

ПРОТОМИТОХОНДРИИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ, ИХ СХОДСТВО И ОТЛИЧИЕ ОТ МИТОХОНДРИЙ

© 2015 г. Е.А. Бегунова, Н.Л. Векшин

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила 19.08.15 г.

Изучен ряд свойств протомитохондрий – малых молодых митохондриальных органелл клеток животных. Протомитохондрии были получены фильтрованием общей суспензии митохондрий печени крысы через калиброванные миллиметровые фильтры. Протомитохондрии имеют активную дыхательную цепь, о чем свидетельствует высокая скорость потребления кислорода при окислении сукцината и NADH. Шунтирующая (не зависящая от кислорода) сукцинат:тетразолий-редуктазная активность протомитохондрий ниже, а шунтирующая NADH-тетразолий-редуктазная наоборот выше, чем у митохондрий. Методами электрофореза и гель-фильтрации не обнаружено качественных различий мажорных белков в протомитохондриях диаметром 0,25–0,45 мкм от митохондрий, но выявлены некоторые количественные различия. Указанные различия, по-видимому, отражают процесс внутриклеточного созревания протомитохондрий до митохондрий. Полученные данные важны для понимания процессов митохондриогенеза в специализированных клетках животных и роли протомитохондрий в клеточном метаболизме.

Ключевые слова: митохондрии, протомитохондрии, дыхательная цепь, биогенез митохондрий.

Митохондрии (МХ) – двухмембранные органеллы эукариотических клеток, одной из основных функций которых является аэробный синтез АТФ [1]. Митохондрии различаются по размеру, плотности, участию в метаболизме клеток, старении и апоптозе [2–5]. В специализированных клетках органов животных (печень, мышцы, сердце, почки и др.) одновременно имеются три популяции этих органелл: молодые протомитохондрии (ПРМХ) диаметром от 0,1 до 0,45 мкм, зрелые МХ – около 1 мкм и старые постмитохондрии – около 2 мкм [6,7]. Соотношение этих трех популяций зависит от вида клеток, возраста и ряда других параметров [6]. Обычно ПРМХ составляют в клетках около 30% всех митохондриальных органелл [6,7].

В нашей лаборатории ПРМХ были впервые выделены из клеток млекопитающих и изучены некоторые свойства этих органелл [7–10]. С помощью электронной микроскопии было определено, что ПРМХ размером 0,2–0,45 мкм обладают обеими мембранами – наружной и внутренней. Нами были выявлены высокие активности NADH:феррицианид-редуктазы, NADH:тетразолий-редуктазы, сукцинат:феррицианид-редуктазы и сукцинат:тетразолий-редуктазы в ПРМХ. При этом количество цито-

хромов в ПРМХ заметно ниже, чем в МХ. Группа австралийских авторов изучила свойства ПРМХ в проростках растительных клеток [11].

Цель данной работы – продолжение изучения биохимических свойств ПРМХ из печени крысы в сравнении со зрелыми митохондриями. Это необходимо для понимания процессов митохондриогенеза в специализированных клетках животных и для установления вклада ПРМХ в метаболизм клетки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общую фракцию митохондрий из печени крысы выделяли по стандартной методике с некоторыми модификациями [7–9], позволяющими получить широкий диапазон тяжелых и легких органелл. Работу проводили при температуре 4°C, все растворы охлаждали на льду. Печень крысы помещали в 20 мл среды выделения, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,5 мМ EGTA и 10 мМ HEPES (pH 7,4), после чего ткань продавливали через пресс и затем гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 g для осаждения клеток, оставшихся целыми. Супернатант центрифугировали 20 мин при 10000 g, в результате чего осадок содержал не только МХ, но и много

Сокращения: МХ – митохондрии, ПРМХ – протомитохондрии, р-NTV – паранитротетразолий фиолетовый.

более легких ПРМХ. Осадок ресуспендировали в 10 мл среды выделения, разделяли на аликвоты и использовали для опытов в тот же день, а также замораживали при -18°C с целью последующего использования. Концентрацию белка определяли УФ-экспресс-методом [12].

Суспензию митохондрий (с концентрацией белка около 1 мг/мл) пропускали через фильтры Whatman (США) на нитроцеллюлозной основе с размером пор 0,22 и 0,45 мкм или через микропористые капроновые мембранные фильтры ООО НПП «Технофильтр» с размером пор 0,15, 0,25, 0,45, 0,8 и 2,0 мкм. В случае замороженных образцов МХ размораживали и аккуратно встряхивали на вортексе в течение 1 мин для дезинтеграции агрегатов. Выделенные с помощью фильтрации ПРМХ (мелкие зародышевые митохондрии) размерами не более 0,15, 0,25 и 0,45 микрон использовали для сравнения с МХ размерами свыше 0,8 микрон, а также с общей фракцией митохондрий.

