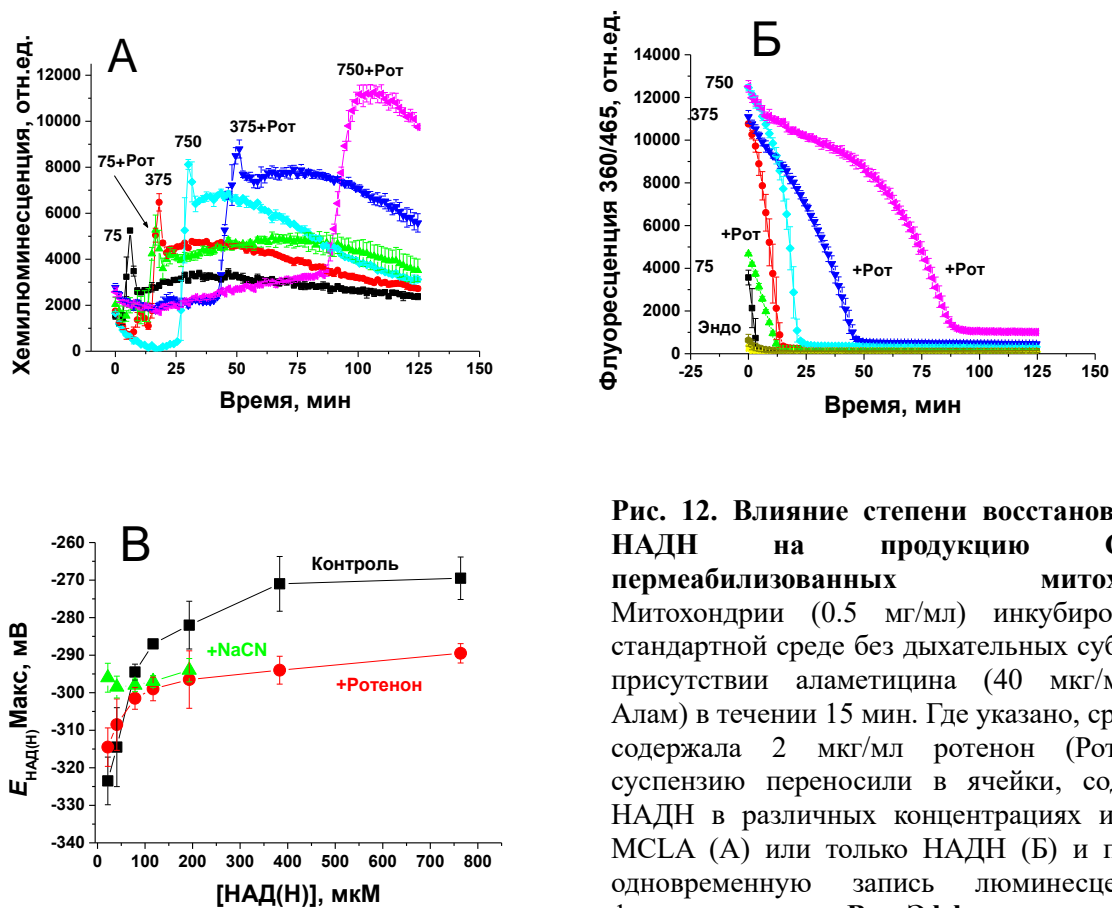
**Рис. 11. Снижение степени восстановленности НАДФН вызывает активацию продукции СА в пермеабелизованных митохондриях.** Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировались в стандартной среде без дыхательных субстратов в присутствии аламетицина (40 мкг/мг белка, Алам) в течение 15 мин. Где указано, среда также содержала ротенон (2 мкг/мл) и СОД (200 ед./мл). Затем суспензию переносили в ячейки, содержащие НАДФН в различных концентрациях и 20 мкМ МСЛА (А) или только НАДФН (Б) и проводили одновременную регистрацию люминесценции и флуоресценции. На панели А и

Б показаны типичные данные одного из трех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ). Данные на панели В представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка для трех независимых экспериментов ( $n=9$ ).

