

ОРГАНИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ В РАСТУЩИХ ГИФАХ *NEUROSPORA CRASSA*© Т. В. Потанова,<sup>1</sup> Л. Ю. Бойцова, С. А. Голышев, А. В. ПопинакоИнститут физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;<sup>1</sup> электронный адрес: potanova@genebee.msu.su

С помощью прижизненных флуоресцентных маркеров исследованы детали организации митохондрий при росте вегетативных гиф *Neurospora crassa* и изолированных верхушечных фрагментов гиф, в том числе в среде с дефицитом глюкозы. Показано, что митохондрии *N. crassa* формируют скопления нитевидных структур на передних концах (длиной приблизительно 30 мкм) растущих гиф и фрагментов независимо от источника углерода в среде. Эти скопления продвигаются вперед вместе с удлинением гифы и при раздвоении верхушки гифы распределяются между новыми верхушками, а при образовании новых боковых ветвей формируются заново, подобно тому как это описано для микротрубочек. При совместном окрашивании Mitotracker red и Mitotracker green выявлены признаки функциональной гетерогенности митохондрий на передних концах растущих гиф. Выдвинуто предположение о том, что описанные характеристики организации митохондрий в растущих гифах обусловлены взаимодействиями митохондрий с микротрубочками и в первую очередь обеспечивают функцию удлинения гифы. Рассмотрена возможность того, что организацией комплексов микротрубочек и митохондрий в процессе верхушечного роста управляют электрические градиенты на переднем конце гифы.

Ключевые слова: *Neurospora crassa*, верхушечный рост, движение митохондрии, дефицит глюкозы, межклеточные взаимодействия.

Принятые сокращения: ВР — верхушечный рост, L — длина фрагмента, MTG — Mitotracker green, MTR — Mitotracker red,  $V_m$  — мембранный потенциал,  $V_{удл}$  — скорость удлинения.

*Neurospora crassa* относится к классу сумчатых грибов (*Ascomycota*), объединяющих организмы с септированным мицелием, и является одним из популярных модельных организмов (Davis, 2000; Borkovich et al., 2004). Вегетативные гифы *N. crassa* растут на твердой поверхности в виде двумерных деревьев с постоянным отношением суммы длин всех ветвей к числу верхушек, которое называется «hyphal growth unit» (HGU) и составляет для *N. crassa* примерно 360 мкм (Trinci et al., 1994). Многоклеточная система растущей гифы действует как единый ансамбль, в котором согласованы скорость удлинения ( $V_{удл}$ ) и частота ветвлений, так что если по каким-то причинам уменьшается  $V_{удл}$ , одновременно закономерно снижается частота ветвлений. Фрагмент гифы, изолированный от материнского мицелия на расстоянии более 360 мкм от верхушки, продолжает расти и ветвиться (хотя и медленнее, чем интактная гифа) и формирует новое дерево с тем же значением HGU (Асланиди и др., 1996).

Между клетками гифы через каналы в межклеточных перегородках (септах) свободно перемещаются ионы, молекулы и органеллы. Гифа покрыта прочным хитиновым чехлом (клеточной стенкой), выдерживающим внутриклеточное давление ~18 атм. Новая клеточная стенка образуется только на растущих передних концах ветвей путем полимеризации поступающих сюда из отдаленных участков гифы предшественников синтеза хитина, с по-

мощью хитинсинтаз, также поступающих сюда издалека в неактивной форме. Поступление с высокой скоростью к растущим верхушкам необходимых материалов обеспечивают две силы — направленное осмотическое давление и организованный транспорт при участии элементов цитоскелета (Lew, 2011).

Ключевым процессом в функционировании мицелия является верхушечный рост (ВР) — процесс векторного удлинения, характерный для многих биологических объектов, таких как проростки зигот бурых водорослей, пыльцевые трубки, корневые волоски растений и грибные гифы. При ВР биосинтез хитина составляет ~50 % общей продукции биомассы. Предшественники хитина образуются у *N. crassa* из разных источников углерода, включая липиды, с помощью широкого набора ферментов (Davis, 2000; Borkovich et al., 2004). В лабораторных условиях мицелий *N. crassa*, как правило, выращивают на питательной среде, содержащей легкоусваиваемые источники углерода — сахарозу или глюкозу (2 мМ). Удаление из среды легкоусваиваемых источников углерода последовательно активирует участки генома, управляющие системами, необходимыми для выживания в новых условиях, — новыми транспортерами, ферментами, расщепляющими ранее накопленные запасы веществ, и т. д. (Davis, 2000). По оценкам активности 1335 генов *N. crassa* 19 % из них активируется примерно вдвое в условиях дефицита глюкозы (Xie et al., 2004).

Растущая гифа *N. crassa* продольно поляризована. Для верхушки гифы описаны градиенты: формы и толщины стенок (Collinge, Trinci, 1974), распределения везикул (Collinge, Trinci, 1974; Hickey et al., 2005), концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (Silverman-Gavrila, Lew, 2003) и  $\text{K}^+$  (Асланиди и др., 2000), величины внутриклеточного pH (Silverman-Gavrila, Lew, 2003), интенсивности дыхания (Lew, Levina, 2004) и активности генов (Teu et al., 2005). Верхушка гифы электрически деполяризована относительно дистальной части гифы (Slayman, Slayman, 1962; Potapova et al., 1988) и ее плазматические мембраны лишены  $\text{H}^+$ -АТФаз (Riquelme et al., 2005), что вызывает на переднем конце гифы продольные электрические токи (Potapova et al., 1988; Takeuchi et al., 1988) и создает электрическое поле напряженностью  $\sim 100$  В/м (Потапова и др., 2011; Potapova, 2012). Детально описано поведение при росте гифы системы микротрубочек (Steinberg, Schliwa, 1993; Mourino-Perez et al., 2006; Steinberg, 2007; Fisher et al., 2008; Riquelme et al., 2011).

На переднем конце гифы происходит множество событий, требующих расхода энергии: трансмембранный перенос ионов и молекул, экзоцитоз содержимого везикул и эндоцитоз, перестройки цитоскелета, синтез хитина и формирование клеточной стенки. Неудивительно, что различными методами в этой зоне обнаруживаются скопления митохондрий (Trinci et al., 1994; Lew, 1999; Davis, 2000; Levina, Lew, 2006; Потапова и др., 2011).

К настоящему времени пока не удается создать интегральную картину обеспечения процесса ВР на молекулярно-генетическом уровне (Riquelme et al., 2002; Steinberg, 2007; Fisher et al., 2008; Westermann, 2008; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011). Высокая скорость роста (25—30 мкм/мин) крайне затрудняет регистрацию молекулярно-генетических деталей этого процесса в динамике. Наименее понятными в ВР остаются механизмы управления морфологией и внутриклеточной локализацией митохондрий, а также роль первичных генераторов мембранного потенциала  $\text{H}^+$ -АТФаз и локальных электрических токов.