Дыхательную активность ПРМХ и митохондрий определяли по скорости потребления кислорода с помощью кларковского электрода с термооксиметром «Эксперт-001» (ООО «Эко-ник», Россия). Дыхательный контроль рассчитывали по отношению скорости потребления кислорода в ходе окисления сукцината (V1) после добавления 200 мкМ АДФ (V3) к скорости до добавления АДФ (V2). Инкубационная среда содержала 5 мМ сукцината, 2 мМ фосфата калия и 150 мМ сахарозы, рН 7,5.

Размер частиц определяли методами фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Количество ПРМХ и МХ подсчитывали в камере Горяева при увеличении $\times 640$. К 50 мкл исходной суспензии ПРМХ или МХ добавляли 100 мкл инкубационного буфера (рН 7,4) и 50 мкл раствора 0,1 М NaCl. Суспензию аккуратно встряхивали на вортексе в течение 1 мин для дезинтеграции агрегированных МХ, пропускали через фильтр с размером пор 0,15, 0,25, 0,45, 0,8 или 2,0 мкм и затем наблюдали на микроскопе в режиме фазового контраста. Для окрашивания использовали флуоресцентный краситель акридин оранжевый с последующим наблюдением на конфокальном микроскопе FluoView FV10i-w (Olympus, Австрия). Для этого к 200 мкл полученной суспензии добавляли 15 мкл красителя (исходная концентрация 0,1 мг/мл). Органеллы окрашивали в течение 10–20 мин при комнатной температуре. Образцы центрифугировали 3 мин при 7000 об/мин и затем отмывали от избытка красителя рабочим буфером. К осадку добавляли 100 мкл буфера, пропускали через миллипоровый

фильтр и наблюдали во флуоресцентном режиме на конфокальном микроскопе.

Спектры флуоресценции акридинового оранжевого, флавинов и триптофановых остатков белков регистрировали в кварцевых кюветках на компьютеризированном спектрофлуориметре Perkin-Elmer MF44B.

ДНК из ПРМХ и МХ получали по методике Birnboim и Doly [13]. Электрофорез ДНК проводили в 1%-м агарозном геле по стандартной методике. В качестве стандартов использовали GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Количество ДНК определяли тремя способами: по оптической плотности при 250 нм на спектрофотометре; по интенсивности флуоресценции акридинового оранжевого на спектрофлуориметре SLM-4800 (SLM Inc.) (длина волны возбуждения 450 нм, излучения – 600 нм) при нормировке проб по концентрации белка; электрофоретически.

Белковый состав ПРМХ и МХ сравнивали методом денатурирующего SDS-гель-электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле [13]. Для приготовления проб общую суспензию митохондрий пропускали через миллипоровые фильтры, после чего тщательно промывали фильтры 0,6 мл рабочего буфера, содержащего 2% додецилсульфата натрия. Образцы, полученные в результате смыва с фильтров, анализировали, используя стандартную методику электрофореза по Лэммли [14,15]. На дорожку наносили 25 мкл образца ПРМХ и МХ с концентрацией белка 100 мкг в пробе. Разделение проводили в камере для вертикального электрофореза, размер стекол 20×20 см. В качестве белковых стандартов использовали Protein Marker (New England Biolabs, Ink.).

Белковый и ферментный состав ПРМХ (до 0,45 мкм) и МХ (0,8–2 мкм) определяли также методом гель-фильтрации на колонке $50 \times 0,8$ см с сефадексом G-50, G-75 или G-100 (Pharmacia, Швеция), или Toyopearl HW-55 (Tosoh Bioscience, Япония). Использовали рабочий буфер 10 мМ трис-HCl, рН 7,5, содержащий 50 мМ NaCl и 0,1–3% додецилсульфата натрия, додецил- β -D-мальтозид (Sigma, США) или 0,1% α -октил- β -D-глюкопиранозид (Sigma, США).

Ферментативную шунтирующую (без участия всей дыхательной цепи) реакцию окисления сукцината или NADH в ПРМХ и МХ детектировали при 540 нм по оптической плотности формазана, образующегося из восстанавливаемого субстратом паранитротетразолия фиолетового (p-NTV), на спектрофотометре Specord M-40 (Carl Zeiss Jena, ГДР) в сантиметровых кюветках, согласно методу Беляковича

