



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ВЛИЯНИЕ НИТРИТА НА ДЫХАНИЕ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ И АКТИВНОСТЬ ОХРНОС КОМПЛЕКСОВ МИТОХОНДРИЙ

Газизова Н.И., Рахматуллина Д.Ф.,
Пономарева А.А., Минибаева Ф.В.

Казанский институт биохимии и биофизики
ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия
E-mail: natgazizova@mail.ru

EFFECT OF NITRITE ON THE RESPIRATION OF WHEAT ROOTS AND THE ACTIVITY OF OXPHOS MITOCHONDRIAL COMPLEXES

Gazizova N.I., Rakhmatullina D.F.,
Ponomareva A.A., Minibayeva F.V.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
FIC KazSC RAS, Kazan, Russia
E-mail: natgazizova@mail.ru

В последнее время много внимания уделяется образованию и физиологическому действию оксида азота (NO) на растения. Было показано, что митохондрии являются одним из компартментов клетки, где генерируется эта биоактивная молекула. Комплексы системы окислительного фосфорилирования (ОХРНОС) митохондрий вовлечены в восстановление нитрита до NO. Нами установлено, что обработка корней проростков пшеницы нитритом калия (KNO₂) приводила к двукратному снижению потребления кислорода корнями. Значительное увеличение количества NO в клетках корней показано с помощью конфокальной микроскопии. Методом Blue-Native PAGE детектированы ОХРНОС комплексы митохондрий корней пшеницы. Оценена активность комплексов III и IV. Выявлено, что митохондриальными мишенями NO при действии KNO₂ являются комплексы III₂ и IV, а также суперкомплекс III₂+IV. Обсуждается возможное переключение цитохром с оксидазного пути переноса электронов на альтернативные митохондриальные пути в условиях нитрозильного стресса.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., ОХРНОС комплексы, метод Blue-Native PAGE, митохондрия, оксид азота

Recently much attention has been paid to the formation and physiological effects of nitric oxide (NO) on plants. It was shown that mitochondria are one of the cellular compartments where this bioactive molecule is generated, and the complexes of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) of the mitochondria are involved in the reduction of nitrite to NO. We found that treatment of wheat roots with potassium nitrite (KNO₂) causes a twofold decrease in oxygen consumption by the roots. A significant increase in the amount of NO in root cells was shown by confocal microscopy. Using the Blue-Native PAGE the mitochondrial OXPHOS complexes from wheat roots were detected. The activity of complexes III and IV was evaluated. It was found that in response to KNO₂ the complexes III₂ and IV and supercomplex III₂+IV are among the mitochondrial targets for NO. Possible switch between cytochrome c oxidase mediated electron transfer and alternative mitochondrial pathways in nitrosative stress is discussed.

Keywords: *Triticum aestivum* L., OXPHOS complexes, Blue-Native PAGE method, mitochondria, nitric oxide

Поступила в редакцию: 06.05.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-239-244](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-239-244)

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное исследование физиологического действия оксида азота (NO) на растения выявило, что NO является одной из ключевых сигнальных молекул, вовлеченных в такие важнейшие процессы в растениях, как прорастание семян и пыльцы, рост, фотосинтез, старение листьев и другие. В свободном состоянии NO – газообразное соединение, однако в клетке NO может присутствовать в виде короткоживущего радикала, который легко проникает через мембраны [Wildt et al., 1997]. Действие NO при стрессе пересекается с действием других сигнальных молекул [Shapiro, 2005; Neil et al., 2008; Sami et al., 2018].