В настоящей работе мы исследовали организацию митохондрий в вегетативной гифе *N. crassa*. Основным инструментом был флуоресцентный маркер Mitotracker red (MTR), который входит в митохондрии с высоким мембранным потенциалом («высокоэнергизованные») и прочно связывается внутри, не вымываясь даже в процессе фиксации для электронной микроскопии (Haugland, 2002). Ранее мы показали (Потапова и др., 2011; Potapova 2012), что после 10-минутной обработки мицелия *N. crassa* 10 мкм MTR сигнал MTR в течение нескольких часов обнаруживается в митохондриях на передних концах растущих гиф.

Для ряда объектов на основании выявления разных популяций митохондрий при совместном использовании разных флуоресцентных маркеров были сделаны выводы о возможности функциональной гетерогенности митохондрий в составе одной и той же клетки (Chernyuk et al., 2006; Kuznetsov, Margreiter, 2009; Gerstenberger et al., 2012). Мы использовали в настоящей работе кроме MTR потенциалнезависимый флуоресцентный маркер митохондрий Mitotracker Green (MTG). Этот маркер свободно перемещается как между клеткой и средой, так и между митохондриями и цитоплазмой и флуоресцирует только внутри матрикса митохондрий (Haugland, 2002), что позволяет не удалять его из среды на время наблюдений.

## Материал и методика

Объект и его выращивание. Мицелий *N. crassa* (штамм R-2 из коллекции Т. А. Белозерской) высевали спорами на поверхность агаризованной среды Фогеля, обогащенной 2 мМ глюкозы, выращивали в течение 1 сут при 24 °С, а затем помещали на 2—3 сут в холодильник при 4 °С. Для опытов вырезали из этой запасной культуры небольшой агаровый блок и переносили мицелием вниз на такую же среду, покрытую целлофаном. Инкубацию мицелия и все операции проводили при 22—24 °С при освещении красным светом, чтобы избежать перевозбуждения мицелия синей частью светового спектра (Potapova et al., 1984).

Через 15—18 ч роста вырезали кусочки мицелия на целлофане с длиной гиф  $\sim 1.5$  см, тщательно промывали жидкой средой Фогеля, содержащей 2 мМ глюкозы, или 2 мМ сорбита, и переносили на поверхность целлофана в чашки Петри с соответствующей агаризованной средой. Через 2 ч адаптации гиф к средам с разными источниками углерода и выхода верхушек лидирующих гиф за край целлофана на расстояние  $> 2000$  мкм проводили контрольную фотосъемку для оценки  $V_{\text{удл}}$  лидирующих верхушек. Затем на поверхность гиф, вышедших за границу целлофана, наносили среду с глюкозой или сорбитом, содержащую 10 мкМ MTR (CMX Rose, M7512, Molecular Probes, США), и через 10 мин смывали соответствующей средой. В ряде экспериментов у гиф, окрашенных MTR, изолировали верхушечные фрагменты длиной 300—1000 мкм, как описано ранее (Потапова и др., 2011).

Для последующего микроскопирования агаровый блок с обработанными MTR гифами или с изолированными фрагментами вырезали и переносили в каплю среды с соответствующим источником углерода клетками вниз в камеру с дном из покровного стекла. В части опытов в эту среду добавляли 8—10 мкМ MTG (Molecular Probes, США).

Регистрация и анализ изображений. С помощью микроскопа Люмам-5 (ЛОМО, Россия), оборудованного согласованной с компьютером фотокамерой EOS 300D (Canon Inc., Китай), мы проводили фотосъемку в обычном свете передних концов гиф или изолированных фрагментов. По этим изображениям оценивали количественно характеристики ВР с помощью оригинальной компьютерной программы, описанной ранее (Потапова и др., 2008).

Сигналы MTR и MTG регистрировали с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), управляемого программным комплексом Axiovision 4.5 (Carl Zeiss MicroImaging, Германия) и оборудованного объективами Plan-Neofluar с увеличениями 10 $\times$  (NA 0.5) и 100 $\times$  (NA 1.3). Метка MTR обнаруживается в виде сигнала красного цвета (возбуждающий фильтр 546/12 нм, делительное зеркало 580 нм и запирающий фильтр 590 нм). Метка MTG обнаруживается в виде сигнала зеленого цвета (возбуждающий фильтр 470/40 нм, делительное зеркало 495 нм и запирающий фильтр 525/50 нм). Параллельно регистрировали фазово-контрастное изображение каждого поля зрения. Для регистрации изображений использовали цифровую камеру ORCA II ERG-2 (Hamamatsu Photonics, Япония). Масштаб результирующих изображений был 14.93 пикселя на 1 мкм. Анализ изображений проводили с помощью программы AxioVision LE.

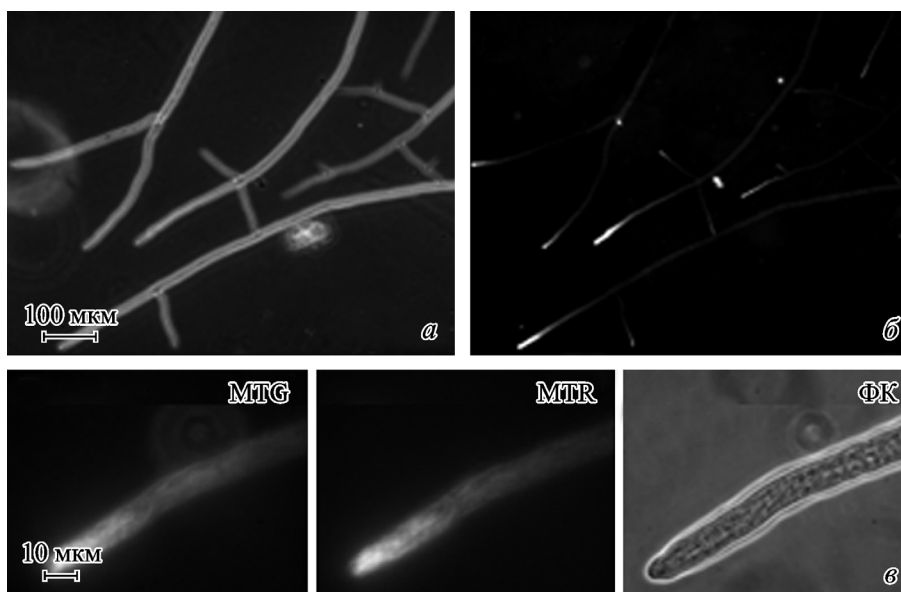


Рис. 1. Выявление митохондрий *Neurospora crassa* через 1.5 ч после обработки мицелия маркером митохондрий MTR. *a, б* — мицелий в фазовом контрасте и сигналы MTR соответственно (об. 100×); *ряд в* — верхушка нижней ветви участка, показанного на *a*; *слева направо*: сигналы MTG, сигналы MTR и в фазовом контрасте (ФК) соответственно (об. 100×).

