

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ С ИХ СПЕЦИАЛИЗАЦИЕЙ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ И АДАПТИВНЫХ ФУНКЦИЙ

И.Ю. Субота, М.В. Кулинченко, Т.А. Болотова, Ю.М. Константинов
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: isubota@mail.ru

В последние три десятилетия морфология и динамика митохондрий изучалась достаточно пристально. Показано, что например, сферические митохондрии защитных клеток табака значительно отличаются от трубчатых митохондрий дрожжей (*S. cerevisiae*) или от сложной митохондриальной сети в культивируемых раковых клетках человека. Митохондрии растений обычно не формируют непрерывную сеть и локализируются рядом с хлоропластами. Кроме того, митохондрии растений отличаются от митохондрий других организмов по целому ряду признаков, включая разные стратегии биогенеза, генетического кодирования, регуляции экспрессии генов и сегрегации органелл (Bodenstein-Lang et al., 1989; Mackenzie & McIntosh, 1999; Rebeille et al., 2007 и др.). Еще одной отличительной особенностью митохондрий растений является гораздо большее количество митохондриальных белков по сравнению с другими эукариотами. Считается, что митохондриальный протеом арабидопсиса представлен около 3000 белками, в то время как в дрожжах не более 1000 белков, а в митохондриях клеток человека около 1500 белков (Bogorad, 2008; Premisler, 2009). С чем связаны подобные различия до сих пор непонятно, так как основные функции митохондрий эукариот, включающие генерацию АТФ, β -окисление жирных кислот, биогенез пиридинон, нуклеотидов и фосфолипидов, а также участие в клеточном гомеостазе ионов Ca^{2+} и программируемой клеточной смерти сходны в этих организмах, хотя имеют определенные особенности.

Впервые о гетерогенности митохондрий в пределах одной клетки упоминается в работе Kuff и Schneider (1954). Авторы показали различный уровень гетерогенности митохондрий, полученных из печени крысы, в отношении активности сукцинатдегидрогеназы. С появлением современных методов визуализации и оценки ряда функциональных параметров митохондрий представления о наличии различных митохондриальных популяций все больше расширяются.

Одна из гипотез о необходимости «разделения труда» в клеточной митохондриальной популяции - существование конфликта двух основополагающих функций митохондрий, их роли в окислительном фосфорилировании, сопровождаемым постоянной генерацией АТФ и активных форм кислорода (АФК) и их собственным генетическим воспроизводством (Logan, 2006). Специализация одних митохондрий на выполнении биоэнергетических функций, а других на сохранении и воспроизводстве мтДНК может быть одним из самых простых способов, позволяющих снизить скорость мутаций в мтДНК и сохранить функциональность митохондрий в череде поколений.

В задачи работы входило исследование субпопуляций митохондрий, полученных из этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays*) и корнеплодов репы (*Brassica rapa*) как со стороны морфологических и биохимических особенностей, так и в отношении ряда функциональных характеристик, таких как, активность дыхательных комплексов и др.

Для получения митохондриальных субпопуляций кукурузы были использованы 3х-дневные этиолированные проростки гибрида ВИР 42. Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования с последующим разделением в линейном градиенте плотности сахарозы (0.3 - 1.2 М). Визуально в градиенте плотности можно вы-

делить 2–3 фракции. Основная фракция митохондрий находилась на уровне градиента плотности, соответствующем 0,5–0,8 М сахарозы – мы ее разделяли на две фракции, 2-ю и 3-ю; слабозаметная фракция более легких митохондрий локализовалась приблизительно в зоне 0,3–0,4 М концентрации сахарозы – фракция 1.

Митохондриальные фракции корнеплодов репы очищали в ступенчатом градиенте плотности перколла (45 % – 21 % – 18 %, об./об.) Основная фракция митохондрий располагалась на границе между 45 % и 21 % перколла - фракция 3. Первая фракция представляла собой фракцию самых лёгких митохондрий и находилась во всех случаях в верхней части 18 % перколла. После отбора фракций митохондрии отмывали от избытка сахарозы или перколла и использовали для дальнейших исследований.

Митохондриальные белки различных субфракций были разделены с помощью электрофореза в ПАА-геле в денатурирующих условиях. При анализе электрофореграммы можно обнаружить некоторые различия в белковых спектрах различных митохондриальных субфракций. Наблюдаемые различия связаны не с изменениями в белковых спектрах фракций, а с количественным соотношением некоторых бандов, в частности белков с мол. массой ~80 кДа и 100-110 кДа (рис.1, А-Б).

