

Pulsing-активность митохондрий *Triticum aestivum* зависит от их подвижности: влияние холодной акклимации

Абрахимова Й.Р.^{1*}, Абрахимов Ф.А.²

¹ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань;

² Институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

*Адрес для корреспонденции: yoldez.abdrahimo@kpfu.ru

Ключевые слова: пульсации трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$), 'митофлешы' АФК, конфокальная лазерная микроскопия, интенсивность флуоресценции, мультитрековый анализ, мобильность митохондрий, низкие температуры, *Triticum aestivum*

Митохондрии, как известно, осуществляют свою мультифункциональную роль в поддержании и регуляции клеточных процессов во многом благодаря уникальным свойствам внутренней мембраны, в первую очередь способностью генерировать высокий трансмембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$). Наряду с энергообеспечением, модуляция $\Delta\Psi_m$ может быть задействована в системе клеточного сигналинга и проявляться в высокоамплитудных флуктуациях интенсивности флуоресценции специфических красителей, позволяющих детектировать изменения $\Delta\Psi_m$ и генерации активных форм кислорода (АФК) на уровне индивидуальных органелл в режиме реального времени, как правило, в секундных диапазонах. Динамические феномены, названные пульсациями $\Delta\Psi_m$ ('pulsing'), были обнаружены с помощью производных тетраметилродамина (TMRM) еще в конце 20 века [1], тогда как часто ассоциированные с ними «вспышки» ('mitoflashes') флуоресценции АФК-детектирующих систем - относительно недавно [2]. На данный момент природа динамических феноменов, в том числе триггерные механизмы, остаются во многом непонятыми.

В данной работе исследовали зависимость динамических событий от мобильности митохондрий; в качестве контрольных объектов исследований были использованы колеоптили этиолированных проростков озимой пшеницы (*T. aestivum* L., сорт Мироновская 808), выращенных при 23-25°C (3 сут)(контроль), часть которых подвергались холодной акклимации (0-4°C, 5 сут)(опыт). Образцы срезов тканей окрашивали 0.5 μ M TMRM или совместно с 10 μ M DCF, просматривали в Zeiss LSM META 510 с последующим мультитрековым анализом в ImageJ (Fiji) с помощью программы TrackMate v6.0.1 [3]. Для количественной оценки параметров мобильности митохондрий (скорость, направление и топография транслокации, трансформация морфологии) использовали time-lapse серии фреймов (3 мин) области интересов (ROI) площадью 2000-3000 μ m² с временным разрешением 0.8 мс/пиксель (500 мс/фрейм).

Исходя из данных трекинг-анализа индивидуальных митохондрий контроля, органеллы были условно отнесены к 3 субпопуляциям по скорости и характеру движения - «бегущие», «бродячие» и «сидячие». Перемещение органелл за 3 мин мониторинга составило более 10 μ m у «бегущих», 1-10 μ m и менее 1 μ m - у «бродячих» и «сидячих», соответственно. «Сидячие» органеллы с минимальной подвижностью составляли практически половину от общего числа митохондрий в ROI и характеризовались более высокой pulsing-активностью (80% от общего числа событий) по сравнению с мобильными. Интересно отметить, что в момент пульсации скорости движения мобильных органелл резко снижались до уровня таковых «сидячей» субпопуляции. «Обездвиживание» митохондрий антицитоскелетным агентом латранкулин В (300 нм) также увеличивало pulsing-активность образцов. Факты усиления пульсирующей активности в момент остановки органелл позволяют предположить, что в субкортексе клеток могут существовать сайты реорганизации и/или модификации мембранных компонентов оболочки митохондрий, которые ведут к образованию временных поровых каналов, детектируемых по быстрому и обратимому характеру выброса из органелл TMRM вследствие транзитного падения $\Delta\Psi_m$. Последнее часто, но не всегда сопровождалось «вспышками» внутримитохондриального окисления DCF, связанного с генерацией АФК.

После длительной холодной адаптации отмечали увеличение интенсивности флуоресценции TMRM почти в 2 раза, обусловленное $\Delta\Psi_m$ -зависимым накоплением данного красителя, на фоне снижения pulsing-активностей органелл. Одновременно средняя скорость перемещений митохондрий в клетках уменьшалась, тогда как степень их плейоморфности, наоборот, возрастала. Сложные формы органелл характеризовались преимущественно амебоидным типом двигательного поведения, параметры динамичности которого на данный момент трудно количественно оценить. Таким образом, высокая амплитуда, кратковременность и пространственная локальность пульсаций митохондрий позволяет предположить об их сигнальном значении для клеток, тогда как индукция при остановке движения органелл при оптимальных температурных условиях или, наоборот, «купирование» pulsing-активности при гипотермии – о

проявлении системной, а не строго стохастической, как постулируется в литературе, природы изучаемых динамических феноменов.

