

ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Т.А. Болотова, И.Ю. Субота, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов,
М.В. Кулинченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *bolotova_t.a@mail.ru*

Аннотация. Показано, что из проростков кукурузы, корнеплодов репы и картофеля можно выделить три отдельные субпопуляции митохондрий. Выявлено, что митохондриальная субпопуляция с наименьшей скоростью седиментации в градиенте плотности сахарозы или перколла наиболее эффективно импортирует ДНК. Мы полагаем, что в составе этой субпопуляции содержатся дополнительные клеточные факторы и/или контактные сайты с мембранами других органелл, способствующие формированию мембранных каналов, осуществляющих транспорт молекул ДНК.

Ключевые слова: выделение митохондрий, митохондриальная субпопуляция, импорт ДНК, *Solanum tuberosum*, *Brassica rapa*, *Zea mays*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1191-1194

Многолетние исследования, проведенные для многих организмов, от одноклеточных дрожжей [Nunnari et al., 1997; Okamoto, Shaw, 2005 и др.] до высших многоклеточных организмов, включая растения [Arimura, Tsutsumi, 2002; Logan, 2006 и др.] и млекопитающих [Bereiter-Hahn, 1990; Rizzuto et al., 1998 и др.] показывают, что митохондриальная популяция единичной клетки состоит из смеси митохондрий разнородной морфологии. В отличие от митохондрий дрожжей и млекопитающих, фрагментированные и дискретные митохондрии растений не формируют непрерывную сеть, являются очень динамичными в отношении морфологии и движения внутри клетки [Logan, 2010]. Полагают, что гетерогенность митохондриальной популяции в клетке может быть обусловлена этапами биогенеза этих органелл на разных стадиях развития организма или различием их метаболических функций, выполняемых в разных тканях. Значительные вариации морфологических отличий среди митохондрий в клетках разных тканей могут быть связаны с различными функциональными задачами этих клеток и являться одним из механизмов адаптации к особому метаболическому статусу клетки [Jakobs et al., 2011]. Изучение особенностей импорта ДНК [Konstantinov et al., 2016] в митохондриальные субпопуляции клеток растений позволяет провести не только более углубленное исследование механизма транспорта этих макромолекул в митохондрии, но и выявить взаимосвязь между выполнением отдельными митохондриями или их популяциями внутри клетки специализированных функций, связанных с продуцированием энергии, сигнализацией или индукцией апоптоза и их структурной организацией.

Объектами нашего исследования были митохондрии, изолированные из двух типов растительной ткани: прорастающей (этиолированные 3х-дневные проростки кукурузы *Zea mays*) и запасающей (корнеплоды репы *Brassica rapa* и клубни картофеля *Solanum tuberosum*). Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования с последующим разделением в линейном градиенте плотности сахарозы (0.3-1.2 М) – для кукурузы, или в ступенчатом градиенте плотности перколла (45%-21%-18%, об./об.) – для репы и картофеля. Визуально в обоих типах градиентов можно было выделить 2-3 фракции. Самая верхняя фракция (фракция 1)

локализовалась на уровне 0,3-0,4 М концентрации сахарозы или на границе между 18% и 21% плотности перколла. Основная митохондриальная фракция (фракция 3) для кукурузы находилась на уровне градиента плотности, соответствующем 0,5-0,8 М сахарозы, для репы и картофеля-на границе между 21% и 45% перколла. Фракцию 2 отбирали из слоя градиента сахарозы или перколла, находящегося непосредственно над фракцией 3. Отобранные митохондрии отмывали от избытка сахарозы или перколла и использовали для функциональных исследований.

С помощью электрофореза в ПАА-геле в денатурирующих условиях были обнаружены незначительные отличия в белковых спектрах 1-й фракции в сравнении со спектрами 2-й и 3-й фракций: для этой фракции митохондрий кукурузы и репы можно было отметить увеличение количества белка размером 80 кДа и изменение соотношения количества белков размером 100 и 110 кДа. При проведении Вестерн-анализа с использованием антител к VDAC1 было выявлено, что митохондриальный порин присутствует в составе белков всех трех фракций кукурузы и репы.