Растения активно производят NO в листьях [Yamasaki, 2000], корнях [Stöhr, Stremlau, 2006]. Его образование может происходить ферментативным и неферментативным путем [Yamasaki, 2000; Crawford, 2006] в апопласте [Stöhr, Ulrich, 2002; Bethke et al., 2004] и в различных компартментах клетки [Gupta et al., 2005]. Митохондрии участвуют не только в производстве энергии в клетке, но и являются генераторами активных форм кислорода (АФК) и азота [Gupta et al., 2018]. Внутренняя мембрана митохондрий содержит белковые комплексы окислительного фосфорилирования (OXPHOS), которые участвуют в переносе электронов от восстановленных эквивалентов к кислороду. Создаваемый при этом градиент протонов приводит к синтезу АТФ. В стрессовых условиях нарушения в работе системы OXPHOS приводят к избыточной генерации кислородных радикалов, которые могут вызывать повреждения белковых комплексов. Известно, что NO может быть эффективным регулятором дыхания, воздействуя на активность ферментов гликолиза и окислительного фосфорилирования [Zottiny et al., 2002]. NO впервые был охарактеризован как продукт восстановления нитрита нитрифицирующими бактериями [Stöhr, Stremlau, 2006]. Корни растений находятся в почве, где концентрация NO может быть намного выше, чем на поверхности. В связи с этим, исследование действия NO на корни растений представляет особый интерес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили корни проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская Юбилейная, выращенных в течение 5 дней на 0,25 мМ CaCl₂ при температуре +22°C, освещенности 100 Вт/м² и 12-часовом фотопериоде. В качестве донора NO использовали нитрит калия (KNO₂) в концентрации 10 мМ, в растворе которого инкубировали отсеченные корни проростков пшеницы в течение 1 ч.

Дыхательный газообмен регистрировали манометрическим методом с помощью аппарата Варбурга. Навеску отсеченных корней (150 мг) помещали в сосудики Варбурга с соответствующими растворами: 3 мл 0,25 мМ CaCl₂ – контрольный вариант и 3 мл 0,25 мМ CaCl₂ + 10 мМ KNO₂ – опытный вариант. После 10-мин термостатирования при температуре 30°C каждый час измеряли потребление кислорода корнями пшеницы. Расчеты проводили в мкл за 1 ч на 1 г сырой массы.

Детекцию NO проводили через 1 ч инкубации корней в соответствующих растворах. Продольные срезы кончиков корней инкубировали в течение 10 мин в растворе NO-чувствительного флуоресцентного красителя DAF-FM (10 мкМ) и затем просматривали образцы на конфокальном микроскопе LCM 510 META (Zeiss, Germany) (λ_{ex} 495/ λ_{em} 515 nm).

Митохондрии из клеток корней изолировали методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте перкола [Murcha, Whelan, 2015]. Содержание митохондриального белка определяли с помощью Protein Assay Kit на флуориметре Qubit (Invitrogen, *life* technologies, USA). Митохондрии солибилизировали в буфере, содержащем дигитонин, инкубировали в течение 20 мин на льду и центрифугировали 30 мин при 18 000 g. К полученному супернатанту добавляли 20 мкл раствора Кумасси (5% Кумасси Brilliant Blue G-250 в 750 мМ аминокaproновой кислоте) и сразу же наносили по 20 мкл на дорожки градиентного (4–13%) нативного геля. Нативный гель и буферы для электрофореза готовили согласно Schagger [2001] для BN-PAGE. Визуализацию комплексов в гелях осуществляли с помощью окрашивания Кумасси Brilliant Blue R-250. In-gel активность OXPHOS комплексов и суперкомплексов определяли после

BN-PAGE при помощи специфичных для каждого комплекса субстратов и красителей [Yan, Forster, 2009; Schertl, Braun, 2015]. Анализ белковых комплексов и их активности осуществляли после сканирования гелей на сканере (Epson Perfection 3170 PHOTO, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время считается доказанным, что NO, являясь высоко активной сигнальной молекулой и метаболитом, играет важную роль в жизнедеятельности растений. Для лучшего понимания роли NO и ее влияния на различные физиологические процессы используют доноры этой молекулы. В нашей работе мы исследовали влияние KNO_2 – одного из доноров NO – на дыхание корней проростков пшеницы, содержание в корнях NO и активность ОХРНOS комплексов митохондрий корней. Обнаружено, что уже через 1 ч действия нитрита на корни пшеницы потребление кислорода корнями уменьшилось более чем на 50% (таблица).

Таблица. Потребление кислорода корнями пшеницы в присутствии KNO_2

Вариант	Время, ч		
	1	2	3
Контроль	$359,9 \pm 7,1$	$398,5 \pm 8,1$	$469,1 \pm 9,0$
KNO_2 (10 мМ)	$156,6 \pm 20,4$	$171,5 \pm 5,7$	$169,8 \pm 19,1$

Кроме того, инкубация отсеченных корней в растворе KNO_2 в течение 1 ч приводила к увеличению количества NO в клетках корней. Об этом свидетельствуют данные, полученные с помощью NO-чувствительного флуоресцентного красителя DAF-FM (рис. 1).