Ротенон оказывал слабый эффект на скорость окисления НАДФН и на время активации продукции СА. При решении уравнения Нернста были получены динамики редокс-потенциалов НАДФ/НАДФН ( $E_{\text{НАДФ(Н)}}$ ) для каждой исследованной концентрации нуклеотидов. Сопоставление динамик МДСЛ и  $E_{\text{НАДФ(Н)}}$  позволяет определить величину  $E_{\text{НАДФ(Н)}}$ , при которой происходила максимальная продукция СА ( $E_{\text{НАДФ(Н)Max}}$ ). Увеличение общей концентрации НАДФ(Н) в суспензии сдвигает  $E_{\text{НАДФ(Н)Max}}$  к более положительным значениям (от -315 до -295 мВ) (В). Эти данные показывают, что снижение отношения НАДФН/НАДФ ниже определенного уровня увеличивает возможность электронной утечки из редокс центров на кислород.

Активация продукции СА в пермеабелизованных митохондриях в присутствии НАДН происходит только после окисления его основного пула, так же, как и в случае НАДФН (Рис. 12, А и Б).

НАДН-зависимая генерация СА была в несколько раз слабее, чем в НАДФН-зависимая (рис. 11, А и рис. 12, А), следовательно, НАДФН-зависимые системы являются главным источником СА в пермеабелизованных митохондриях. Ротенон (Б) ингибировал окисление НАДН и отодвигал начало активации генерации СА (рис. 12, А и В).



**Рис. 12. Влияние степени восстановленности НАДН на продукцию СА в пермеабилizованных митохондриях.** Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировались в стандартной среде без дыхательных субстратов в присутствии аламетицина (40 мкг/мг белка, Алам) в течении 15 мин. Где указано, среда также содержала 2 мкг/мл ротенон (Рот). Затем суспензию переносили в ячейки, содержащие НАДН в различных концентрациях и 20 мкМ МСLА (А) или только НАДН (Б) и проводили одновременную запись люминесценции и флуоресценции. **В. Эффект концентрации**

**НАДН+НАД на  $E_{(НАД/НАДН)}Max$ .** На панелях А и Б показаны типичные данные одного из трех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (n=3). Данные на панели В представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего для двух (+1.5 мМ NaCN) и трех (Контроль, +Ротенон) независимых экспериментов (n=6 и 9, соответственно).

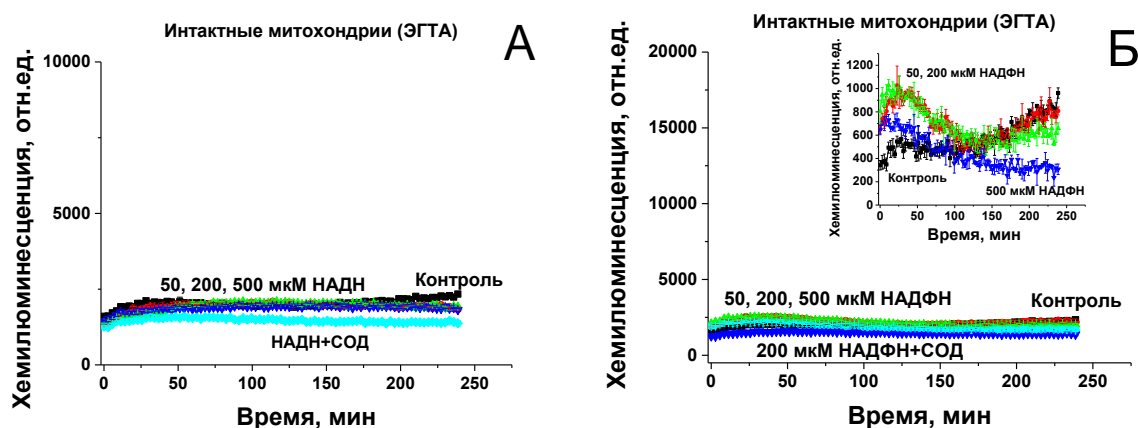
Величина редокс-потенциала НАДН, при которой наблюдался пик продукции СА, была намного выше, чем в случае НАДФН и также увеличивалась с увеличением концентрации НАД(Н) (от -325 до 270 мВ) (В). При концентрации НАД(Н) выше 50 мкМ ротенон и NaCN сдвигали  $E_{НАД(Н)}Max$  к более отрицательным значениям.

Таким образом, активация продукции СА в пермеабилizованных митохондриях в присутствии ПН происходит только после окисления их основного пула. При этом основной вклад в продукцию СА вносят НАДФН-зависимые системы.