Для оценки распределения интенсивности сигналов MTR и MTG вдоль передних концов гиф мы использовали программу ImageJ. С помощью этой программы для соответствующего маркера строили профиль его интенсивности вдоль линии с шириной, равной средней ширине гифы. Суммарные профили усредняли и нормировали ( $I_{\text{норм}}$ ) по формуле  $I_{\text{норм}} = (I_i - I_{\text{мин}}) \cdot K / (I_{\text{макс}} - I_{\text{мин}})$ , где  $I_i$  является оригинальным значением интенсивности сигнала маркера в данной точке,  $I_{\text{макс}}$  и  $I_{\text{мин}}$  — соответственно максимальное и минимальное значение интенсивности в заданном диапазоне,  $K = 100\%$ .

## Результаты

Скопление митохондрий в апикальной части растущей гифы. Митохондрии, окрашенные MTR, обнаруживаются в течение нескольких часов после удаления этого вещества из среды. Они выглядят как тонкие нити и скапливаются на передних концах растущих гиф. При двойном окрашивании (MTR и MTG) сигналы обоих маркеров также обнаруживаются в нитевидных митохондриях в апикальной зоне гифы (рис. 1).

Верхушечные скопления нитевидных митохондрий перемещаются вперед вместе с удлинением гифы. Если рост останавливается, сигналы митохондриальных маркеров или ослабевают, или обнаруживаются в виде диффузного свечения. Исчезновение митохондриальных нитей обычно сопровождалось вакуолизацией цитоплазмы наблюдаемого участка гифы (Потапова и др., 2011). Известно, что митохондриальные нити грибных гиф легко фрагментируются в стрессовых ситуациях (Камзолкина, Матросова, 2007). Предполагая, что фактором стресса может быть облучение, возбуждающее флуоресценцию маркеров, мы постарались минимизировать дозу облучения во время съемки. Особенно большие сложности при этом представляла регистрация сигналов MTG, квантовый выход флуоресценции которого ниже, чем у MTR, и, кроме того, флуоресценция MTG возбуждается си-

ним светом — физиологически активным фактором для *N. crassa* (Potapova et al., 1984). В отличие от MTG сигналы MTR можно было стабильно регистрировать в течение длительных периодов времени без заметных побочных эффектов, хотя при этом мы тоже старались избегать повторных засветок одного и того же поля зрения. С этой целью для наблюдений на Axiovert 200M в проходящем свете мы использовали красный фильтр, а оценку сиюминутных значений  $V_{\text{удл}}$  для каждой конкретной верхушки проводили по парным кадрам, зарегистрированным с интервалом 1 мин без возбуждения флуоресценции.

Поведение митохондрий при ветвлениях гифы. Верхушечный рост *N. crassa* обычно сопровождается ветвлениями: либо путем деления апикальной зоны, либо путем образования новых ветвей на некотором расстоянии от верхушки. При первом типе ветвления, как правило, сначала происходит торможение удлинения данной верхушки, а затем возникают две новые ветви, которые продолжают далее независимый рост (Harris, 2008). Боковое ветвление происходит на некотором расстоянии от лидирующей верхушки и никак не отражается на скорости ее удлинения.

Ранее мы наблюдали (Потапова и др., 2011), как при появлении новых ветвей путем раздвоения растущих верхушек апикальные скопления нитевидных митохондрий тоже раздваивались и распределялись между новыми ветвями, продолжая затем перемещаться вместе с ними по мере их удлинения.

В настоящей работе мы убедились, что в точке зарождения новой боковой ветви скопления нитевидных митохондрий сначала отсутствуют. По мере развития новой ветви происходит интенсивное движение в нее внутриклеточного содержимого, включая нитевидные митохондрии, из прилежащих апикальных и дистальных частей гифы. При этом отчетливые скопления нитевидных митохондрий, окрашенных как MTG, так и MTR, формируются на передних концах новых боковых ветвей только в течение нескольких минут. На рис. 2 видно, что образование новой боковой ветви на некотором расстоянии от

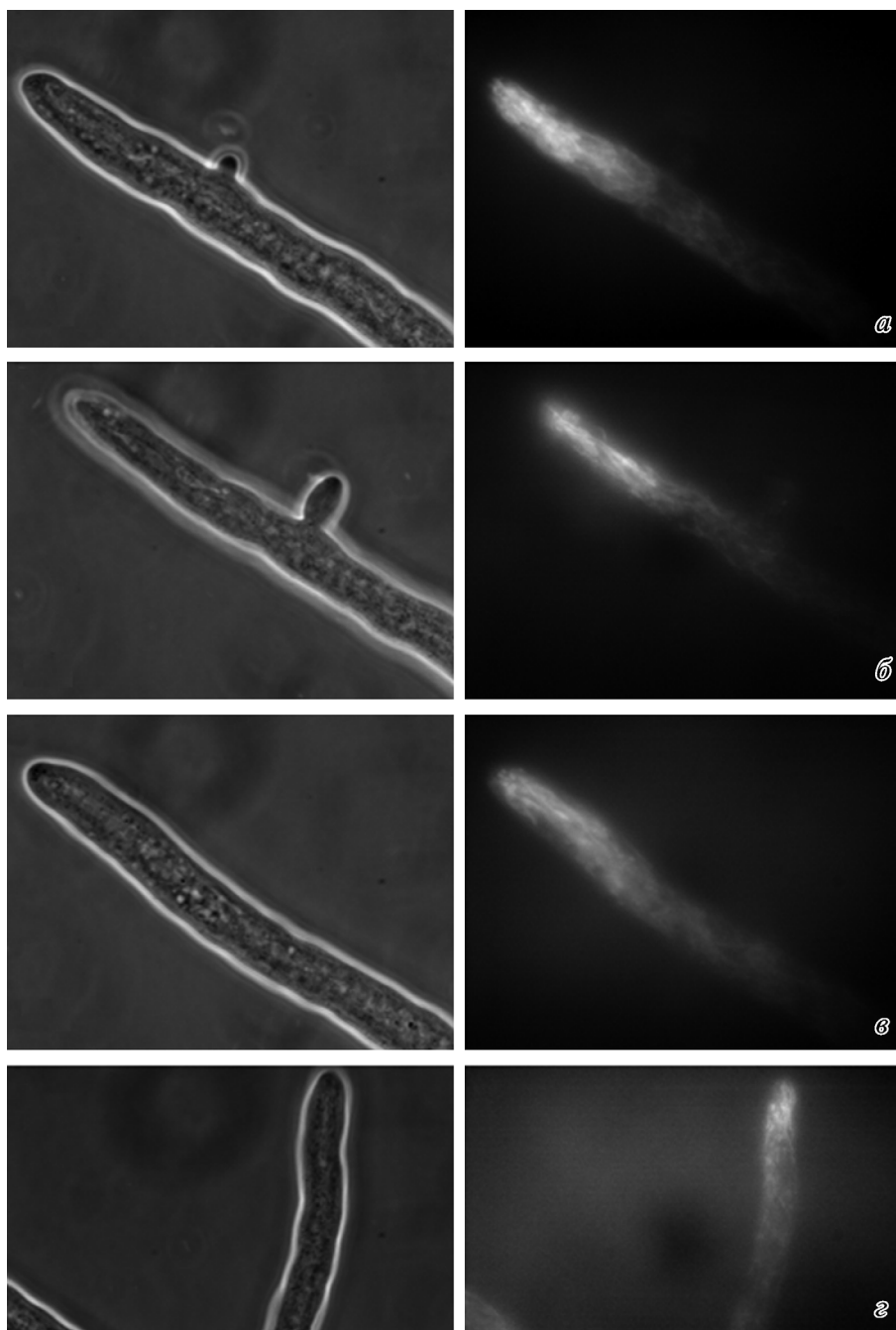


Рис. 2. Распределение митохондрий в процессе развития боковой ветви растущей гифы *Neurospora crassa*.

