

БЫСТРЫЙ ПРОТОЧНЫЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА МИТОХОНДРИЙ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*: КОРРЕКТНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Г.В. Черепнев^{1,2}, Г.Р. Игтисамова², Л.И. Зайнуллин², Н.В. Калачева², А.А. Ризванов²

¹Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Rapid flow cytofluorometric analysis of functional mitochondrial status in *Yarrowia lipolytica* yeast: a reasonable model to study human cell bioenergetic responses

G.V. Cherepnev^{1,2}, G.R. Igtisamova², L.I. Zainullin², N.V. Kalacheva², A.A. Rizvanov²

¹Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

²Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Разработан быстрый метод анализа индивидуальных митохондриальных ответов клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica* на основе технологии проточной цитометрии и потенциал-чувствительного ратиометрического флуорохрома JC-1. Предлагаемая модель имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет определять трансмембранный митохондриальный потенциал в неразрушенных клетках (без выделения митохондрий), имеет внутренний положительный контроль (разобщитель окислительного фосфорилирования CCCP), и обеспечивает нормированные измерения трансмембранного митохондриального потенциала с учетом гетерогенности клеточных размеров и числа митохондрий в отдельной клетке. Сходство структур митохондриального комплекса I млекопитающих и *Yarrowia lipolytica* открывает перспективы использования данной модели для поиска модификаторов биоэнергетических ответов клеток человека.

Ключевые слова: трансмембранный митохондриальный потенциал, *Yarrowia lipolytica*, проточная цитофлуориметрия, JC-1, биоэнергетический ответ.

Митохондриальная дисфункция играет существенную роль при сердечно-сосудистых болезнях, сахарном диабете, септическом шоке, онкологических и нейродегенеративных заболеваниях, однако лабораторная оценка биоэнергетических ответов клеток пациентов затруднительна [1]. В сфере трансляционных клинических исследований митохондрий предложена новая концепция «Биоэнергетического индекса здоровья», вычисление которого может быть полезно для уточнения патофизиологических механизмов болезни, определения тяжести и темпов ее прогрессии, а также для развития новых терапевтических подходов [2]. Ключевая идея концепции — использование митохондрии в качестве «шахтерской канарейки» («canary in the coal mine»), заранее предвещающей биоэнергетический кризис. Разработан лабораторный метод оценки биоэнергетических профилей выделенных из цельной крови субпопуляций лейкоцитов и тромбоцитов по уровню общего потребления кислорода и продукции протонов [3]. Однако методика подразумевает многоэтапное препаративное выделение целевых клеточных субпопуляций и не дает возможности получать информацию о биоэнергетическом статусе на уровне отдельной клетки.

Рост числа болезней человека (например, болезнь Паркинсона [4]), связанных с патологией митохондриального комплекса I (протон транслоцирующая NADH:убихинон оксидоредуктаза, E.C. 1.6.5.3), послужил триггером поиска дрожжевой модели для анализа этого комплекса [5]. Строго аэробный вид

We developed a rapid method to study *Yarrowia lipolytica* single yeast cell mitochondrial responses based on flow cytometry and potential-sensitive ratiometric fluorochrome JC-1. The proposed model has several advantages as it allows to measure mitochondrial membrane potential in intact cells (without isolation of mitochondria), has an internal positive control (uncoupler of oxidative phosphorylation CCCP), and produces a normalized measurement of the transmembrane mitochondrial potential, taking into account the heterogeneity of cell size and number of mitochondria in a single cell. The similarity of the mitochondrial complex I structure in mammals and *Yarrowia lipolytica* opens prospects for the model implementation in search for human bioenergetic response modifiers.

Key words: mitochondrial membrane potential, *Yarrowia lipolytica*, flow cytometry, JC-1, bioenergetic response.

дрожжей *Yarrowia lipolytica* (по старой номенклатуре — *Saccharomycopsis lipolytica*) содержит убихинон Q9 с 9-членной изопреноидной боковой цепью, близкой к убихинонам Q9-Q10 млекопитающих. Это позволило использовать *Yarrowia lipolytica* в качестве модели для изучения патогенетических мутаций митохондриального комплекса I человека в ряде генетических исследований [6, 7]. Вместе с тем, сходство структур комплекса I млекопитающих и *Yarrowia lipolytica* [8] открывает перспективы в исследовании молекулярных механизмов связи трансмембранного митохондриального потенциала и запрограммированной клеточной гибели в трансляционной медицине.

Цель настоящего исследования: разработать модель для анализа индивидуальных митохондриальных ответов клеток на основе метода лазерной проточной цитометрии с применением *Yarrowia lipolytica*.

Материал и методы

Организм и условия выращивания. Объект исследования — штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica*, полученный из музея кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Дрожжи выращивали в пробирках на среде Сабуро с добавлением агара (15 г/л) при 30°C. Через 24 ч клетки дрожжей смывали с твердой среды и промывали 0,9% раствором NaCl, осаждая центрифугированием в течение 5 минут. Суспендированный в 0,9% растворе NaCl осадок разводили до концен-

трации 10^6 кл/мл и использовали в эксперименте. Исследования выполняли с клеточной культурой, находящейся в фазе логарифмического роста.