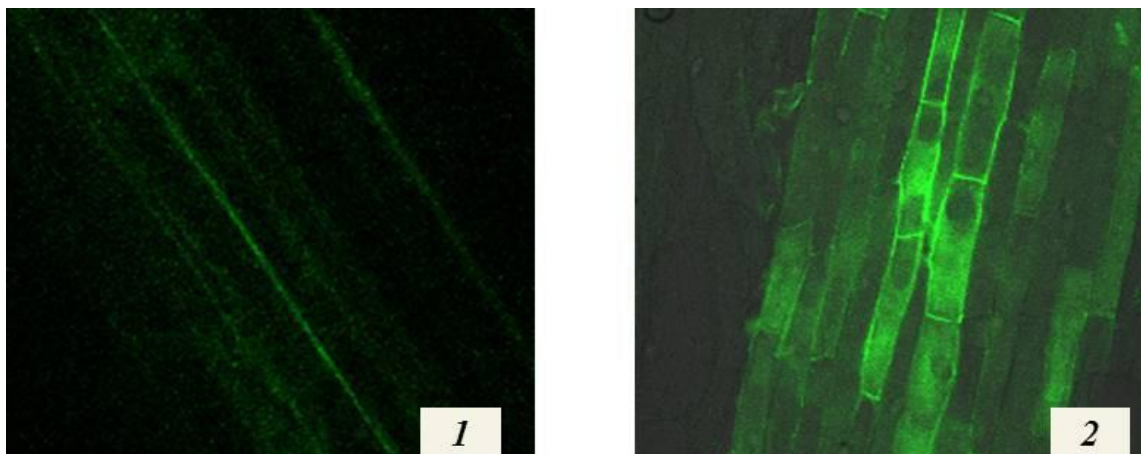


Рис. 1. Детекция NO в отсеченных корнях проростков пшеницы с помощью NO-чувствительного флуоресцентного красителя DAF-FM (10 мкМ; λ_{ex} 495/ λ_{em} 515 nm) после 1 ч инкубации в растворе 10 мМ KNO_2 ; 1 – контроль, 2 – KNO_2 .

В корнях растений основными источниками образования NO являются митохондрии, на которые приходится 2/3 генерированного в корнях NO [Gupta et al., 2018]. Электронтранспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий является одним из сайтов восстановления нитрита до NO, который может образовываться на комплексе III ЭТЦ митохондрий. Восстановление нитрита до NO с участием комплекса III впервые было показано на митохондриях млекопитающих [Nohl et al., 1999]. Предполагают, что механизм образования

NO сходен с механизмом образования супероксида. В генерации NO может также участвовать и цитохром *c* оксидаза (комплекс IV) митохондрий. Образование NO связано с окислением железа нитритом после его связывания на полностью восстановленном ($Fe_3^{2+}Cu_B^+$) кислород-связывающем центре цитохром *c* оксидазы [Gupta et al., 2018]. Когда транспорт электронов на комплекс IV подавлен, еще одним сайтом восстановления нитрита до NO может стать и цитохром *c*. Действуя как нитрит : NO редуктаза, цитохром *c* переходит из гексакоординированного состояния в пентакоординированное, что сопряжено с нитрованием тирозина. У растений участие цитохрома *c* в образовании NO до сих пор не исследовано.

Митохондриальная ЭТЦ является источником образования не только NO, но и АФК. Являясь высоко реактивными молекулами, они могут вступать в реакции друг с другом и образовывать различные производные – активные формы азота (АФА). NO и АФА ингибируют дыхание по-разному. NO вызывает быстрое, селективное, сильнодействующее, но обратимое ингибирование цитохром *c* оксидазы. АФА вызывают медленное, неселективное, но необратимое ингибирование многих митохондриальных составляющих, включая митохондриальные белки, повреждают липиды и увеличивают ионную проницаемость митохондриальных мембран [Brown, 2001].

Millar и Day [1996] на изолированных митохондриях сои показали, что NO ингибирует связанное с цитохром оксидазой дыхание. Частичное ингибирование цитохром оксидазы приводило к синтезу альтернативной оксидазы (АО) *de novo*. Это позволяло предотвратить избыточное восстановление дыхательной цепи и минимизировать образование АФК [Millar, Day, 1996]. Эксперименты на линиях табака, сверхэкспрессирующих АО или, наоборот, лишенных возможности ее экспрессировать, показали, что АО участвует в контроле образования NO [Vanlerberhe, 2013]. Предполагается, что при действии NO происходит переключение потока электронов с цитохром *c* оксидазного пути на АО-путь. При этом низкие концентрации NO (nM) обратимо ингибируют поглощение кислорода, а более высокие (μ M) приводят к необратимому повреждению цитохром *c* оксидазы [Cooper et al., 2008].