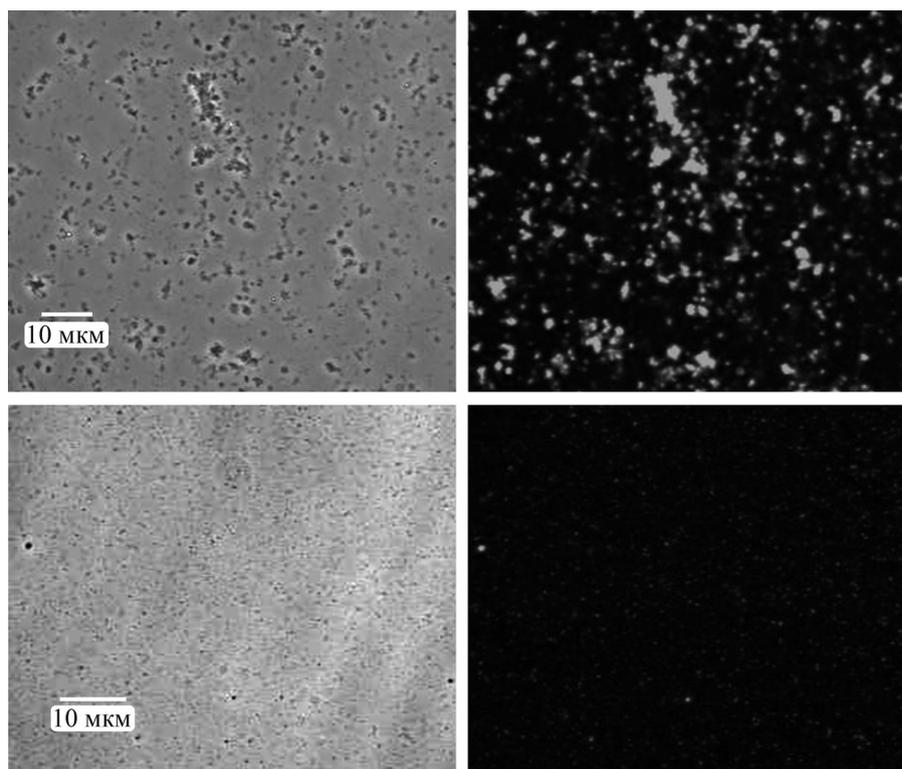


Рис. 1. Митохондрии (вверху) и протомитохондрии < 0,45 мкм (внизу) из печени крысы. Конфокальная микроскопия. Микроскоп FluoView FV10i-w (Olympus) в режиме «фазовый контраст» (слева) и «зеленая флуоресценция» при окрашивании акридиновым оранжевым (справа). Возбуждающий лазер 473 нм. Апертура = 1.

[6]. К 500 мкл ПРМХ, МХ или раствора фермента в рабочем буфере (содержащем 0,1% детергента) добавляли 25 мкл 10 мМ р-NTV и 10 мкл 10 мМ NADH или 50 мкл 10 мМ сукцината. Обе активности для ПРМХ и МХ регистрировали по точкам в течение 20 мин при температуре 30°C, а для ПРМХ и МХ, лизированных детергентом, – 16 ч при температуре 20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общую суспензию пропускали через фильтры с размером пор 0,8; 0,45 и 0,22 мкм для получения фракций МХ и ПРМХ. Фазово-контрастная микроскопия показала, что в исходном общем препарате содержится примерно 65% органелл диаметром от 0,45 до 2 мкм и 35% диаметром менее 0,45 мкм (рис. 1). Для подтверждения митохондриальной природы полученных органелл препараты обрабатывали 0,1%-м раствором акридина оранжевого, который способен окрашивать МХ-ДНК. В принципе этот краситель может прокрашивать не только ДНК, но именно в ДНК он флуоресцирует наиболее сильно. При окрашивании МХ наблюдалась заметная флуоресценция. ПРМХ

окрашивались менее интенсивно (рис. 1). Это согласуется с нашими предшествующими данными [7,10], что количество ДНК в каждой отдельной ПРМХ многократно меньше, чем в каждой МХ. Сигнал от окрашенных акридиновым оранжевым ПРМХ < 0,22 мкм (на рис. не показано) был еще слабее, чем от ПРМХ < 0,45.

Еще одним доказательством митохондриальной природы упомянутых органелл явилось прямое определение наличия в них специфической митохондриальной ДНК с помощью электрофореза. ДНК, выделенная нами из ПРМХ и МХ, располагается в геле на одном уровне (рис. 2), она идет выше низкомолекулярных олигонуклеотидных стандартов и соответствует обычной МХ-ДНК с молекулярным весом 16 kb. При этом количество копий молекул ДНК в ПРМХ гораздо меньше, чем в МХ.

В табл. 1 приведены спектрофотометрические данные, позволяющие оценить соотношение белок/ДНК в различных фракциях ПРМХ. Эти данные еще раз подтверждают ранее сделанные наблюдения [7,9,10] о том, что количество ДНК в ПРМХ при их созревании до МХ

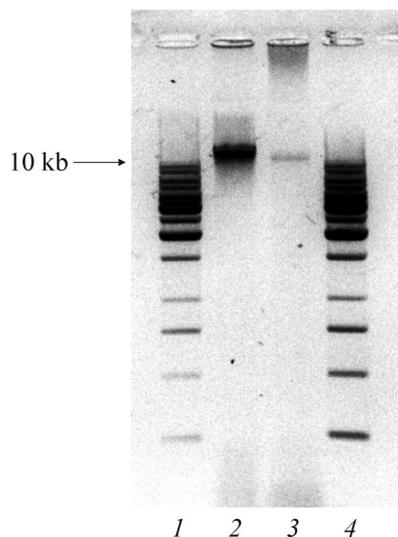


Рис. 2. Гель-электрофорез ДНК из МХ (диаметр частиц свыше 0,8 мкм, дорожка 2) и ПРМХ (диаметр 0,25–0,45 мкм, дорожка 3). Стандарты – дорожки 1 и 4.