Уровень дыхательной активности во всех трех митохондриальных фракциях, полученных из этиолированных проростков кукурузы, был низким, коэффициент дыхательного контроля, показывающий сопряженность дыхания и фосфорилирования митохондрий, варьировал от 2 до 3. Для первой фракции («легких» митохондрий) был характерен более высокий уровень дыхательной активности, однако этот показатель фракции 1 был нестабильным. В корнеплодах репы и клубнях картофеля наиболее высоким показателем дыхательной активности (около 4) обладали митохондрии фракций 2 и 3. Митохондрии фракции 1 характеризовались более низким уровнем дыхательной активности (около 2), или же, в ряде случаев, сопряжение дыхания и фосфорилирования в этой фракции вообще отсутствовало.

Анализ активности дыхательных комплексов с помощью метода BN-PAGE показал, что 1-я митохондриальная фракция во всех трех исследованных растительных видах имела существенные различия в составе и функционировании мембранных комплексов по сравнению с комплексами фракций 2 и 3. У кукурузы и репы в 1-й фракции активность мембранных дыхательных комплексов была снижена (для комплексов I и II) или отсутствовала (для комплекса IV). Для митохондрий 1-й фракции картофеля характерно некоторое повышение активности комплекса I и снижение активности комплекса II в сравнении с двумя другими фракциями.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что популяция митохондрий, выделяемых из этиолированных проростков кукурузы, корнеплодов репы и клубней картофеля характеризуется структурной и функциональной неоднородностью. Фракция 1, по всей видимости, представляет собой незрелые митохондрии, в мембране которых комплексы дыхательной цепи еще только формируются и не функционируют в полной мере.

С целью дальнейшей функциональной характеристики различных митохондриальных субпопуляций в клетке, а также для изучения возможной роли гетерогенности митохондрий в механизме транспорта ДНК было проведено исследование эффективности импорта ДНК в митохондрии трех клеточных субпопуляций этих органелл. Анализ эффективности импорта методом количественной ПЦР показал, что в митохондриях 1-й фракции наблюдается существенно повышенный уровень поглощения ДНК (рис. 1). При этом повышенный уровень импорта ДНК в 1-ю фракцию (более чем в 10 раз по сравнению с импортом во фракцию 3) не зависел ни от длины субстрата, ни от растительного источника митохондрий. Следует отметить, что разница между уровнем импорта ДНК в 1-ю и 3-ю фракции митохондрий репы (в среднем в 43 раза) была существенно выше по сравнению с наблюдаемой для митохондрий кукурузы и картофеля (в 11-13 раз). Интенсивность импорта ДНК малой

и средней длины в митохондрии 2-й фракции также был несколько выше (в 2-3 раза) по сравнению с импортом в митохондрии фракции 3 (для кукурузы и репы) (рис. 1 А, Б, Г.), импорт ДНК большой длины в митохондрии фракций 2 и 3 из картофеля оставался приблизительно на одном уровне (рис. 1 В).