Ряд слева — изображения в фазовом контрасте; ряд справа — соответствующие им сигналы MTR; *a* — зарождение новой боковой ветви, *б* — этот же участок гифы через 60 с, *в* — лидирующая верхушка, *г* — верхушка новой ветви через 6 мин 30 с после начала ветвления (об. 100×).

верхушки гифы не останавливает удлинения этой верхушки и перемещения вместе с ней принадлежащего этой верхушке скопления нитевидных митохондрий.

Особенности поведения митохондрий при изоляции растущих верхушек от мицелия и дефиците глюкозы в среде. В этой серии экспериментов мы наблюдали одновременно за митохондриями, меченными MTR (высокоэнергизованными), и за суммарной популяцией митохондрий (метка MTG) на передних концах (длиной приблизительно 100 мкм) растущих гиф. Для каждой такой оценки определяли сиюминутное значение  $V_{удл}$ . После эксперимента с помощью

программы ImageJ для каждого маркера строили профиль его интенсивности вдоль переднего конца гифы.

У быстро растущих гиф, связанных с мицелием, большая часть нитевидных митохондрий, меченных как MTG, так и MTR, эффективно скапливается на переднем конце гифы как в среде с глюкозой (рис. 3, *a*), так и в среде с сорбитом (рис. 3, *б*). У гиф, медленно растущих в среде с глюкозой, эффективно скапливаются на переднем конце длиной 30 мкм только высокоэнергизованные митохондрии (метка MTR); большая же часть митохондрий, меченных MTG, остается за пределами этой зоны (рис. 3, *a*). При медленном росте гиф в среде с сорбитом за пре-



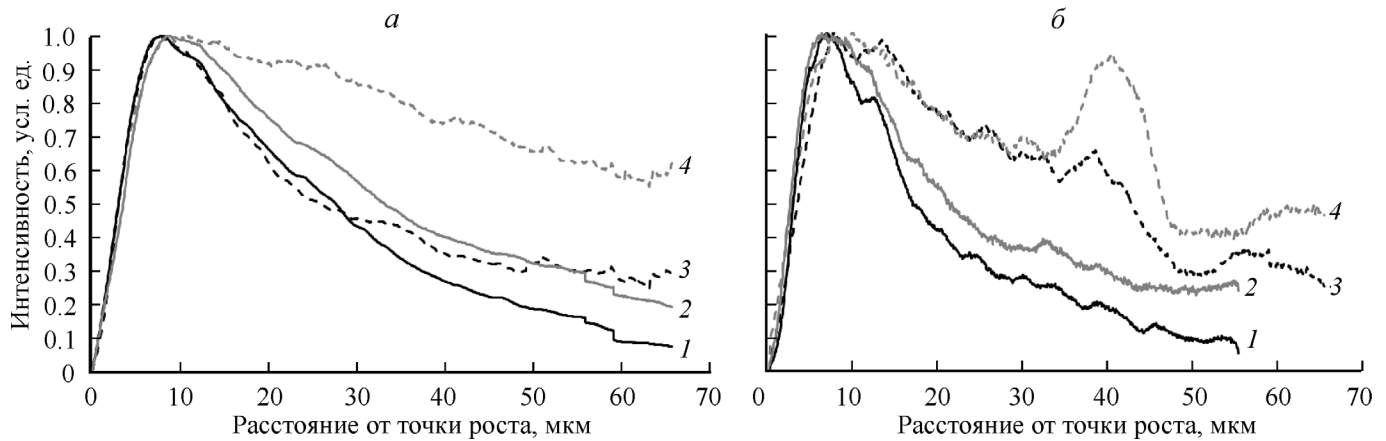


Рис. 3. Распределение усредненных нормализованных интенсивностей флуоресценции MTR (кривые 1, 3) и MTG (кривые 2, 4) вдоль передних концов гиф *Neurospora crassa*, растущих в среде с глюкозой (а) и сорбитом (б).

а:  $V_{удл} = 18 \pm 1$  мкм/мин (кривые 1, 2;  $n = 10$ ) и  $V_{удл} = 5.3 \pm 0.6$  мкм/мин (кривые 3, 4;  $n = 10$ ); б:  $V_{удл} = 15.1 \pm 3.8$  мкм/мин (кривые 1, 2;  $n = 17$ ) и  $V_{удл} = 6.7 \pm 1.8$  мкм/мин (кривые 3, 4;  $n = 13$ ).

делами переднего участка гифы длиной 30 мкм остается значительная часть обеих меток: и MTR, и MTG (рис. 3, б).

Ранее мы показали (Потапова и др., 2008), что дефицит глюкозы в среде в первые несколько часов не влияет на  $V_{удл}$  как гиф, связанных с мицелием, так и фрагментов, изолированных от мицелия, но замедляет ветвление фрагментов. В настоящей работе при исследовании ВР фрагментов, изолированных от мицелия, мы наблюдали в среде с недостатком глюкозы все ранее описанные нами морфологические признаки углеродного голодания: 1) нарушение углов боковых ветвлений, 2) тенденцию направленно стыковаться с любыми соседними ветвями вплоть до образования автоанастомозов, 3) снижение частоты боковых ветвлений. При этом, как и в наших предыдущих исследованиях,  $V_{удл}$  лидирующих верхушек фрагментов в среде с сорбитом не отличалась от этой характе-

ристики в среде с глюкозой, хотя, как это и полагается изолированным фрагментам (Асланиди и др., 1996),  $V_{удл}$  фрагментов была существенно ниже, чем у связанных с мицелием гиф.

Независимо от источника углерода в среде у верхушечных фрагментов, продолжающих рост после изоляции от мицелия, на передних концах растущих ветвей обнаруживаются скопления нитевидных митохондрий (рис. 4).

Всего мы исследовали в полноценной среде 65 верхушек от 31 фрагмента начальной длины от 400 до 1100 мкм ( $L_{0cp} = 753$  мкм). В среде с дефицитом глюкозы исследовали всего 86 верхушек от 62 фрагментов начальной длины от 400 до 1180 мкм ( $L_{0cp} = 742$  мкм). К сожалению, в этой серии экспериментов отсутствует точная привязка данных о распределении маркеров на переднем конце гифы к индивидуальной длине фрагмента.