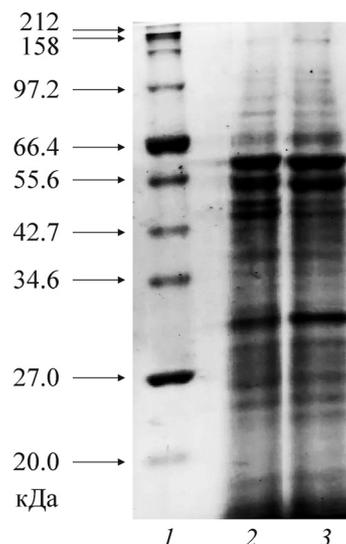


Рис. 3. Электрофорез белков митохондрий и промитохондрий в 10% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия: 1 – стандарты, 2 – МХ > 0,8 мкм, 3 – ПРМХ < 0,45 мкм.

увеличивается пропорционально количеству белка.

Для сравнения белкового состава ПРМХ и МХ использовали метод гель-электрофореза. Поскольку в состав МХ и ПРМХ входят белки как гидрофобной, так и гидрофильной природы, то для более адекватного анализа мы исключили в процессе приготовления проб стадию осаждения белков трихлоруксусной кислотой и промывку ацетоном, что дало возможность сделать более полное сравнение белкового состава, но несколько ухудшило качество электрофореза. Из литературы известно, что полный перечень *MitoCarta* содержит около 1100 генных локусов, кодирующих МХ-белки [16]. Одним из уникальных свойств протеома МХ является большой разброс в соотношениях его компонентов [17]. Отмечалось многократное расхождение количеств различных белков протеома МХ в разных объектах и разных условиях [18]. По-видимому, это связано не только с тем,

что в разных условиях от 15 до 25% белков МХ кодируются собственной ДНК (а от 85 до 75% – ядерной), но и с сильной вариабельностью самого МХ генома, на что особо обращалось внимание в работе [16]. Тем не менее белковый состав ПРМХ (диаметр частиц от 0,22 до 0,45 мкм) и МХ (диаметр частиц свыше 0,8 мкм) из печени крысы оказался в наших опытах почти одинаковым. Сравнительный анализ белкового состава ПРМХ и МХ с помощью гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия не обнаружил существенных различий белков ПРМХ и МХ (рис. 3). В обоих случаях мы видим две мажорные полосы на уровне стандартов 55–60 кДа и полосу сходной интенсивности на уровне 30 кДа (последняя может принадлежать одной из субъединиц сукцинатдегидрогеназы, активность которой мы наблюдаем как для МХ, так и для ПРМХ). Некоторые количественные различия можно видеть для

Таблица 1. Спектрофотометрическое соотношение белок/ДНК в митохондриальных фракциях из печени крысы

Название фракции	$D_{286 \text{ нм}}$ (белок)	$D_{250 \text{ нм}}$ (ДНК и РНК)	D_{286}/D_{250}
МХ	0,55	0,75	0,74
МХ < 0,8 мкм	0,63	0,88	0,71
ПРМХ < 0,45 мкм	0,61	0,85	0,71
ПРМХ < 0,15 мкм	0,56	0,76	0,74

Примечание. Измерено после разрушения органелл в 2% додецилсульфате натрия. Концентрации по белку не выравнивались.