Методом BN-PAGE нами были разделены и детектированы окрашиванием Кумасси Brilliant Blue R-250 белковые комплексы и суперкомплексы ЭТЦ (рис. 2А). Анализ in-gel активности комплексов III и IV, после их разделения методом BN-PAGE и окрашивания с использованием специфических субстратов и красителей, выявил снижение активности комплексов III₂, IV, а также суперкомплекса III₂+IV через 1 ч действия нитрита на корни пшеницы (рис. 2Б).

Комплекс IV (цитохром *c* оксидаза) – терминальная оксидаза ЭТЦ, активность которой под влиянием NO изучается наиболее интенсивно по сравнению с другими комплексами. Ранее с помощью метода электронного парамагнитного резонанса было выявлено, что восстановление нитрита на комплексе III обратимо ингибирует цитохром *c* оксидазу [Benamar et al., 2008]. Предложена модель ингибирующего связывания NO с кислородсвязывающим центром цитохром *c* оксидазы посредством двух типов реакций [Gupta et al., 2018].

Таким образом, выявленное нами снижение потребления кислорода корнями проростков пшеницы при действии нитрита может быть обусловлено образованием NO и его ингибирующим влиянием на ОХРНOS комплексы III₂ и IV, а также суперкомплекс III₂+IV. Кроме того, мы полагаем, что в условиях нитрозильного стресса возможно переключение переноса электронов с цитохром *c* оксидазного пути на альтернативные митохондриальные пути, не сопряженные с образованием АТФ.