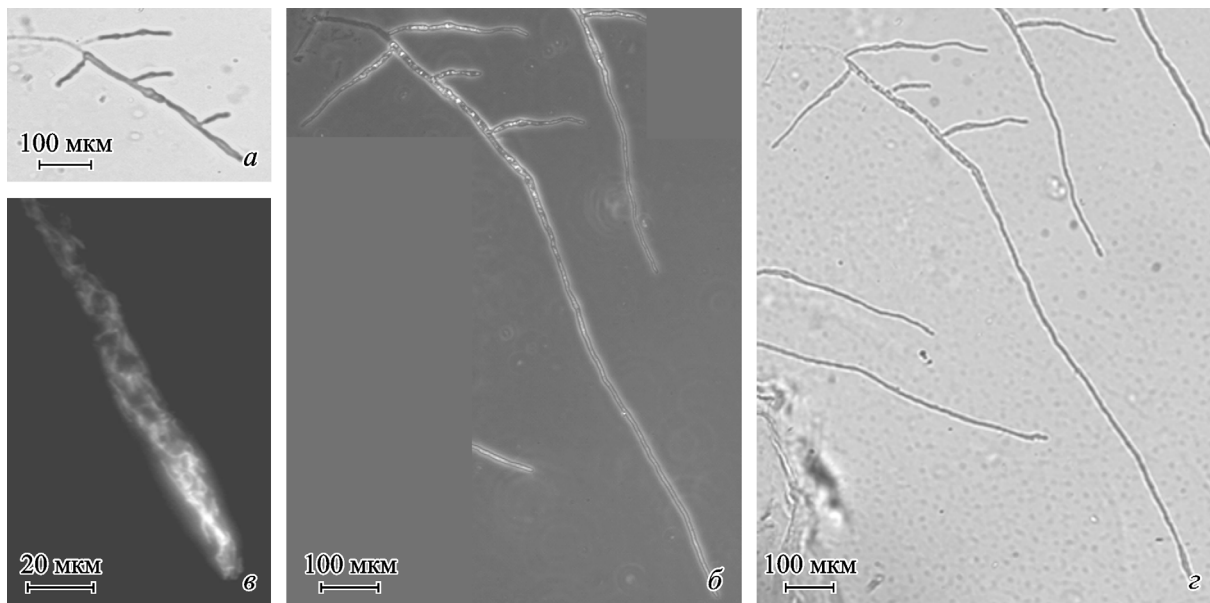


Рис. 4. Скопление митохондриальных нитей на верхушке растущего фрагмента.

а — фрагмент сразу после изоляции; б — через 110 мин после изоляции; в — сигнал MTR на верхушке фрагмента через 112 мин после его изоляции; г — фрагмент через 142 мин после изоляции.

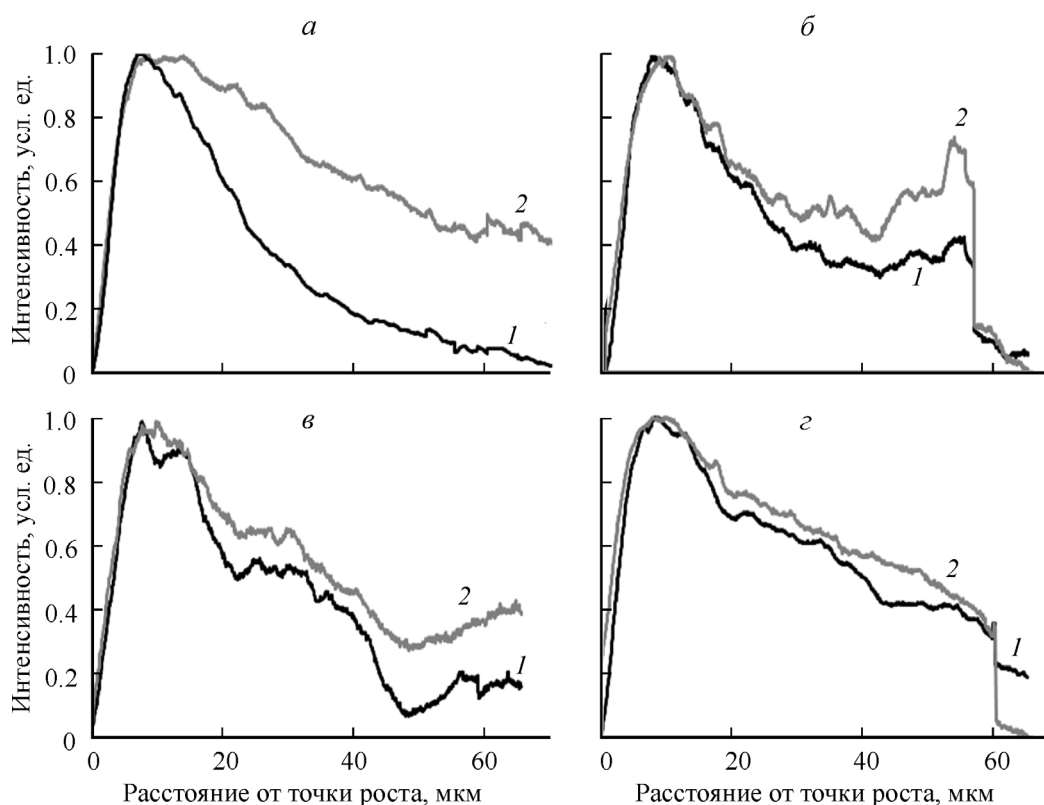


Рис. 5. Распределение усредненных нормализованных интенсивностей флуоресценции MTR (кривые 1) и MTG (кривые 2) вдоль передних концов ветвей гиф *Neurospora crassa*, растущих с одинаковой скоростью в разных условиях.

а — связанные с мицелием гифы в среде с глюкозой ( $V_{удл} = 5.14 \pm 1.1$  мкм/мин,  $n = 10$ ); б — изолированные от мицелия фрагменты в среде с глюкозой ( $V_{удл} = 5.1 \pm 0.9$  мкм/мин,  $n = 7$ ); в — связанные с мицелием гифы в среде с сорбитом ( $V_{удл} = 5.3 \pm 0.9$  мкм/мин,  $n = 9$ ); г — изолированные от мицелия фрагменты в среде с сорбитом ( $V_{удл} = 6.1 \pm 0.7$  мкм/мин,  $n = 20$ ).

На рис. 5 представлены данные о распределении MTG и MTR при одинаковых  $V_{удл}$  ( $\approx 5\text{--}6$  мкм/мин) у гиф, связанных с мицелием, и у изолированных от мицелия фрагментов в средах с разными источниками углерода. Видно, что митохондрии, меченные разными маркерами, при одинаковых  $V_{удл}$  ведут себя примерно одинаково независимо от связи с мицелием и источника углерода в среде (рис. 5, б—г). Исключение — медленный рост связанных с мицелием гиф в среде с глюкозой (рис. 5, а).

Эти данные, безусловно, говорят о функциональной гетерогенности митохондрий на переднем конце растущей гифы *N. crassa*, однако для анализа природы различий в распределении митохондрий, меченных MTR и MTG, при разных скоростях ВР необходимы дополнительные исследования.

### Обсуждение

Верхушка гифы *N. crassa* удлиняется со скоростью десятков микрометров в 1 мин, непрерывно образуя при этом на переднем конце новую плазматическую мембрану и клеточную стенку из материалов, поступающих к точке роста от более взрослых участков гифы. На молекулярно-генетическом уровне описано большое количество деталей этого процесса, которые пока не удается собрать в единую технологическую схему. По-видимому, такую сборку следует проводить уже на клеточном уровне. Обращает на себя внимание тот факт, что на переднем конце

растущей гифы *N. crassa* принципиально меняется поведение микротрубочек.