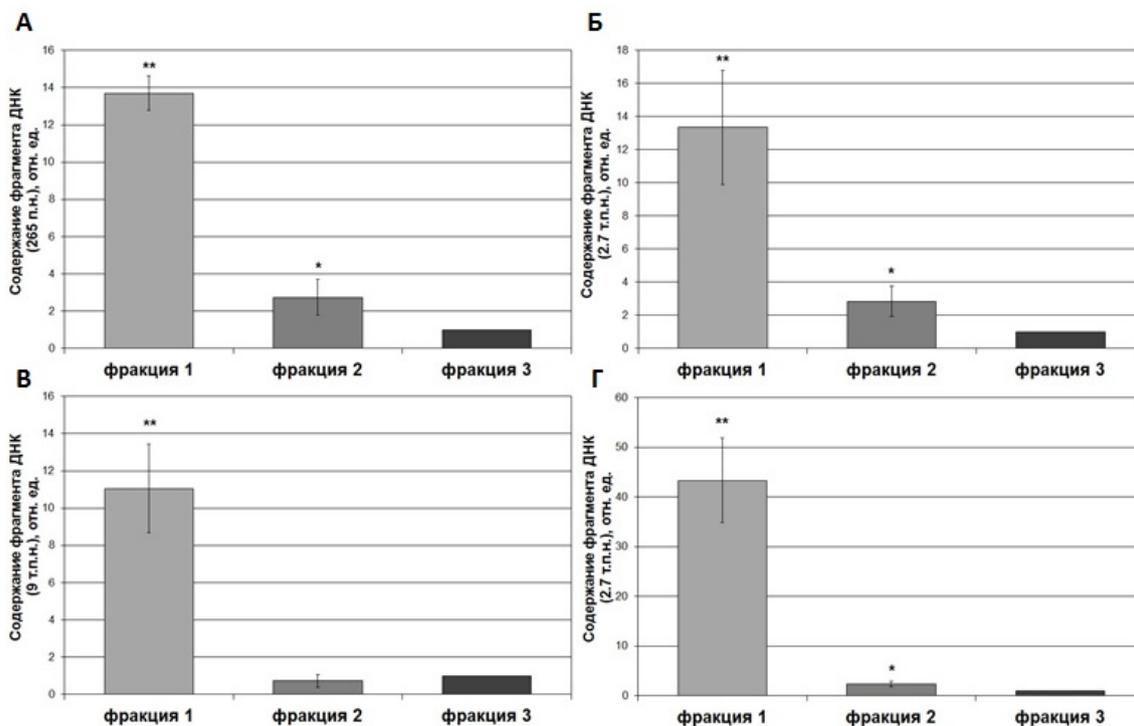


Рис. 1. Анализ эффективности импорта ДНК разной длины в митохондриальные фракции различных видов растений методом количественной ПЦР в реальном времени. На рисунке представлены диаграммы уровней активности импорта ДНК в три фракции митохондрий *Z. mays* (А и Б), *S. tuberosum* (В) и *B. rapa* (Г). Количество импортированной ДНК нормировали к количеству эндогенной ДНК, консервативному митохондриальному гену *NAD4*. Эффективность импорта ДНК в 3-ю митохондриальную фракцию принята за условную единицу. Данные представлены по результатам не менее трех биологических повторностей.

Мы полагаем, что наблюдаемый нами феномен различия в активности импорта ДНК в различные митохондриальные субпопуляции может быть обусловлен тем, что митохондрии 1-й фракции (1) являясь «протомитохондриями», имеют отличающуюся от типичных, зрелых митохондрий структуру мембран с измененным составом и проводимостью транспортных каналов, либо (2) могут содержать дополнительные клеточные факторы и сохранившиеся контактные сайты с мембранами других органелл, например, эндоплазматического ретикулума, способствующими формированию транспортных мембранных путей, осуществляющих транслокацию молекул ДНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-00603.

Литература

Arimura S., Tsutsumi N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in Arabidopsis mitochondrial division // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. – P. 5727–5731.

Bereiter-Hahn J. Behavior of mitochondria in the living cell // Int. Rev. Cytol. – 1990. – V. 122. – P. 1–63.

Jakobs S., Stoldt S., Neumann D. Light microscopic analysis of mitochondria heterogeneity in cell population and within single cells // *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* – 2011. – V. 123. – P. 1–19.

Konstantinov Y.M., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Bolotova T.A., Koulintchenko M.V. DNA import into mitochondria // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – V. 81. – P. 1044–1056.

Logan D.C. Plant mitochondria dynamics // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1763. – P. 430–441.

Logan D.C. The dynamic plant chondriome // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* – 2010. – V. 21. – P. 550–557.

Nunnari J., Marshall W.F., Straight A., Murray A., Sedat J.W., Walter P. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA // *Mol. Biol. Cell.* – 1997. – V. 8. – P. 1233–1242.

Okamoto K., Shaw J.M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. // *Annu. Rev. Genet.* – 2005. – V. 39. – P. 503–536.

Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses // *Science.* – 1998. – V. 280. – P. 1763–1766.

STUDY OF THE HETEROGENEITY OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE HIGHER PLANT MITOCHONDRIA

T.A. Bolotova, I.Yu. Subota, V.I. Tarasenko, Y.M. Konstantinov, M.V. Koulintchenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *bolotova_t.a@mail.ru*

Abstract. It was shown that three distinguished mitochondrial subpopulations can be isolated from maize seedlings, turnip and potato root crops. Mitochondrial subpopulation with the slowest sedimentation rate in the gradient of sucrose or percoll density imports DNA most effectively. We suggest that this subpopulation contains additional cellular factors and/or contact sites with membranes of other organelles that contribute to the formation of membrane channels facilitating transport DNA molecules.

Keywords: *mitochondria isolation, mitochondria subpopulations, DNA import, Solanum tuberosum, Brassica rapa, Zea mays*