**НАД(Ф)Н-зависимая продукция СА в интактных митохондриях.** Внешняя поверхность IMM и ОММ содержит НАД(Ф)Н-связывающие ферменты (AIF1, цитохром-b5-редуктаза 3, NOX4), способные к генерации АФК, поэтому мы проверили эффекты НАД(Ф)Н на продукцию СА в интактных митохондриях.

На рис. 13 показано, что в интактных RLM НАДФН в различных концентрациях (50-500 мкМ) вызывал продукцию СА, примерно в 35 раз меньшую (Б), чем в пермеабилizованных органеллах (см. рис. 11, А). Более того, в интактных митохондриях

НАДФН-зависимая генерация СА происходила без задержки, зависящей от концентрации. НАДН в интактных митохондриях не вызывал продукции СА (А).

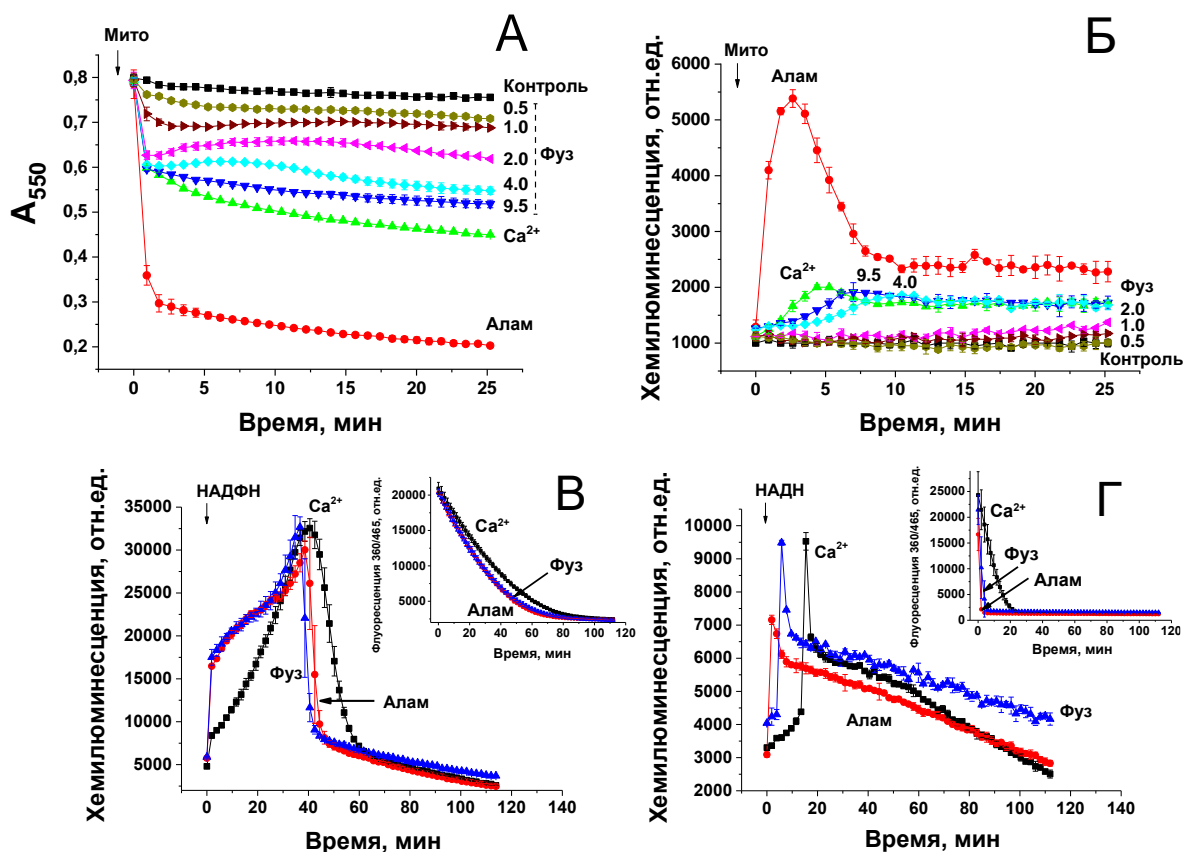


**Рис. 13. Эффекты НАДН и НАДФН на продукцию СА в интактных митохондриях.** Митохондрии (0.5 мг/мл) инкубировались в стандартной KCl-среде без дыхательных субстратов в присутствии 500 мкМ ЭГТА (А и Б), 20 мкМ MCLA, НАДН (А), НАДФН (Б) в указанных концентрациях. Вставка на панели Б показывает те же данные, только в более крупном масштабе. Показаны типичные данные одного из трех аналогичных экспериментов. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n=3$ ).