Трансмембранный митохондриальный потенциал измеряли с помощью витального радиометрического катионного флуорохрома JC-1 (Catalog No. 70011, Biotium, США). В качестве протонфорного разобщителя окислительного фосфорилирования использовали карбоанилицианид-3-хлорфенилгидразон СССР (Abscam, Великобритания).

Изменение митохондриального потенциала индуцировали бактериальной рибонуклеазой биназой. В работе использовали гомогенный препарат биназы - РНКазы *Bacillus intermedius* (новое название этого вида – *Bacillus pumilus* [9], полученный по методике, описанной в работе [10]).

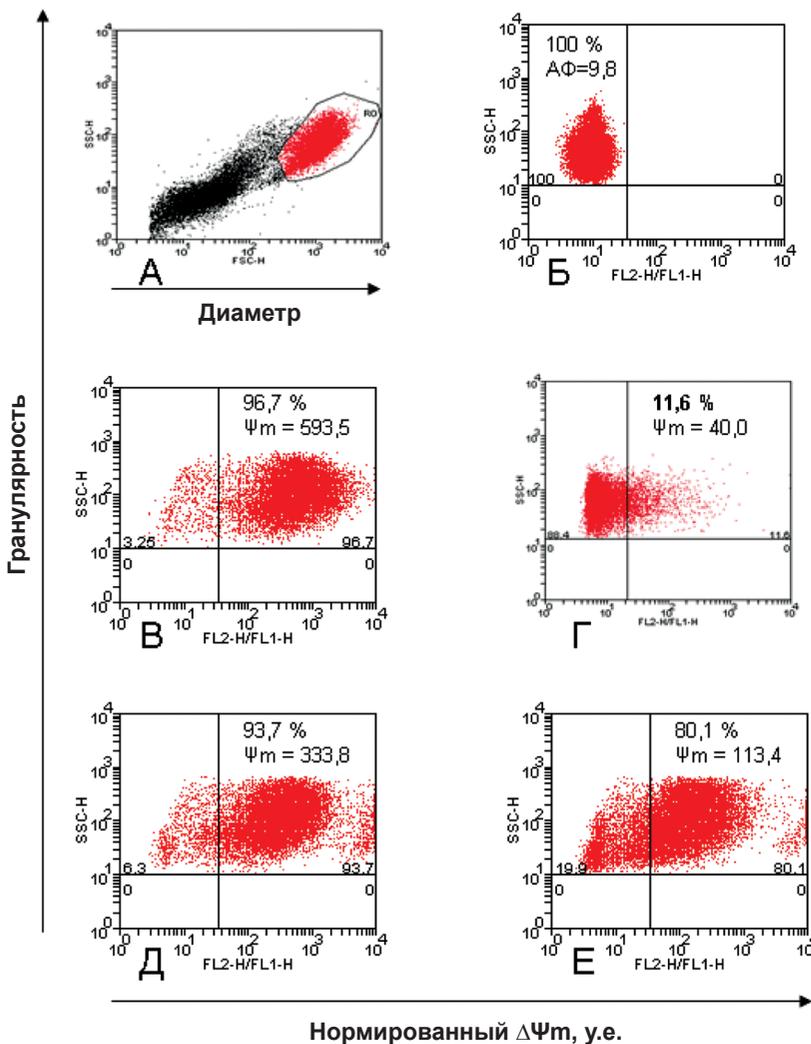
Цитофлуориметрическое определение митохондриального потенциала $\Delta\psi_m$. Дрожжи, суспендированные в 0,9% растворе NaCl (10^6 кл/мл) помещали в пробирки BD Falcon для проточной цитометрии. В клеточную суспензию вносили СССР в конечной концентрации $100 \mu\text{mol/L}$ (положительный контроль) и биназу в конечных концентрациях 400 мкг/мл и 40 мкг/мл. Пробы инкубировали 1 ч при 30°C . Затем добавляли флуорохром JC-1 в конечной концентрации $20 \mu\text{mol/L}$. Клетки выдерживали с красителем при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин, после чего проводили измерение на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD, США),

оснащенном двумя лазерами с длиной волны 488 нм и 635 нм, со скоростью не более 1000 кл./с в программе Cell Quest Pro®. В каждом варианте опыта записывали не менее 30 000 клеточных событий. Полученные файлы анализировали при помощи программного обеспечения Weasel v2.2.3, нормированный митохондриальный потенциал выражали в условных единицах как соотношение красного и зеленого сигналов флуоресценции FL2/FL1, генерируемых димерами и мономерами JC-1, соответственно. Статистическую обработку результатов выполняли по критерию Хи-квадрат с коррекцией Йетса для сравнения долей и непараметрическому критерию Колмогорова – Смирнова (пакет программ STATISTICA 6.0).

Определение количества колониеобразующих единиц (KOE) *Yarrowia lipolytica*. После инкубации с биназой (1 ч) суспензию клеток разводили и высевали на твердую среду в чашки Петри. Через 24 ч подсчитывали количество образовавшихся колоний. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя метиленового синего.