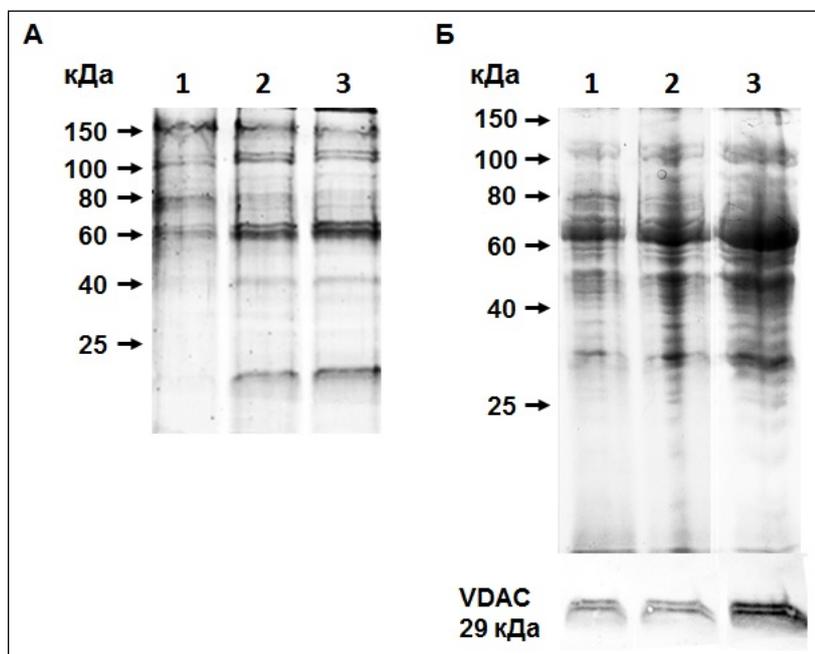


Рис. 1. Анализ профиля митохондриальных белков различных фракций, разделенных с помощью электрофореза в ПАА-геле.

На рисунке представлены электрофореграммы белков трех митохондриальных фракций (обозначены 1, 2 и 3), полученных из проростков кукурузы (А) и репы (Б). После фракционирования в денатурирующем ПАА-геле митохондриальные белки были окрашены с помощью Кумасси R-250. (Б) Иммуноблоттинг митохондриальных белков репы с антителами против VDAC1 (Agrisera, США).

В качестве маркеров использовали наборы фирмы НПО "СибЭнзим" (Россия), содержащие смесь из 12 рекомбинантных высокоочищенных белков, образующих дискретные полосы в диапазоне 10–250 кДа.

Для качественной характеристики субпопуляций митохондрий была начата идентификация мажорных митохондриальных белков, располагающихся в различных компартментах митохондрий с помощью иммуноблоттинга. Одними из мажорных белков наружной мембраны митохондрий являются порины или VDAC (voltage-dependent anion-selective channel). Эти белки необходимы для транспорта ионов и метаболитов между митохондриями и остальными частями клетки. В нашей работе мы использовали антитела против VDAC1. Вестерн-блот проводили, согласно методике Timmons и Dunbar (1990). Митохондриальные белки после фракционирования в SDS-ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану инкубировали в растворе первичных антител в разведении (1: 1000). Иммунореактивные группы выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой. В работе использовали поликлональные антитела против VDAC1 ("Agrisera", США). Показано, что порин присутствовал во всех субфракциях митохондрий. Данный факт в совокупности с дан-

ными о сходном полипептидном составе субфракций указывает на тот факт, что мы имеем дело с популяциями митохондрий, а не с артефактами, возникшими в процессе выделения митохондрий.

Одной из важнейших функциональных характеристик митохондрий является дыхание – потребление кислорода, сопряженное с фосфорилированием АДФ. При изучении дыхательной активности митохондриальных фракций, полученных из этиолированных проростков кукурузы, было показано, что все три фракции поглощали кислород и были сопряжены. В ряде экспериментов для первой фракции («легких» митохондрий) был характерен более высокий уровень дыхательной активности, однако этот показатель фракции 1 был нестабильным. В целом уровень дыхательной активности всех трех митохондриальных фракций кукурузы был низким, коэффициент дыхательного контроля, показывающий сопряженность дыхания и фосфорилирования митохондрий, варьировал от 2 до 3. При добавлении к сопряженным фракциям митохондрий протонофора СССР (карбонилцианид *m*-хлорофенилгидразон) происходило разобщение дыхания и фосфорилирования.

Оценка дыхательной активности митохондриальных фракций, полученных из корнеплодов репы также позволила установить, что все три изучаемые фракции поглощали кислород и характеризовались сопряжением дыхания и фосфорилирования. Наиболее высоким показателем дыхательной активности (около 4) обладали митохондрии 2-ой и 3-ей субфракций. Митохондрии фракции 1 характеризовались более низким уровнем дыхательной активности (около 2), или же, в ряде случаев, сопряжение дыхания и фосфорилирования в этой фракции вовсе отсутствовало.

С целью дальнейшей характеристики субпопуляций митохондрий мы провели анализ активности мембранных дыхательных комплексов с помощью метода BN-PAGE. Все пробы солиобилизованных митохондриальных мембран были нормализованы по содержанию белка. Исходя из результатов окрашивания белков Кумасси, обнаружено, что спектр белков мембранных комплексов митохондриальной фракции 1 кукурузы соответствует таковому во фракциях 2 и 3, за исключением слабо выраженных двух комплексов в верхней трети геля, белковые комплексы 2-й и 3-й фракций не различаются. Активность комплекса I дыхательной цепи в 1-ой фракции митохондрий кукурузы и репы незначительно снижена. Активность комплекса II дыхательной цепи в 1-й фракции снижена как у репы, так и у кукурузы, у кукурузы в большей степени. При этом у репы в 1-й фракции этот комплекс имеет большую молекулярную массу по сравнению с фракциями 2 и 3. Мы оценили также активность IV комплекса в митохондриях репы и кукурузы и установили, что в 1-й фракции этот комплекс не функционирует.

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что 1-я митохондриальная фракция имеет значительные различия в составе и функционировании мембранных комплексов. По всей видимости, данная фракция представляет собой незрелые митохондрии, в мембране которых комплексы дыхательной цепи еще только формируются и не функционируют в полной мере. Эти наблюдения совпадают с данными других исследований, описанных выше, в которых выделяли три популяции митохондрий в зависимости от стадии их развития.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-54-16010.