Таким образом, главными генераторами как НАДН-, так и НАДФН-зависимых вспышек СА являются внутренние редокс системы митохондрий.

**Продукция СА при пермеабиллизации митохондрий фузарицидином.** Для того, чтобы выяснить, способны ли другие пороформирующие соединения, помимо аламетицина, индуцировать генерацию вспышек СА, было исследовано влияние на митохондрии антибиотика фузарицина, способного, как было показано ранее, вызывать повреждения митохондриальных и плазматических мембран [Mikkola *et al.*, 2017].

Было обнаружено, что фузарицидин вызывает набухание митохондрий, амплитуда которого увеличивается при росте концентрации пептида (рис. 14, А). Кроме того, фузарицидин стимулировал генерацию СА митохондриями, уровень которой при максимальных используемых концентрациях (9.5 мкг/мл) был таким же, как и при индукции РТР (Б). Аламетицин вызывал более сильное набухание митохондрий (А) и более высокий уровень СА (Б) по-сравнению с  $\text{Ca}^{2+}$  и фузарицидином. С использованием ПЭГ разного молекулярного веса, было обнаружено, что антибиотик формирует в IMM поры со средним размером  $\sim 750$  Да. Эти поры меньше, чем поры, индуцированные  $\text{Ca}^{2+}$  (РТР,  $\sim 1350$  Да) и аламетицином ( $\sim 2250$  Да). Аналогично пермеабиллизации, вызванной добавлением аламетицина и  $\text{Ca}^{2+}$ , фузарицидин-индуцированная пермеабиллизация приводила к генерации вспышки СА после окисления основного пула добавленных НАДФН (В) и НАДН (Г).



**Рис. 14.** Влияние пороформирующих пептидов (аламетицина и фузарицидина) и  $\text{Ca}^{2+}$  на набухание митохондрий (А), продукцию СА (Б, В, Г) и окисление добавленных пиридиновых нуклеотидов (вставки в Г и Д). А и Б. Митохондрии (0.5 мг/мл) были добавлены в стандартную среду инкубации, содержащую 20 мкМ МСЛА (Б). Стрелками показаны добавки суспензии митохондрий в ячейки, содержащие, где указано, аламетицин (Алам, 20 мкг/мл), 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  и фузарицидин (Фуз) в указанных концентрациях (мкг/мл). Данные на панелях А и Б регистрировались одновременно. Представленные данные есть среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ) для трех независимых измерений. В и Г. К суспензии митохондрий, содержащей, где указано, фузарицидин (9.5 мкг/мл) и  $\text{Ca}^{2+}$  (250 нмоль/мг белка), добавляли 100 мкМ НАДФН (В) и 200 мкМ НАДН (Г) и одновременно регистрировали люминесценцию и флуоресценцию (вставки). Показаны типичные кривые одного эксперимента из трех идентичных.

Полученные данные указывают на то, что фузарицидины могут быть использованы в качестве отрицательного контроля РТР. В отличие от аламетицина, фузарицидин формирует поры, не на много меньшие по размеру, чем РТР, и вызывает аналогичное по амплитуде набухание митохондрий и уровень генерируемого СА.

Таким образом, в данной работе было проанализирован эффект, который оказывают действующие со стороны цитозоля ПН на индукцию неспецифической  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры митохондрий, а также влияние НАД(Ф)Н на генерацию вспышек СА при пермеабиллизации митохондриальных мембран.

Впервые было показано, что НАДН и, в меньшей степени, НАД (но не НАДФ(Н)) подавляет открывание РТР, проявляя максимальную защиту в миллимолярных

концентрациях. По силе эффект ПН вполне сравним с эффектом АН. Невозможность проникновения ПН в матрикс митохондрий предполагает существование ПН-зависимого сайта регуляции РТР во внешних отделах митохондрий. Данный регулятор взаимодействует с НАД(Н) аллостерически, поскольку подавление РТР не требует окисления и восстановления нуклеотидов.  $Mg^{2+}$  дозозависимо увеличивал эффект НАД(Н).