С помощью флуоресцирующего белка GFP показано, что микротрубочки *N. crassa* быстро разбираются и собираются вновь, а также двигаются с потоком цитоплазмы к растущей верхушке гифы через каналы в межклеточных септах и проникают в новые боковые ветви. При этом в стволовой части гифы все органеллы движутся вместе с потоком цитоплазмы, но на переднем участке длиной 100—150 мкм микротрубочки ориентируются строго параллельно оси гифы и двигаются вперед уже с помощью собственной векторной сборки (разборки), что снижает скорость их движения, но делает его более организованным (Mourino-Perez et al., 2006; Held et al., 2010; Riquelme et al., 2011). Молекулярно-генетические механизмы, управляющие такой самоорганизацией, пока далеки от понимания (Riquelme et al., 2011).

По оценкам в рамках математической модели (Sugden et al., 2007), количественно характеризующей работу микротрубочек по транспорту везикул к переднему концу гифы, упорядоченный ансамбль из  $\approx 10$  микротрубочек способен решать задачу доставки в зону роста с необходимой скоростью достаточного количества везикул с материалами, необходимыми для удлинения гифы. Очевидно, что упорядоченная сборка (разборка) микротрубочек и транспорт по ним везикул требуют значительного расхода энергии в виде АТФ. В этой связи понятно, зачем на передних концах растущих гиф собираются нитевидные митохондрии (рис. 1—5) и почему эффективность их скопления зависит от скорости удлинения гифы.

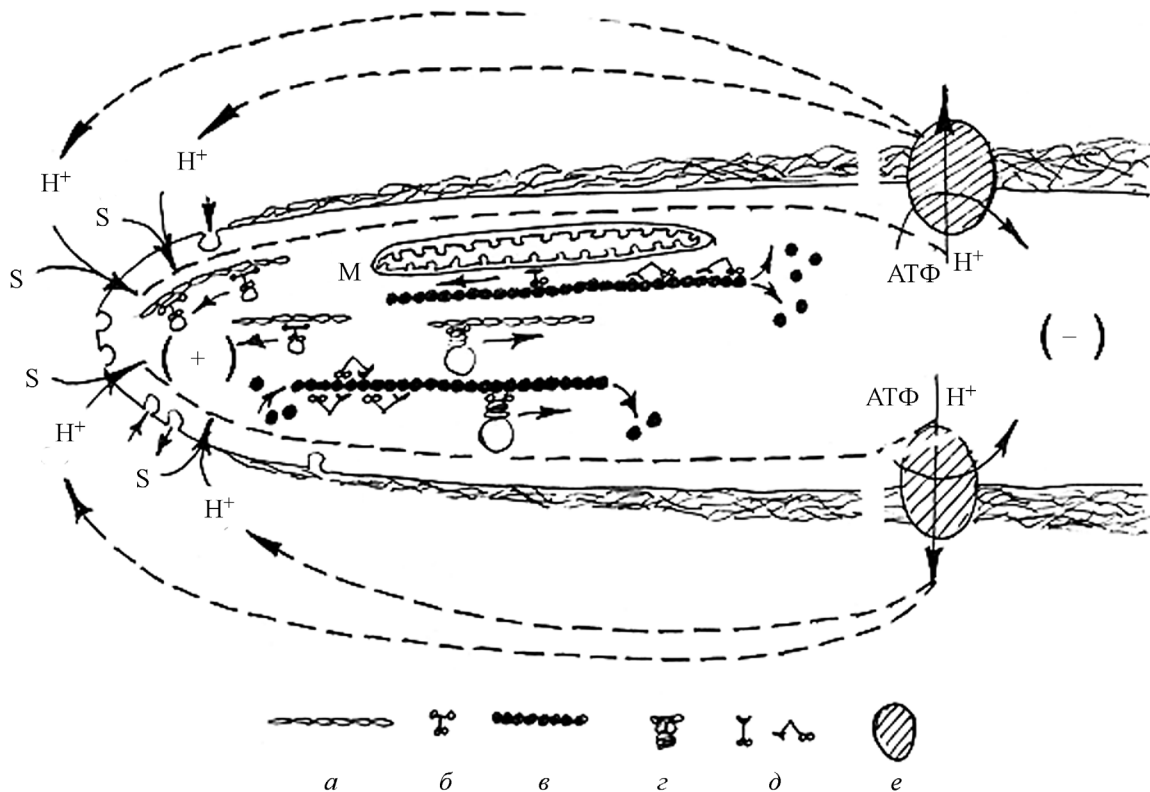


Рис. 6. Схема межклеточных и внутриклеточных взаимодействий на переднем конце растущей гифы *Neurospora crassa*. Стрелки указывают направления потоков ионов и молекул. а — актиновые микрофиламенты, б — миозины, в — микротрубочки, г — динеины, д — кинезины, е — АТФ-зависимые протонные насосы; М — митохондрии, S — субстраты.

Прямая связь поведения митохондрий с поведением микротрубочек, обнаруженная в настоящей работе, выглядит еще более отчетливо при анализе событий, связанных с ветвлениями. Известно, что верхушечные скопления микротрубочек при раздвоении верхушки также раздваиваются и распределяются между новыми ветвями, в то время как при боковом ветвлении микротрубочки сначала пассивно переносятся в новую ветвь током цитоплазмы и лишь постепенно формируют на переднем конце этой ветви упорядоченный ансамбль (Mourino-Perez et al., 2006; Held et al., 2010). Точно так же мы обнаружили, что раздваиваются при раздвоении верхушки находящиеся здесь скопления нитевидных митохондрий, распределяясь между верхушками новых ветвей (Потапова и др., 2011), в то время как при боковом ветвлении верхушечные скопления митохондрий формируются заново в течение нескольких минут по мере удлинения новой ветви (рис. 2).

У митохондрий *N. crassa* есть необходимый набор молекулярно-генетических деталей для взаимодействий с микротрубочками (Steinberg, Schliwa 1993; Prokisch et al., 2000; Fuchs et al., 2002; Borkovich et al., 2004; Fuchs, Westermann, 2005; Fischer et al., 2008; Westermann 2008; Kato et al., 2010; Wideman et al., 2012). Возможно, что нитевидная форма — один из признаков наличия такого взаимодействия, так как при остановке роста или на удалении более 100 мкм от точки роста мы не обнаруживаем скоплений нитевидных митохондрий. Возникает вопрос: чем и как регулируется образование упорядоченного ансамбля микротрубочек и митохондрий на переднем конце растущей гифы? Возможно, что какую-то роль в этом процессе играет электрическая гетерогенность переднего конца гифы.