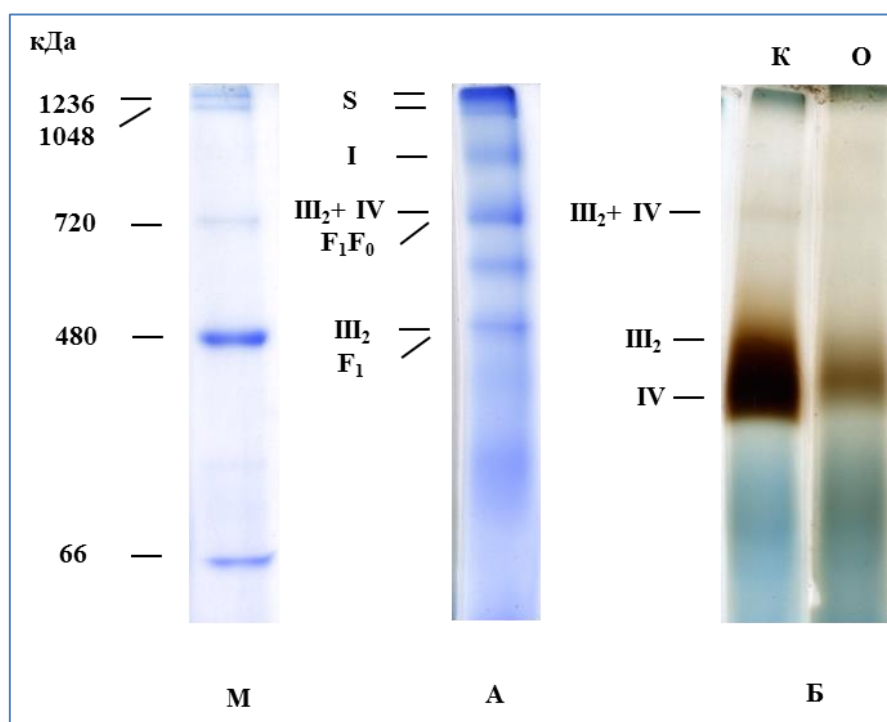


Рис. 2. ОХРНOS комплексы и суперкомплексы, выделенные с помощью BN-PAGE из митохондрий корней пшеницы. М - нативные белковые маркеры, окрашивание Кумасси. А – ОХРНOS комплексы и суперкомплексы: I - комплекс I; III₂ - димер комплекса III; IV - комплекс IV; F₁F₀ - комплекс V (АТФ-синтаза); F₁ - субъединица АТФ-синтазы, S - суперкомплексы I+III₂+IV; III₂ + IV, окрашивание Кумасси. Б - суперкомплексы III₂ + IV, комплекс III₂, комплекс IV; in-gel окрашивание на активность диаминобензидином (DAB) в присутствии цитохрома c. К – контроль, О – опыт (10 мМ KNO₂).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа осуществлялась в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benamar A., Rolletschek H., Borisjuk L., et al. Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008. V. 1777. P. 1268–1275. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.06.002>
2. Bethke P.C., Badger M.R., Jones R. L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues // *The Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 332–341. <https://doi.org/10.1105/tpc.017822>
3. Brown G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001. V. 1504. P. 46–57. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00238-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00238-3)
4. Cooper C.E., Mason M.G., Nicholls P.A. dynamic model of nitric oxide inhibition of mitochondrial cytochrome c oxidase // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008. V. 1777. P. 867–876. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.021>
5. Crawford N. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants // *Journal of Experimental Botany*. 2006. V. 57. P. 471–478. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj050>
6. Gupta K.J., Kumar A., Florez-Sarasa I., et al. Interaction of nitric oxide with the components of the plant mitochondrial electron transport chain // *Journal of Experimental Botany*. 2018. V. 69. P. 3413–3424. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery119>

7. Gupta K.J., Stoimenova M., Kaiser W.M. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ // *Journal of Experimental Botany*. 2005. V. 420. P. 2601–2609. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri252>
8. Millar A.H., Day D.A. Nitric oxide inhibits cytochrome the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria // *FEBS Letters*. 1996. V. 398. P. 155–158. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01230-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01230-6)
9. Murcha M.W., Whelan J. Isolation of intact mitochondria from model plant species *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. In: *Plant mitochondria. Methods and Protocols*. Ed. by J. Whelan, M.W. Murcha. Humana Press, NY, 2015. P. 1–12. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2639-8_1
10. Neil S., Bright J., Desikan R., et al. Nitric oxide evolution and perception // *Journal of Experimental Botany*. 2008. V. 59. P. 25–35. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm218>
11. Nohl H., Staniek K., Kozlov A.V. Involvement of mammalian mitochondria in recycling of the NO-metabolite nitrite to nitric monoxide // *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. V. 27. P. 82.
12. Sami F., Faizan M., Faraz A., et al. Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress // *Nitric Oxide*. 2018. V. 73. P. 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.12.005>
13. Schägger H. Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria // *Methods in Cell Biology*. 2001. V. 65. P. 231–244. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)65014-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)65014-3)
14. Schertl P., Braun H.P. Activity measurements of mitochondrial enzymes in native gels. In: *Plant mitochondria. Methods and Protocols*. Ed. by J. Whelan, M.W. Murcha. Humana Press, NY, 2015. P. 131–138. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2639-8_9
15. Shapiro A. Nitric oxide signaling in plants // *Vitamine and Hormone*. 2005. V. 72. P. 339–338. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72010-0](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72010-0)
16. Stöhr C., Stremlau S. Formation and possible role of nitric oxide in plant roots // *Journal of Experimental Botany*. 2006. V. 57. P. 463–470. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj058>
17. Stöhr C., Ulrich W.R. Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space // *Journal of Experimental Botany*. 2002. V. 53. P. 2293–2303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf110>
18. Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants // *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. V. 14. P. 6805–6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
19. Wendehenne D., Durner J., Klessing D.F. Nitric oxide a new player in plant signaling and defence responses // *Current Opinion in Plant Biology*. 2004. V. 7. P. 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.002>
20. Wildt J., Kley D., Rockel F., et al. Emission of NO from several higher plant species // *Journal of Geophysical Research*. 1997. V. 102. P. 5919–5927.
21. Yamasaki H. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo* // *Philosophical Transactions of Royal Society London B Biological Science*. 2000. V. 355. P. 1477–1488. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0708>
22. Yan L., Forster M. Resolving mitochondrial protein complexes using nongradient blue native polyacrylamide gel electrophoresis // *Analytical Biochemistry*. 2009. V. 389. P. 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.03.043>
23. Zottini M., Formentin E., Scattolin M., et al. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo* // *FEBS Letters*. 2002. V. 515. P. 75–78. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02438-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02438-9)