Была проанализирована роль VDAC в НАД(Н)-зависимом ингибировании поры. В эмбриональных (MEF, HEK293T) и раковых клетках (HEp-2, THP1), в отличие от терминально дифференцированных гепатоцитов и кардиомиоцитов, подавление открывания поры с помощью НАДН было минимальным, либо отсутствовало, хотя все типы клеток экспрессировали полный набор изоформ VDAC. Диссоциация НК и тубулина - предполагаемых конкурентов НАДН за сайт связывания на VDAC, не способствовала появлению защитного эффекта нуклеотида. Таким образом, VDAC не является НАДН-зависимым регулятором РТР.

Было показано, что механизм ингибирования РТР НАД(Н) не связан с предотвращением выхода АТФ из митохондрий с помощью транспортеров АН, и, следовательно, с увеличением  $Ca^{2+}$ -буферной емкости матрикса. НАД(Н) не снижают  $Ca^{2+}$ -зависимый выход АТФ через SCaMC. Более того, они усиливают выход нуклеотида через АНТ. Полное ингибирование АНТ с помощью БК и КАТР почти полностью предотвращает защитное действие НАД и модулирует эффект НАДН без его отмены. Таким образом, АНТ является модулятором ингибирующего действия НАД(Н).

Было показано, что пермеабилзация митохондриальных мембран вызывает генерацию всплеск СА, независимо от способа пермеабилзации (открывание РТР, формирование аламетициновой или фузарицидиновой поры). Данный процесс регулируется внешними ПН и связан с работой внутренних (матриксных) НАД(Ф)Н-оксидоредуктаз. Окисление НАДФН и НАДН до определенных, довольно низких значений редокс-потенциала (от  $-315$  до  $-297$  мВ и от  $-325$  до  $-270$  мВ, соответственно) сопровождается генерацией СА. Внешний НАДФН стимулирует большие по величине всплески СА, чем НАДН. Таким образом, впервые были описаны условия, способствующие генерации всплеск СА в митохондриях с участием экзогенных НАД(Ф)Н: 1) наличие независимой от механизма возникновения пермеабилзации ИММ, 2) доступность цитозольных НАД(Ф)Н, 3) снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов. Также мы показали, что поры, формируемые фузарицидином, по размеру и функциям более схожи с РТР, чем аламетициновые и, таким

образом, являются более подходящей моделью для исследования РТР (в качестве отрицательного контроля).

Таким образом, данная работа демонстрирует новые механизмы участия пиридиновых нуклеотидов цитозоля в регуляции жизнеспособности клеток в физиологических и патологических состояниях. С одной стороны, НАД(Н), ингибируя неспецифическую  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую пору, могут участвовать в цитопротекции наряду с АН. Поэтому одной из причин потери клеточной жизнеспособности при активации поли(АДФ-рибоза)-полимеразы может быть открывание РТР, вызванное снижением уровня НАД(Н) в цитозоле. С другой стороны, НАД(Ф)Н могут поддерживать генерацию СА при многих патологических состояниях (ишемия, окислительный стресс, воздействие токсинов), когда возникают благоприятные для этого условия: увеличение цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцирующего РТР, падение уровня дыхательных субстратов и НАД(Ф)Н матрикса ниже физиологических величин. Дальнейшее исследование механизмов и сайтов действия ПН при индукции РТР представляется необходимым, поскольку их точное определение позволит разработать способы регуляции для предупреждения развития многих патологических состояний организма.

## ВЫВОДЫ

1. НАДН и, в меньшей степени, НАД в микромолярных и миллимолярных концентрациях подавляют открывание РТР в терминально дифференцированных клетках, аллостерически действуя на регуляторный сайт, расположенный во внешних отделах митохондрий. По силе своего действия эффект сравним с влиянием адениновых нуклеотидов. Магний дозозависимо увеличивает эффект НАД(Н).

2. VDAC не является НАДН-зависимым регулятором РТР.

3. НАД(Н) подавляет РТР путем взаимодействия с мишенью, отличной от S<sub>Ca</sub>MS. АНТ модулирует защитное действие НАД(Н). Цитозольные НАД и НАДН усиливают АНТ-опосредованный выход АТР из митохондрий.

4. Вспышки супероксидного аниона при пермеабиллизации митохондриальных мембран происходят после существенного окисления (повышения редокс-потенциала) НАД(Ф)Н матрикса и/или цитозоля. Главный вклад в данный процесс делают НАДФН-зависимые системы матрикса.