По данным электрофизиологических измерений и теоретического модельного анализа (Potapova et al., 1988; Асланиди и др., 1996, 1997; Смолянинов, Потапова, 2003; Потапова, 2004), передние концы гиф длиной 200 мкм ведут себя как участки, лишённые генераторов мембранного потенциала ( $V_m$ ). У *N. crassa* основными генераторами  $V_m$  являются  $H^+$ -АТФазы плазматических мембран (Slayman, 1987), а методами молекулярной биологии недавно было показано, что плазматические мембраны верхушек вегетативных гиф *N. crassa* действительно лишены  $H^+$ -АТФаз (Riquelme et al., 2005).

Сравнительно высокие значения  $V_m$  на верхушках гиф при наличии электрической связи верхушек с дистальными частями гифы создаются генераторами  $V_m$  более взрослых клеток, расположенных на расстоянии 800—1000 мкм от растущего конца (Potapova et al., 1988). По нашим оценкам значений  $V_m$  гиф *N. crassa* на расстоянии приблизительно 100 мкм ( $L_1$ ) от переднего конца  $V_m$  равен приблизительно  $-130$  мВ ( $V_{m1}$ ), а на расстоянии 400 мкм ( $L_2$ ) — приблизительно  $-160$  мВ ( $V_{m2}$ ) (Potapova et al., 1988; Потапова 2004). Исходя из этих величин можно оценить напряженность электрического поля ( $E$ ) вдоль переднего конца гифы:  $E = (V_{m2} - V_{m1}) / (L_2 - L_1) = 30$  мВ / 300 мкм = 100 В/м.

По данным из литературы (Böhm et al., 2005; Dujovne et al., 2008), изолированные микротрубочки в растворе ориентируются и меняют скорость движения под влиянием электрического поля напряженностью  $2 \cdot 10^3$  В/м.

Сопоставив исследованную нами динамику поведения митохондрий в растущих верхушках гиф с известными молекулярно-генетическими деталями процессов, обеспечивающих ВР, мы приходим к выводу о том, что



частью управляющей системы, которая участвует в формировании на переднем конце гифы организованного ансамбля внутриклеточных органелл, могут быть электрические градиенты на этом участке (Потапова и др., 2011; Potapova, 2012).

В принципе растущая верхушка гифы *N. crassa* решает несколько задач — удлинение, ориентирование в пространстве, накопление вещества про запас и т. д., которые управляются разными генами (Brand, Gow, 2009). Похоже, что высокоорганизованный ансамбль микротрубочек и нитевидных митохондрий (рис. 6) обслуживает именно удлинение. Деятельность этого ансамбля, по-видимому, имеет приоритетное значение в иерархии внутриклеточных задач *N. crassa*, так как даже в условиях дефицита источника углерода и изоляции растущей гифы от мицелия он продолжает полноценно функционировать, обеспечивая высокую скорость удлинения гифы.

Авторы выражают искреннюю признательность А. Я. Дуниной-Барковской за продуктивное обсуждение результатов работы и Т. А. Белозерской за предоставленные штамма *N. crassa* и культуральных сред.

#### Список литературы

- Асланиди К. Б., Асланиди О. В., Вачадзе Д. М., Морнев О. А., Потапова Т. В., Чайлахян Л. М., Штемантия Е. Г. 1997. Математическая модель электрических явлений при поляризованном росте гифы *N. crassa*. Биофизика. 42 (4) : 941—951.
- Асланиди К. Б., Бойцова Л. Ю., Потапова Т. В., Смолянинов В. В. 1996. «Единица гифального роста» *Neurospora crassa* как экспериментальная модель для анализа концепции информационно-энергетического модуля. Биол. мембраны. 13 (1) : 29—39.
- Асланиди К. Б., Погорелов Ф. Г., Асланиди О. В., Морнев О. А., Потапова Т. В. 2000. Распределение содержания калия в гифе *Neurospora crassa*. Докл. РАН. 372 (2) : 253—256.
- Камзолкина О. В., Матросова Е. В. 2007. Митохондрии грибов. В кн.: Микология сегодня. М.: Национальная академия микологии. 55—74.
- Потапова Т. В. 2004. Межклеточные взаимодействия в гифах *Neurospora crassa* — двадцать лет спустя. Биол. мембраны. 21 (3) : 163—191.
- Потапова Т. В., Алексеевский Т. А., Бойцова Л. Ю. 2008. Верхушечный рост *Neurospora crassa* при дефиците глюкозы. Биол. мембраны. 25 (3) : 171—177.
- Потапова Т. В., Бойцова Л. Ю., Гольшев С. А. 2011. К вопросу об организации взаимодействий внутриклеточных структур *N. crassa* при верхушечном росте. Докл. РАН 436 (6) : 834—838.
- Смолянинов В. В., Потапова Т. В. 2003. Оценка критической длины фрагмента гифы *Neurospora crassa*. Биол. мембраны. 20 (4) : 304—312.
- Böhm K. J., Nikolaos E. Mavromatos N. E., Michette A., Stracke R., Unger E. 2005. Movement and alignment of microtubules in electric fields and electric-dipole-moment estimates. Electromag. Biol. Med. 24 : 319—330.
- Borkovich K. A., Alex L. A., Yarden O., Freitag M., Turner G. E., Read N. D., Seiler S., Bell-Pedersen D., Paietta J., Plesofsky N., Plamann M., Goodrich-Tanrikula M., Schulte U., Mannhaupt G., Nargang F. E., Radford A., Selitrennikoff C., Galagan J. E., Dunlap J. C., Loros J. J., Catchside D., Inoue H., Aramayo R., Polymanis M., Selker E. U., Sachs M. S., Marzluf G. A., Paulsen I., Davis R., Ebbole D. J., Zelter A., Kalkman E. R., O'Rourke R., Bowring F., Yeaton J., Ishii C., Suzuki K., Sakai W., Pratt R. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68 : 1—108.
- Brand A., Gow N. A. R. 2009. Mechanisms of hypha orientati-on of fungi. Curr. Opin. Microbiol. 12 : 350—357.
- Chernyak B. V., Izyumov D. S., Lyamzaev K. G., Pashkovskaya A. A., Pletjushkina O. Y., Antonenko Y. N., Sakharov D. V., Wirtz K. W. A., Skulachev V. P. 2006. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. Biochim. biophys. acta. 1757 : 525—534.
- Collinge A. J., Trinci A. P. J. 1974. Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. Arch. Microbiol. 99 : 353—368.
- Davis R. H. 2000. *Neurospora*: contributions of a model organism. Oxford: Oxford Univ. Press. 498 p.
- Dujovne I., van den Heuvel M., Shen Y., de Graaff M., Dekker C. 2008. Velocity modulation of microtubules in electric fields. Nano Lett. 8 : 4217—4220.
- Fischer R., Zekert N., Takeshita N. 2008. Polarized growth in fungi — interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. Mol. Microbiol. 68 : 813—826.
- Fuchs F., Prokisch H., Neupert W., Westermann B. 2002. Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. J. Cell Sci. 115 : 1931—1937.
- Fuchs F., Westermann B. 2005. Role of *Unc104/KIF1*-related motor proteins in mitochondrial transport in *Neurospora crassa*. Mol. Biol. Cell. 16 : 153—161.
- Gerstenberger J. P., Occhipinti P., Gladfelter A. S. 2012. Heterogeneity in mitochondrial morphology and membrane potential is independent of the nuclear division cycle in multinucleate fungal cells. Eukaryot. Cell Mar. 11 : 353—367.
- Harris S. D. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. Mycologia. 100 : 823—832.
- Haugland R. P. 2002. Handbook of fluorescent probes. 9th ed. Eugene, Oregon: Molecular Probes Inc. 800 p.
- Held M., Edwards C., Nicolau D. V. 2010. Temporal and spatial *in vivo* optical analysis of microtubules in *Neurospora crassa*. In: Imaging, manipulation, and analysis of biomolecules, cells, and tissues. VIII. San Francisco: SPIE. pp 75680V.
- Hickey P. C., Swift S. R., Roca M. G., Read N. D. 2005. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. Meth. Microbiol. 34 : 63—87.
- Kato F., Kurashima K., Chae M., Sawada S., Hatakeyama S., Tanaka S., Inoue H. 2010. Deletion of a novel F-Box protein, MUS-10, in *Neurospora crassa* leads to altered mitochondrial morphology, instability of mtDNA and senescence. Genetics. 185 : 1257—1269. Doi: 10.1534/genetics.110.117200.
- Kuznetsov A. V., Margreiter R. 2009. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. Int. J. Mol. Sci. 10 : 1911—1929.
- Levina N. N., Lew R. R. 2006. The role of tip-localized mitochondria in hyphal growth. Fungal Genet. Biol. 43 : 65—74.
- Lew R. R. 1999. Comparative analysis of Ca and H flux magnitude and location along growing hyphae of *Saprolegnia ferax* and *Neurospora crassa*. Eur. J. Cell Biol. 87 : 892—902.
- Lew R. R. 2011. How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. Nature Rev. Microbiol. 9 : 509—518.
- Lew R. R., Levina N. N. 2004. Oxygen flux magnitude and location along growing hyphae of *Neurospora crassa*. FEMS Microbiol. Lett. 233 : 125—130.
- Mourino-Perez R. R., Robertson R. W., Bartnicki-Garcia S. 2006. Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 43 : 389—400.
- Potapova T. V. 2012. Cell-to-cell communication in the tip growth of mycelial fungi. In: Biocommunication of Fungi. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 103—114.
- Potapova T. V., Aslanidi K. B., Belozerskaya T. A., Levina N. N. 1988. Transcellular ionic currents studied by intracellular potential recordings in *Neurospora crassa* hyphae. (Transfer of energy from proximal to apical cells.) FEBS Lett. 241 : 173—176.
- Potapova T. V., Levina N. N., Belozerskaya T. A. 1984. Investigation of electrophysiological responses of *Neurospora crassa* to blue light. Arch. Microbiol. 137 : 262—265.



