



УДК 577.22:577.23

<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.111>

## Различная детергент-устойчивость АТФ-синтазы в митохондриях гороха, озимой пшеницы и кукурузы

И. В. Уколова, М. А. Кондакова, Г. Б. Боровский

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск. Россия*  
E-mail: [irina@sifibr.irk.ru](mailto:irina@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** При помощи одномерного голубого нативного электрофореза (1D BN-PAGE) с последующей энзимографией изучены стабильность и активность различных форм АТФ-синтазы, изолированных из митохондрий этилированных побегов гороха, озимой пшеницы и кукурузы. Для солиubilизации органелл использовали мягкий неионный детергент дигитонин, который сохраняет и стабилизирует надмолекулярные ассоциации мембранных белков. Выявлены различия в детергент-устойчивости димерных и мономерных форм фермента между различными видами растений. Предполагается и обсуждается связь выявленных различий с жизненной стратегией изучаемых видов.

**Ключевые слова:** АТФ-синтаза, BN-PAGE, энзимография, дигитонин, горох, озимая пшеница, кукуруза.

**Для цитирования:** Уколова И. В., Кондакова М. А., Боровский Г. Б. Различная детергент-устойчивость АТФ-синтазы в митохондриях гороха, озимой пшеницы и кукурузы // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2021. Т. 37. С. 111–116. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.111>

Митохондриальная АТФ-синтаза (комплекс V) катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, используя потенциальную энергию трансмембранного протонного градиента, который образуется в результате работы ферментов дыхательной цепи. Базовая структура АТФ-синтазы у всех изученных организмов имеет значительное сходство [Structural and functional ... , 2020]. Фермент состоит из каталитического компонента F1 и мембранного компонента Fo, соединённых периферической и центральной ножками.

Изучение нативной организации АТФ-синтазы при помощи методов электронной микроскопии и голубого нативного электрофореза (BN-PAGE) показало, что во внутренней мембране митохондрий фермент присутствует в виде димеров, ассоциированных друг с другом в олигомерные ряды, которые располагаются на изгибах крист [Kühlbrandt, 2019]. Обнаружено, что именно димеризация АТФ-синтазы способствует загибу внутренней мембраны и формированию крист. Димеры АТФ-синтазы чувствительны к действию детергентов и легко распадаются на мономеры при солиubilизации митохондрий у многих изученных организмов. Молекулярная масса мономера у большинства изученных видов составляет 600 кДа [Characterization of

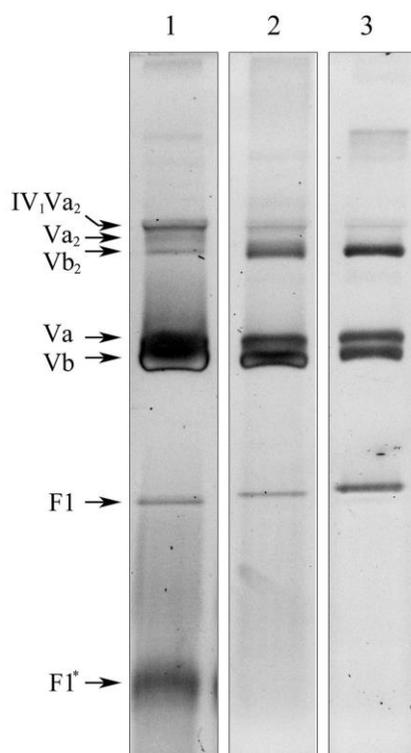
dimeric ... , 2006]. Однако, например, масса фермента у *Chlamydomonas reinhardtii* и *Polytomella* sp., отличающегося очень высокой стабильностью, достигает 800–850 кДа [Oxidative phosphorylation supercomplexes ... , 2018].

АТФ-синтаза растений также очень чувствительна к действию детергентов, тем не менее можно предположить, что чувствительность (или детергент-устойчивость) фермента у разных видов может различаться. Актуальная сравнительная информация относительно особенностей организации, стабильности и активности фермента в различных видах растений отсутствует. В связи с этим целью данной работы явилось изучение устойчивости, а также активности димерной и мономерной форм АТФ-синтазы, солюбилизованных из митохондрий этиолированных побегов гороха, озимой пшеницы и кукурузы. Выбранные виды относятся к различным семействам (Poaceae и Fabaceae), классам (однодольных и двудольных) и, кроме того, различаются по устойчивости к низким температурам.

В работе использовали этиолированные побеги 6-суточных проростков гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский Усатый 55), 4-суточных проростков морозостойкой озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская озимая) и теплолюбивой кукурузы (*Zea mays* L., сорт Катерина), выращенных при 20, 22 и 26 °С соответственно. Выделение, очистку и солюбилизацию митохондрий, а также 1D BN-PAGE и последующий анализ активности АТФ-синтазы в геле проводили по методикам, описанным ранее [New insights ... , 2020]. Для солюбилизации органелл использовали дигитонин, считающийся наиболее мягким детергентом.