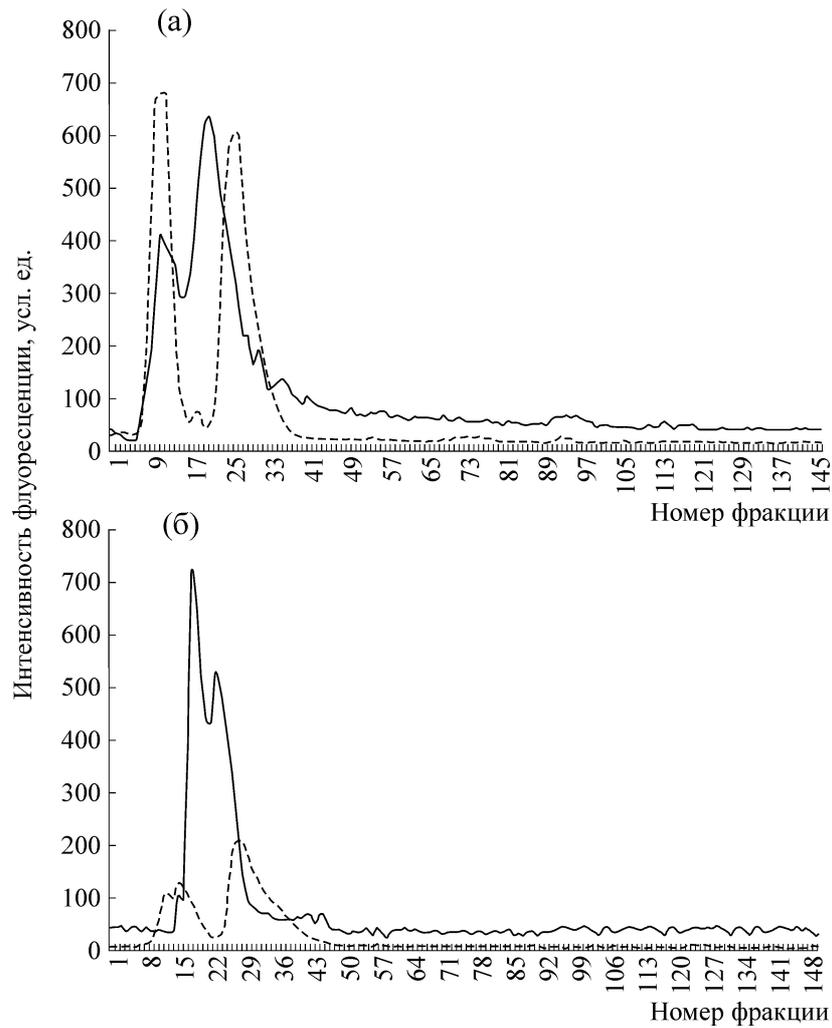


Рис. 4. (а) – Гель-фильтрация белков митохондрий (0,8–2 мкм) на колонке с сефадексом G-75. (б) – Гель-фильтрация белков протомитохондрий (0,15–0,45 мкм) на колонке с сефадексом G-75. Обозначения: сплошная линия – флуоресценция триптофанов, пунктир – флуоресценция флавинов.

белков с молекулярным весом 45 и 50 кДа, интенсивность полос которых для МХ вдвое больше, чем для ПРМХ. Полученные данные несколько отличаются от тех, которые мы ранее выявили для ПРМХ и МХ из сердца быка [7].

Сравнительный анализ белкового состава ПРМХ и МХ был также проведен с использованием метода гель-фильтрации. Как для ПРМХ (диаметр частиц от 0,22 до 0,45 мкм), так и для МХ (диаметр частиц свыше 0,8 мкм) обнаружены два высокомолекулярных белковых пика, в каждом из которых есть NADH-дегидрогеназная и сукцинат-дегидрогеназная ферментативные активности, а также детектируется флуоресценция флавинов. Варьирование условий гель-фильтрации, в том числе использование различных детергентов в составе рабочего буфера (0,1–3% додецилсульфата натрия,

додецил-β-D-мальтозида, α-октил-β-D-глюкопиранозида, тритона X-100) и носителей для хроматографии (сефадекс G-50, G-75, G-100; Тоуорpearl HW-55) не привело к улучшению результата хроматографии, что может объясняться известным фактом сложности гель-фильтрационного анализа мембранных белков. На рис. 4 представлен типичный результат гель-фильтрационного анализа белков МХ и ПРМХ из печени крысы на колонке с сефадексом G-75. При исходно равном содержании белка количество флавопротеинов в ПРМХ, судя по гель-фильтрации, заметно ниже, чем в МХ. Интересно, что профиль флавобелков ПРМХ более беден и заметно отличается от МХ.

Сравнительный анализ ферментативных активностей некоторых компонентов дыхательной цепи показал, что ПРМХ, как и МХ, обладают