Результаты

Проведено три независимых эксперимента, в которых были получены воспроизводимые результаты. Репрезентативный анализ одного из экспериментов представлен на рисунке.



Трансмембранный митохондриальный потенциал (ψ_m) *Yarrowia lipolytica*:
 А – доля клеток RO с большим диаметром и градуальностью (вероятно, активно делящаяся субпопуляция);
 Б – соотношение красной (FL2) и зеленой (FL1) аутофлуоресценций интактных клеток;
 В – интактные клетки, окрашенные JC-1 (отрицательный контроль);
 Г – клетки, обработанные СССР и окрашенные JC-1 (положительный контроль);
 Д – клетки, обработанные биназой (40 мкг/мл) и окрашенные JC-1;
 Е – клетки, обработанные биназой (400 мкг/мл) и окрашенные JC-1. Цитофлуориметрический анализ. ψ_m – медиана митохондриального потенциала в у.е.

На основании параметров диаметра и гранулярности была выделена целевая субпопуляция активно делящихся клеток (рис. 1А, регион R0), для которой было установлено соотношение сигналов клеточной аутофлуоресценции в FL2 и FL1 детекторах проточного цитометра (рис. 1Б). Интактные окрашенные клетки содержали поляризованные митохондрии, накапливающие димеры JC-1 (рис. 1В), в то время как дрожжи, обработанные разобщителем окислительного фосфорилирования протонофором СССР, демонстрировали выраженное снижение доли клеток с поляризованными митохондриями (с 96,7 до 11,6%) и 15-кратное уменьшение митохондриального потенциала в указанной субпопуляции (рис. 1Г). Биназа прямо пропорционально концентрации редуцировала долю клеток с активными митохондриями и уровень митохондриального потенциала в них (рис. 1Д, Е).

Часовая инкубация *Yarrowia lipolytica* с биназой (400 мкг/мл) не влияла на жизнеспособность клеток в тесте с метиленовым синим, однако приводила к снижению числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на 30% по сравнению с контролем.

Обсуждение

Нами разработан проточный цитофлуориметрический способ измерения митохондриального потенциала дрожжевых клеток *Yarrowia lipolytica* с применением липофильного катионного ратиометрического красителя JC-1. В доступных базах данных мы не нашли публикаций, использующих указанный методический подход для *Yarrowia lipolytica*. Предлагаемая модель имеет ряд преимуществ перед другими методическими подходами в области биоэнергетики [3, 11], поскольку позволяет определять

трансмембранный митохондриальный потенциал в неразрушенных клетках (без выделения митохондрий), имеет внутренний положительный контроль (разобщитель окислительного фосфорилирования СССР), и обеспечивает нормированные измерения трансмембранного митохондриального потенциала с учетом гетерогенности клеточных размеров и числа митохондрий в отдельной клетке.

Экспозиция *Yarrowia lipolytica* с биназой через 1 ч приводила к снижению митохондриального потенциала в зависимости от концентрации биназы и сокращению числа КОЕ. Цитостатический эффект бактериальной биназы в отношении дрожжей *Yarrowia lipolytica* может быть проявлением биомеханизмов, обеспечивающих видовые конкурентные преимущества в общих экологических нишах.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о корректности выбранной дрожжевой модели, которую можно рекомендовать для исследования биоэнергетических ответов клеток.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Работа финансировалась за счет субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kramer P.A., Chacko B.K., Ravi S. et al. Bioenergetics and the oxidative burst: protocols for the isolation and evaluation of human leukocytes and platelets. *J. Vis. Exp.* 2014; 85. doi: 10.3791/51301.
2. Chacko B.K., Kramer P.A., Ravi S. et al. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin. Sci. (Lond.)* 2014; 127(6): 367-73.
3. Chacko B.K., Kramer P.A., Ravi S. et al. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Lab. Invest.* 2013; 93(6): 690-700.
4. Greenamyre J.T., Sherer T.B., Betarbet R., Panov A. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 2001; 52: 135-41.
5. Nicaud J.M. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 2012; 29(10): 409-18.
6. Abdrakhmanova A., Zickermann V., Bostina M. et al. Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1658: 148-56.

7. Drose S., Krack S., Sokolova L. et al. Functional dissection of the proton pumping modules of mitochondrial complex I. *PLoS Biol.* 2011; 9: e1001128.

8. Remacle C., Barbieri M. R., Cardol P. et al. Eukaryotic complex I: functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process. *Mol. Genet. Genomics*. 2008; 280: 93-110.

9. Шарипова М. Р., Тойменцева А. А., Сабирова А. Р. и др. Новое филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-19. *Микробиология* 2011; 80(3): 424-6.

10. Голубенко И. А., Балабан Н.П., Лецинская И.Б. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента. *Биохимия* 1979; 44: 640-8.

11. Тренделева Т.А. Взаимодействие мембранотропных катионов с митохондриями дрожжей *Yarrowia lipolytica* [диссертация]. Москва; 2012.

Поступила: 14.08.2014