Детекция активности фермента в геле и денситометрический анализ соответствующих бандов показали, что у всех изучаемых видов основная часть популяции фермента солюбилизовалась в виде мономерных форм Va и Vb с видимыми массами 700 и 780 кДа (рис., данные денситометрического анализа не приведены). Высокомолекулярная форма Va впервые была обнаружена нами ранее в митохондриях побегов гороха [New insights ... , 2020]. Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что эта форма характерна для митохондрий и других видов растений и, скорее всего, представляет собой фермент, содержащий дополнительные субъединицы или белки. Детекция этой формы, по-видимому, связана с более мягкими условиями солюбилизации и электрофоретического разделения [New insights ... , 2020].

Помимо мономеров, часть популяции АТФ-синтазы у всех видов сохранялась в форме димера Vb<sub>2</sub>, а небольшая часть распалась на субкомплексы, о чём свидетельствует присутствие небольшого количества компонента F1 (а у гороха и продуктов его распада F1\*) (см. рис.). У гороха дополнительно детектировались минорные количества димера Va<sub>2</sub> и суперкомплекса IV<sub>1</sub>Va<sub>2</sub>. Следовые количества этого суперкомплекса можно было наблюдать также у злаков. Таким образом, полученные данные обнаружили сходство в составе солюбилизованных форм АТФ-синтазы у изучаемых видов, однако соотношение этих форм после солюбилизации у разных видов различалось (см. рис.).



*Рис.* Детекция активности АТФ-синтазы в геле 1D BN-PAGE. Представлен скан полиакриламидного градиентного BN-геля (3,5–16 %) с разделившимися солубилизатами митохондрий из побегов гороха (1), озимой пшеницы (2) и кукурузы (3). Скан получен при помощи системы Gel Doc (Bio-Rad). *Обозначения:*  $IV_1Va_2$  – активность АТФ-синтазы в составе суперкомплекса  $IV_1Va_2$ ;  $Va_2$ ,  $Vb_2$ ,  $Va$ ,  $Vb$ ,  $F1$  и  $F1^*$  – активность димеров  $Va_2$  и  $Vb_2$ , мономеров  $Va$  и  $Vb$ , компонента  $F1$  АТФ-синтазы и продуктов его распада  $F1^*$  соответственно

Самое высокое содержание мономеров отмечалось у гороха, а самое низкое – у кукурузы. У гороха и озимой пшеницы основной солубилизированной формой была базовая форма  $Vb$ , в то время как у кукурузы соотношение двух мономеров было близким. Низкое содержание мономера  $Vb$  у кукурузы объясняется тем, что значительная часть популяции фермента сохранялась в димерной форме  $Vb_2$ . Содержание димера АТФ-синтазы у этого теплолюбивого злака существенно превышало таковое у озимой пшеницы и гороха, что указывает на высокую стабильность димерной формы у кукурузы в применяемых условиях солубилизации. Озимая пшеница также отличалась значительным содержанием димера  $Vb_2$ , но при этом минорное количество компонента  $F1$  и отсутствие продуктов его распада ( $F1^*$ ) указывают на высокую стабильность мономерной АТФ-синтазы у этого злака. Следовые количества димерной АТФ-синтазы у гороха, высокое содержание мономеров, а также наличие продуктов распада субкомплекса  $F1$  ( $F1^*$ ) предполагают более высокую чувствительность этого фермента к солубилизации дигитонином. В то

же время, несмотря на более низкую стабильность, суммарная активность всех форм комплекса V у гороха в среднем оказалась на 30 % выше, чем у озимой пшеницы и кукурузы (данные анализа не представлены).

Полученные данные позволяют предположить, что димерная форма АТФ-синтазы у кукурузы и мономерная форма у озимой пшеницы обладают более высокой стабильностью по сравнению с ферментом гороха, но АТФ-синтаза гороха отличается более высокой активностью. Выявленные различия могут быть связаны прежде всего с жизненной стратегией изучаемых видов. Так, более высокая активность фермента гороха может отражать высокие энергетические потребности клеток этого изучаемого объекта, а более высокая устойчивость димера у кукурузы – указывать на более тесную ассоциацию между мономерами, возможно, связанную с базовой термотолерантностью этого вида.

*Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.*

*Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 14-04-01233а.*

#### Список литературы

Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria / N. V. Dudkina, S. Sunderhaus, H. P. Braun, E. J. Boekema // FEBS Lett. 2006. Vol. 580, N 14. P. 3427–3432. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.097>

Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases // Annu Rev. Biochem. 2019. Vol. 88. P. 515–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>

New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria / I. V. Ukolova, M. A. Kondakova, I. G. Kondratov, A. V. Sidorov, G. B. Borovskii, V. K. Voinikov // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2020. Vol. 1861, N 11. Art. 148264. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148264>

Oxidative phosphorylation supercomplexes and respirasome reconstitution of the colorless alga *Polytomella* sp. / H. Miranda-Astudillo, L. Colina-Tenorio, A. Jiménez-Suárez, M. Vázquez-Acevedo, B. Salin, M. F. Giraud, C. Remacle, P. Cardol, D. González-Halphen // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2018. Vol. 1859, N 6. P. 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.004>

Structural and functional properties of plant mitochondrial F-ATP synthase / M. Zancani, E. Braidot, A. Filippi, G. Lippe // Mitochondrion. 2020. Vol. 53. P. 178–193. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.001>

## Different Detergent Stability of ATP Synthase from Pea, Winter Wheat and Maize Mitochondria

I. V. Ukolova, M. A. Kondakova, G. B. Borovskii

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation*

**Abstract.** Mitochondrial ATP synthase is a macromolecular nanomachine, which produces most of the ATP in the cell. This enzyme is located in inner mitochondrial membrane in the form of dimers, which assemble into long rows at the cristae rims. Dimers of ATP synthase are

sensitive to detergent treatment in many organisms, as a result of which they mainly dissociate into monomers. Plant enzyme is also very detergent-sensitive, nevertheless, it can be assumed that the detergent-sensitivity or, *vice versa*, detergent-stability of the enzyme under the treatment may vary in different plant species. In this regard, the aim of this work was to study the detergent-stability, as well as the activity of various forms of ATP synthase, solubilized from the mitochondria of different plant species. For this purpose, we used organelles isolated from etiolated pea, winter wheat, and maize shoots. These species belong to different families (Poaceae and Fabaceae), clades (monocots and dicots) and, in addition, differ in their low temperature tolerance. For the solubilization of organelles, a mild non-ionic detergent digitonin was used, which preserved and stabilized the supramolecular associations of membrane proteins. Using 1D BN-PAGE followed by in-gel enzyme activity assay, it was shown that ATP synthase in all studied species was solubilized mainly as monomers Va and Vb, dimer Vb<sub>2</sub>, supercomplex IV<sub>1</sub>Va<sub>2</sub>, and minor subcomplex F1. In the course of the study, for the first time, differences in the detergent-stability of dimeric and monomeric forms of the enzyme between the studied species were revealed. It was found that the dimeric form in maize and the monomeric form in winter wheat were the most stable; while, pea ATP synthase had the highest activity. The relationship between the revealed features and the life strategy of the species is assumed and discussed.

**Keywords:** ATP synthase, BN-PAGE, in-gel activity assay, digitonin, pea, winter wheat, maize.

**For citation:** Ukolova I.V., Kondakova M.A., Borovskii G.B. Different Detergent Stability of ATP Synthase from Pea, Winter Wheat and Maize Mitochondria. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2021, vol. 37, pp. 111-116. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.111> (in Russian)

#### References

Dudkina N.V., Sunderhaus S., Braun H.P., Boekema E.J. Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett.*, 2006, vol. 580, no. 14, pp. 3427-3432. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.097>

Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases. *Annu Rev. Biochem.* 2019, vol. 88, pp. 515-549. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903>

Ukolova I.V., Kondakova M.A., Kondratov I.G., Sidorov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 2020, vol. 1861, no. 11, art. 148264. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148264>

Miranda-Astudillo H., Colina-Tenorio L., Jiménez-Suárez A., Vázquez-Acevedo M., Salin B., Giraud M. F., Remacle C., Cardol P., González-Halphen D. Oxidative phosphorylation supercomplexes and respirasome reconstitution of the colorless alga *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 2018, vol. 1859, no. 6, pp. 434-444. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.004>

Zancani M., Braidot E., Filippi A., Lippe G. Structural and functional properties of plant mitochondrial F-ATP synthase. *Mitochondrion*, 2020, vol. 53, pp. 178-193. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.001>

Уколова Ирина Владимировна  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: [irina@sifibr.irk.ru](mailto:irina@sifibr.irk.ru)

Ukolova Irina Vladimirovna  
Candidate of Science (Biology)  
Senior Researcher  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: [irina@sifibr.irk.ru](mailto:irina@sifibr.irk.ru)

*Кондакова Марина Александровна*  
кандидат биологических наук  
ведущий инженер  
Сибирский институт физиологии и  
биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск, ул.  
Лермонтова, 132  
e-mail: kondakova-marina@mail.ru

*Kondakova Marina Alexandrovna*  
Candidate of Science (Biology),  
Leading Engineer  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: kondakova-marina@mail.ru

*Боровский Геннадий Борисович*  
доктор биологических наук, профессор  
главный научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии и  
биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск, ул.  
Лермонтова, 132  
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

*Borovskii Gennadii Borisovich*  
Doctor of Sciences (Biology), Professor  
Principal Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

**Дата поступления:** 24.12.2020  
**Received:** December, 24, 2020