- Prokisch H., Neupert W., Westermann B. 2000. Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 2961—2971.
- Riquelme M., Freitag M., Leon-Hing E. S., Bowman B. 2005. Live imaging of the secretory pathway in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 52 (Suppl.) : 53.
- Riquelme M., Robetson R. W., McDaniel D. P., Bartnicki-Garcia S. 2002. The effect of *ropy-1* mutation on cytoplasmic organization and intracellular motility in mature hyphae of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 37 : 171—179.
- Riquelme M., Yarden O., Bartnicki-Garcia S., Bowman B., Castro-Longoria E., Free S. J., Fleibner A., Freitag M., Lew R., Mourino-Perez R., Plamann M., Rasmussen C., Richthammer C., Roberson R. W., Sanchez-Leon E., Seiler S., Watters M. K. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha — a model cell for polarized growth. *Fungal Biol.* 115 : 446—474. Doi:10.1016/j.funbio.2011.02.008.
- Silverman-Gavrila L. B., Lew R. R. 2003. Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. *Microbiology.* 149 : 2475—2485.
- Slayman C. L. 1987. The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: a proton-pumping electroenzyme. *J. Bioenerget. Biomemb.* 19 : 1—20.
- Slayman C. L., Slayman C. W. 1962. Measurements of membrane potential in *Neurospora*. *Science.* 136 : 876—877.
- Steinberg G. 2007. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and Spitzenkörper. *Eukar. Cell.* 6 : 351—360.
- Steinberg G., Schliwa M. 1993. Organelle movements in the wild type and wall-less *fz;sg;os-1* mutants of *Neurospora crassa* are mediated by cytoplasmic microtubules. *J. Cell Sci.* 106 : 555—564.
- Sugden K. E. P., Evans M. R., Poon W. C. K., Read N. D. 2007. Model of hyphal tip growth involving microtubule-based transport. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin Soft Matter Phys.* 75 : 031909.
- Takeuchi Y., Schmid J., Caldwell J. H., Harold F. M. 1988. Transcellular ion currents and extension of *Neurospora crassa* hyphae. *J. Membr. Biol.* 101 : 33—41.
- Tey W. K., North A. J., Reyes J. L., Lu Y. F., Jedd G. 2005. Polarized gene expression determines Woronin body formation at the leading edge of the fungal colony. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 2651—2659.
- Trinci A. P. J., Wiebe M. G., Robson G. D. 1994. The mycelium as an integrated entity. In: *The Mycota I. Growth, differentiation and sexuality.* Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 175—193.
- Westermann B. 2008. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J. Biol. Chem.* 283 : 13 501—13 505.
- Wideman J. G., Go N. E., Klein A., Redmond E., Lackey S. W. K., Tao T., Kalbacher H., Rapaport D., Neupert W., Nargang F. E. 2012. Roles of the Mdm1, Tom7, Mdm12, and Mmm1 proteins in the assembly of mitochondrial outer membrane proteins in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.* 21 : 1725—1736. Doi: 10.1091/mbc.E09-10-084. PMID: PMC2869378.
- Xie X., Wilkinson H. H., Correa A., Lewis Z. A., Bell-Pedersen D., Ebbole D. J. 2004. Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 41 : 1104—1119.

Поступила 22 VII 2013

#### ORGANIZATION OF MITOCHONDRIA IN THE GROWING HYPHAE OF *NEUROSPORA CRASSA*

T. V. Potapova,<sup>1</sup> L. Yu. Boitzova, S. A. Golyshov, A. V. Popinako

A. N. Belozersky Scientific Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow Lomonosov State University;

<sup>1</sup> e-mail: potapova@genebee.msu.su

In vivo fluorescent labeling of mitochondria in *Neurospora crassa* showed the concentration of filamentous mitochondria within 30  $\mu\text{m}$  of apex in growing hyphae. These mitochondrial assemblies propagated forward with the elongation of hyphae, split and segregated as the growing tip bifurcated and formed *de novo* when new branches formed farther away from the apex. The efficiency of the mitochondria concentration in the apical 30  $\mu\text{m}$  zone is related to the growth rate and identical in hyphae cultivated in glucose- and sorbitol-containing media. The obtained data are discussed in connection with the behavior of microtubules in growing hyphae as well as with the electric heterogeneity of *N. crassa* hyphal apex described previously.

**Key words:** *Neurospora crassa*, tip growth, movement of mitochondria, glucose deficiency, intercellular interactions.