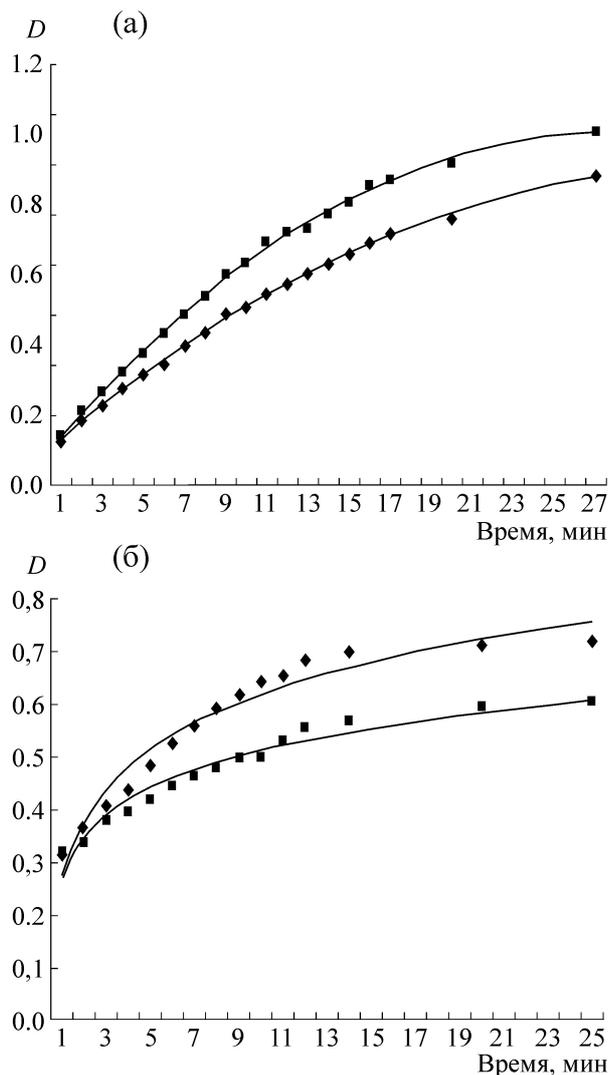


Рис. 5. (а) – Кинетика NADH:тетразолий-редуктазной реакции в суспензии митохондрий диаметром 0,8–2 мкм (ромбы) и протомитохондрий диаметром 0,15–0,45 мкм (квадраты). (б) – Кинетика сукцинат:тетразолий-редуктазной реакции в суспензии митохондрий диаметром 0,8–2 мкм (ромбы) и протомитохондрий диаметром 0,15–0,45 мкм (квадраты).

высокой NADH-дегидрогеназной активностью, причем NADH:феррицианид-редуктазная активность мелких (0,1 и 0,2 мкм) ПРМХ выше, чем более крупных [7,10]. ПРМХ имеют высокую NADH:тетразолий-редуктазную активность. На рис. 5а показана кинетика этой реакции при использовании р-NTV. Скорость в случае ПРМХ ~ на 25% выше, чем МХ. Значит, в ПРМХ имеется некоторое количество субъединиц NADH-дегидрогеназы (в митохондриях, как известно, 45 субъединиц), которых более чем достаточно для шунтирующей реакции с тетразолием (в этой реакции ни флавиномононуклеотид, ни убихинон не принимают участия

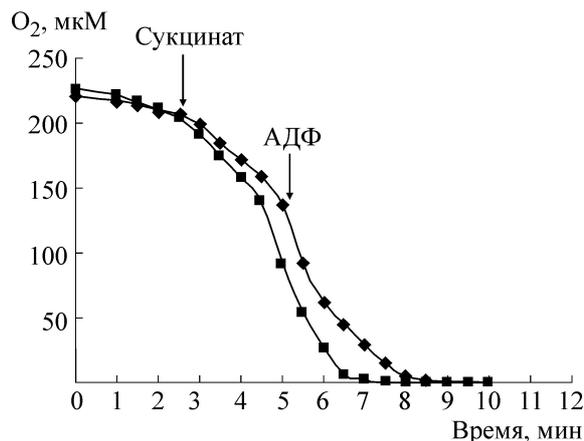


Рис. 6. Потребление кислорода в суспензии общей фракции нативных митохондрий (ромбы) и протомитохондрий диаметром < 0,45 мкм (квадраты). Кривые получены по точкам, регистрация каждые 30 с.

[10]). Судя по скоростям, доступность активных центров в ПРМХ для NADH и тетразолия выше, чем в МХ.

Сукцинат:тетразолий-редуктазная активность ПРМХ была, наоборот, на 30% ниже, чем МХ (рис. 5б). Хотя в ПРМХ имеется сколько-то субъединиц сукцинатдегидрогеназы, которых достаточно для шунтирующей реакции с тетразолием (в этой реакции флавинадениндинуклеотид и убихинон не принимают участия), но количество молекул фермента или/и доступность активного центра в них для сукцината и тетразолия заметно ниже, чем в МХ, иначе невозможно объяснить их меньшую активность.

Одной из важнейших функциональных характеристик МХ является дыхание – потребление кислорода. Удельные скорости окисления сукцината в дыхательной цепи ПРМХ и МХ, а также величина дыхательного контроля при добавлении АДФ были определены полярографически. Как видно из рис. 6, ПРМХ размером < 0,45 мкм дышат на сукцинате быстрее, чем МХ, но характеризуются меньшим дыхательным контролем. У мелких ПРМХ (< 0,22 мкм) дыхание на сукцинате еще интенсивней, а величина дыхательного контроля равна 1,0 (табл. 2). Низкий дыхательный контроль свидетельствует, по-видимому, о том, что дыхательная цепь разобщена с АТФ-синтетазой. Дыхание ПРМХ на сукцинате конкурентно ингибировалось малонатом, а также классическими ингибиторами дыхательной цепи – антимицином и азидом. Полученный результат по высокой сукцинат-оксидазной активности ПРМХ не согласуется с данными работы [19] о том,