Список литературы

1. Loew L.M., Tuft R.A., Carrington W., et al. // Biophysical journal. 1993. 65 (6), 2396-2407.
2. Wang W., Fang H., Groom L. et al. // Cell. 2008. 134, 279–290.
3. Tinevez J.-Y., Perry N., Schindelin J., et al. // Methods. 2017. 115, 80–90.

The pulsing-activities of *Triticum aestivum* mitochondria depend on their mobility: cold acclimation influence

Abdrakhimova Y.R. ^{1*}, Abdrakhimov F.A. ²

¹ Institute of fundamental medicine and biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Russia;

² Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Russia

*Author for correspondence: voldez.abdrahimova@kpfu.ru

Key words: transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) pulsing, ROS mitoflashes, confocal laser microscopy, fluorescence intensity, multi-tracking analysis, mitochondrial mobility, cold acclimation, *Triticum aestivum*

Abstract

Mitochondria as well-known fulfill a multifunctional role in a maintenance and regulation of the cell processes mainly due to the unique properties of the inner membrane, first of all the ability to generate transmembrane potential ($\Delta\psi_m$). Along with energy supply, fluctuations of $\Delta\psi_m$ might be involved into cell signaling systems because of their transitory high-amplitude, sharp and short-time (in the second range) character. Such dynamic events termed as 'pulsings' or 'flickerings' of $\Delta\psi_m$ were revealed by the use of tetramethyl rhodamine derivatives (TMRM) at the end of 20th century [1]. Often coupled with these, reactive oxygen species (ROS) flashes or 'mitoflashes' were detected recently [2]. To date, nature of the dynamic phenomena, including triggering mechanisms, remains mainly obscure.

We researched the dependence the frequency of mitochondrial dynamic events on the motility of the organelles in the coleoptile cells of wheat seedlings (*T.aestivum*) that were grown in the dark (23-25°C, 3d) and cold acclimated (0-4°C, 5d). Samples of tissue slices dyed by 0.5 μ M TMRM or/and 10 μ M DCFH₂ were analyzed by means of LSM510 META (Carl Zeiss MicroImaging) with subsequent multi-tracking analysis (ImageJ (Fiji), Track-Mate v6.0.1) [3]. For quantitative estimation of mitochondrial mobility parameters (traffic velocity, direct and topography of translocation, morphology transformation), we applied frame time-lapse series received by real-time monitoring for 3 min in 2000-3000 μ m² of ROI with temporal resolution 0.8 ms/pixel (500 ms/frame).

According to single-organelle tracking analysis, cell chondriom was conditionally divided into 3 basic subpopulations, namely 'running' (more than 10 μ m distance traveled for 3 min), 'walking' (1-10 μ m) and 'sitting' (less than 1 μ m) ones. The high pulsing activity (80% from the total events) was inherent mainly for non-mobile mitochondria ('sitting'), which, in turn, were 55% from the total number of organelles in ROI. It should be stressed that at the moment when the pulsing events were happen, velocity speeds of the mobile mitochondria declined sharply and became common with those of 'sitting' ones. Interestingly, mitochondrial 'immobilization' by anticytoskeletal agent latrunculin (300 nm) also increased the pulsing activity. These facts allow to propose being of the cell sub-cortex sites of reorganizing and/or modifying of membrane components to result in a formation of the transient pore channels that detected in a sudden and reversible manner of TMRM emission due to $\Delta\psi_m$ dissipation. The latter was often, but not at every turn, accompanied by flashing of intramitochondrial oxidation of DCFH₂, widely applicable ROS-detecting indicator.

After long-term cold acclimation, TMRM fluorescence intensity in mitochondria increased up to 2 times that could be interpreted as $\Delta\psi_m$ -dependent accumulation of this dye besides the pulsing-activity diminished. Simultaneously, average rates of mitochondrial traffic in cells decreased whereas (pleomorphy???) degree, (vice versa) on the contrary, increased. Irregular-shape, with complex organization, mitochondria were characterized by mainly amoeboid-type of motility behavior which dynamic parameters are difficult to quantitatively estimate at the moment. Thus, characteristics of ROS mitoflashes allow to suggest their role in cell signalling whilst the stopping of mitochondrial traffic before pulsing induction could be indicated on systemic, not only stochastic as postulated in literature, nature of the dynamic phenomena.

Таким образом, индукция пульсирования при остановке движения органелл при оптимальных температурных условиях или, наоборот, «купирование» pulsing-активности при гипотермии позволяют предположить проявление системной или детерминированной, а не строго стохастической, как постулируется в литературе, природы изучаемых динамических феноменов, что .

Reference

1. Loew L.M., Tuft R.A., Carrington W., et al. // *Biophysical journal*. 1993. 65 (6), 2396-2407.
2. Wang W., Fang H., Groom L. et al. // *Cell*. 2008. 134, 279–290.
3. Tinevez J.-Y., Perry N., Schindelin J., et al. // *Methods*. 2017. 115, 80–90.