5. Пермеабиллизация мембран (по любому механизму), доступность цитозольного НАД(Ф)Н и снижение концентрации НАД(Ф)Н-регенерирующих субстратов способствуют высокой продукции супероксид-аниона.



## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

### Статьи в рецензируемых журналах

1. **E.S. Kharechkina**, A.B. Nikiforova, A.G. Kruglov. Pyridine nucleotides regulate the superoxide anion flash upon permeabilization of mitochondrial membranes: an MCLA-based study. *Free Radical Biology and Medicine*, 124 (2018), pp. 473-483;

2. **Харечкина Е.С.**, Никифорова А.Б. Механизмы генерации активных форм кислорода при пермеабилзации митохондриальных мембран. *Современные проблемы науки и образования*, 4 (2018);

3. **E.S. Kharechkina**, A.B. Nikiforova, V.V. Teplova, I.V. Odinkova, O.V. Krestinina, Y.L. Baburina, S.A. Kruglova, A.G. Kruglov, Regulation of permeability transition pore opening in mitochondria by external NAD(H), *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, 1863 (2019) pp. 771-783;

4. R. Mikkola, M. Andersson, **E. Kharechkina**, S. Kruglova, A. Kruglov. Fusaricidin-type compounds create pores in mitochondrial and plasma membranes of mammalian cells. *Biomolecules*, 9, 433 (2019).

### Материалы научных конференций

1. **Курпиганова Е.С.**, Krestinina O.V., Chekanov A.V., Nikiforova A.B., Solovieva M.E., Sheiko T.V., Kudriavtsev A.A., Craigen W.J., Kruglov A.G. "VDAC isoforms affect NAD(P)H-dependent redox processes and ROS generation in mouse embryonic fibroblasts", 2nd International scientific conference SCIENCE OF THE FUTURE (Kazan, September 20-23, 2016)

2. **Харечкина Е.С.**, Никифорова А.Б., Теплова В.В., Круглов А.Г. «Регуляция mPTP нуклеотидами со стороны цитозоля», 21-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых Биология-наука XXI века (Пушино, 17-21 апреля 2017).

3. **E. Kharechkina**, A. Nikiforova, V. Teplova, A. Kruglov. «The regulation of the permeability transition pore by external nucleotides», EMBO/FEBS Course Mitochondria in Life, Death and Disease (Fasano (Br), Italy, 09 – 13 October 2017).

4. **Харечкина Е.С.**, Никифорова А.Б., Круглов А.Г. «Регуляция образования супероксид аниона пиридиновыми нуклеотидами в пермеабилзованных митохондриях». 22-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пушино, 23-27 апреля 2018 года.

5. **Kharechkina E.**, Nikiforova A., Kruglov A. «Pyridine nucleotides regulate the superoxide anion flash upon permeabilization of mitochondrial membranes». 20th ISANH International conference on oxidative stress, redox homeostasis and antioxidants Parix Redox 2018. Paris, 25-26 June.

6. **Харечкина Е.С.**, Теплова В.В, Никифорова А.Б., Одиноква И.В., Крестинина О.В., Бабурина Ю.Л., Круглова С.А., Круглов А.Г. «NAD(H) РЕГУЛИРУЮТ ОТКРЫВАНИЕ МРТР СО СТОРОНЫ ЦИТОЗОЛЯ». 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пущино, 15-19 апреля 2019 года.

7. Kruglov A., Mikkola R., Andersson M., **Kharechkina E.**, Kruglova S. Fusaricidin-type compounds create pores in mitochondrial and plasma membranes of mammalian cells. 10th World Congress on Targeting Mitochondria 2019, 27-29 October 2019, Berlin.

### **Монография**

Как изоформы VDAC регулируют уровень АФК в митохондриях и клетках. Круглов А.Г., **Куприянова Е.С.**, Крестинина О.В., Никифорова А.Б., Чеканов А.В., Бэлл Л.Е., Соловьева М.Е., Бабурина Ю.Л., Комте-Уолтерс С.Л., Шейко Т., Крэйген У.Дж., Лемастерс Дж.Дж.. Глава в коллективной монографии «Митохондриальные поры, каналы и устойчивость клеток к повреждающим воздействиям». Под ред. Акатова В. С. и Лемастера Дж. Дж. Изд-во Синхробук 2016 г.