Таблица 2. Дыхательная активность в митохондриальных фракциях из печени крысы

Фракция	Дыхание на сукцинате (мкМ O ₂ / мин/мг белка)	Дыхатель- ный контроль	Дыхание на NADH (мкМ O ₂ / мин/мг белка)
МХ	0,8	1,9	0,3
ПРМХ < 0,15	1,6	1,0	0,1
ПРМХ < 0,45	1,2	1,5	0,2
ПРМХ < 0,45 и 10 мМ малоната	0,1	–	–
ПРМХ < 0,45 и 5 мкМ антимицина	0,0	–	–
ПРМХ < 0,45 и 5 мкМ ротенона	–	–	0,0

Примечание. Концентрация во всех пробах ~ 1 мг белка в 1 мл.

Таблица 3. Влияние паранитротетразолия фиолетового на дыхание замороженных-размороженных МХ и ПРМХ (на экзогенных субстратах)

Органеллы	Скорость дыхания (мкМ O ₂ /мин) на 10 мМ сукцинате		Скорость дыхания (мкМ O ₂ /мин) на 0,2 мМ NADH	
	Без p-NTV	0,5 мМ p-NTV	Без p-NTV	0,5 мМ p-NTV
Митохондрии	23 ± 1	23 ± 1	28 ± 1	4 ±
Протомитохондрии	15 ± 1	13 ± 1	8 ± 1	2 ± 1

что мелкие МХ обладают низкой скоростью дыхания (слабой активностью цитохром-с-оксидазы), но согласуются в том, что они имеют меньший дыхательный контроль. Нужно заметить, что в цитированной статье было предположено, что мелкие митохондрии являются молодыми (данный факт был установлен А.Г. Беляковичем гораздо раньше [6]).

В ПРМХ наблюдается дыхание за счет окисления NADH, которое конкурентно подавляется избытком NAD. При этом использование NADPH вместо NADH не приводило к дыханию ПРМХ. Дыхание при окислении NADH блокируется классическим ингибитором первого пункта дыхательной цепи – ротеноном (табл. 2).

Скорость дыхания при окислении экзогенно добавленных субстратов (10 мМ сукцината или 0,2 мМ NADH) в случае поврежденных заморозкой-разморозкой МХ была выше, чем в случае ПРМХ.

Интересно, что p-NTV подавлял дыхание ПРМХ при окислении NADH в гораздо большей степени, чем в случае поврежденных (путем заморозки-разморозки) МХ (табл. 3). Ингибирующее влияние p-NTV на дыхание связано с тем, что часть электронов уходит на него вместо того, чтобы идти по дыхательной цепи на кислород. Дыхание замороженных-размороженных МХ на сукцинате вообще не подавлялось

этим соединением. В случае ПРМХ оно слегка уменьшалось. Возможно, большее влияние p-NTV на дыхание ПРМХ, чем МХ, связано с более высокой доступностью их активных центров.

Все вышесказанное означает, что мелкие зародышевые ПРМХ имеют высокоактивную дыхательную цепь. Однако на основании того, что ПРМХ содержат мало флавинов и цитохромов, можно предположить, что их цепь более простая: электроны от NADH-дегидрогеназы или сукцинат-дегидрогеназы идут через убинон сразу на цитохром-оксидазу.

На основании вышеизложенных фактов, подтверждающих полученные ранее данные [6–11] о существовании в клетках млекопитающих зародышевых и молодых ПРМХ и принципиальной общности их основных свойств со свойствами МХ, нами предлагается, что зародышевые ПРМХ могут возникать в клетке за счет МХ-ДНК, выходящей в цитоплазму при старении и деградации МХ (рис. 7). В процессе жизненного цикла происходит развитие ПРМХ во взрослые органеллы, их старение, образование больших старых МХ (постмитохондрий [6]) и последующий лизис этих органелл (с участием лизосом) и выходом МХ-ДНК в цитоплазму клетки. Можно предположить, что молодые ПРМХ могут образовываться из зародышевой МХ-ДНК, кооперируясь с функционированием ядерной ДНК.

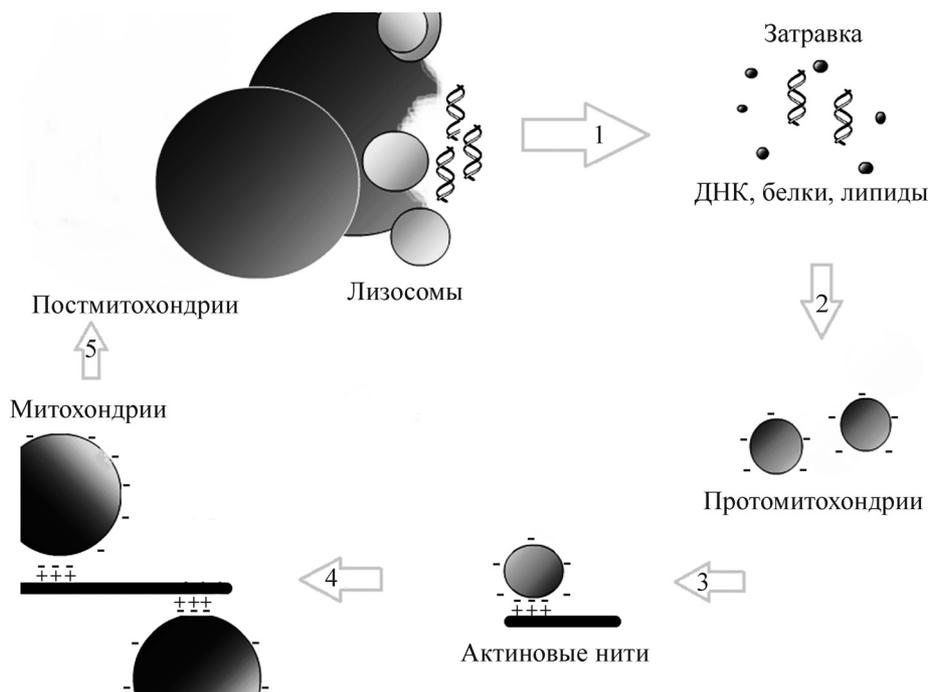


Рис. 7. Схема жизненного цикла митохондрий в специализированных клетках животных. 1 – Разрушение старых постмитохондрий лизосомами. Выход митохондриальной ДНК и белков в цитоплазму клетки, 2 – образование и рост протомитохондрий, 3 – взаимодействие протомитохондрий с актиновыми нитями, 4 – созревание протомитохондрий в митохондрии, 5 – старение митохондрий и образование постмитохондрий.

Исследования выполнены при финансовой поддержке фирмы BRL (Тайвань) и Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» на 2014 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. R. Friedman and J. Nunnari, *Nature* **505**, 335 (2014).
2. J. Bereiter-Hahn, *Int. Rev. Sci.* **30**, 99 (1995).
3. K. J. De Vos, *Curr. Biol.* **15**, 678 (2005).
4. N. C. Mishra and S. Kumar, *Indian J. Exp. Biol.* **43**, 25 (2005).
5. D. J. Granville and R. A. Gottlieb, *Scientific World J.* **2**, 1569 (2002).
6. А. Г. Белякович, *Изучение митохондрий и бактерий с помощью соли тетразолия n-НТФ* (Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1990).
7. Д. А. Шишмаков, Р. Л. Анисимов и Н. Л. Векшин, *Биол. мембраны* **21** (5), 389 (2004).
8. А. Н. Зинина и Н. Л. Векшин, *Биол. мембраны* **25** (6), 480 (2008).
9. Н. Л. Векшин, *Биол. мембраны* **27** (5), 424 (2010).
10. Н. Л. Векшин, *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров* (Пушино, Фотон-век, 2008).
11. K. A. Howell and A. H. Millar, *Whelan J. Plant Mol. Biol.* **60**, 201 (2006).
12. Н. Л. Векшин, *Биол. науки* **4**, 107 (1988).
13. H. C. Birnboim and J. Doly, *Nucl. Acids Res.* **24** (6), 1513 (1979).
14. U. K. Laemmli., *Nature* **227**, 680 (1970).
15. Л. А. Остерман, *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование* (Наука, М., 1981).
16. Е. А. Костерина, *Бюл. сибирской мед.* **12** (3), 5 (2013).
17. F. Forner, L. J. Foster, S. Campanaro, et al., *M. Mol. Cell. Proteomics* **5**, 608 (2006).
18. L. J. Foster, *Cell* **125**, 187 (2006).
19. A. Lanni, M. Moreno, A. Lombardi, and F. Goglia, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 337 (1996).

Protomitochondria of Liver Cells, Their Similarities and Differences between Mitochondria

E.A. Begunova and N.L. Vekshin

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

In this paper we continue the study of a number of properties of protomitochondria – small young mitochondrial organelles in the animal cells. Protomitochondria were obtained by filtration of total suspension of mitochondria of rat liver through Millipore filters. Protomitochondria contain an active respiratory chain as evidenced by the high rate of oxygen consumption during succinate and NADH oxidation. A shunt succinate:tetrazolium-reductase activity of protomitochondria was lower and NADH-tetrazolium-reductase activity was higher than that in mitochondria. Electrophoresis and gel filtration found no qualitative differences between protomitochondria, 0.25–0.45 μm in diameter, and mitochondria in major protein composition, but some quantitative differences in several bands were found. Perhaps, these differences reflect the process of intracellular maturation of protomitochondria to mitochondria. The data obtained are important for understanding the mitochondriogenesis in the animal cells.

Key words: mitochondria, protomitochondria, respiratory chain, mitochondrial biogenesis