

**Обнаружение липидных и белковых упорядоченных структур в митохондриях сердца в условиях формирования функционального суперкомплекса методом малоуглового рассеяния нейтронов**

И.М. Бывшев<sup>1</sup>, И.М. Вангели<sup>2</sup>, Т.Н. Муругова<sup>1,3</sup>, О.О. Иваньков<sup>1,3</sup>, А.И. Куклин<sup>1,3</sup>,  
Д.Б. Джумашев<sup>2</sup>, Л.С. Ягужинский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

<sup>2</sup>НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского

<sup>3</sup>Объединенный институт ядерных исследований

В настоящее время общепринята модель, согласно которой белки системы окислительного фосфорилирования функционируют в форме суперкомплекса [1]. Следует отметить, что не только белки, но и липиды принимают участие в стабилизации суперкомплексов [2]. Также известно, что липиды могут образовывать так называемые рафты в митохондриях [3]. В настоящей работе уточнены условия, при которых митохондрии функционируют в форме суперкомплекса, и затем в этих условиях была изучена ультраструктура митохондрий. Обнаружено образование белковых и липидных упорядоченных структур методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН).

Известно, что тоничность среды инкубации митохондрий влияет на функциональное (параметр АДФ/О) [4] и структурное состояние митохондрий [5]. Можно выделить 3 основных тоничности – изотония (стандартные условия), гипотония (близкое к разрыву внешней мембраны состояние) и гипертония (матрикс сильно сжат, но функция митохондрий еще остается). Следует отметить, что в течение 1-2 часов практически все свежевыделенные митохондрии, инкубируемые в изотонической среде, функционально переходят в гипотоническое состояние [6].

В настоящей работе были исследованы митохондрии сердца. Методом двойного ингибиторного анализа было обнаружено, что митохондрии сердца функционируют в режиме работы суперкомплекса в широком диапазоне тоничностей (120, 300 и 600 мОсм - см. Рис.1а, Рис.1б и Рис.1в соответственно), в отличие от митохондрий печени, в которых в гипертонических условиях система синтеза АТФ и дыхательная система функционируют как диссоциированная полиферментная система [4].

Установление особенностей работы митохондрий сердца позволили провести изучение ультраструктуры мембран в условиях работы суперкомплекса. Исследования проводились методами электронной микроскопии (ЭМ) и МУРН. Важно отметить, что в экспериментах по МУРН опыты проводились на живых, то есть сохраняющих свою фосфорилирующую активность, митохондриях (Рис.2).

Метод вариации контраста в экспериментах по МУРН позволяет регистрировать по отдельности липидную и белковую компоненту [7]. Были проведены три серии опытов (в изотонических и гипотонических средах соответственно) – в 100% D<sub>2</sub>O, Рис.3а и Рис.3б (регистрация белково-липидной компоненты), 42% D<sub>2</sub>O, Рис.4а и Рис.4б (регистрация липидной компоненты) и в 12% D<sub>2</sub>O, Рис.5а и Рис.5б (регистрация белковой компоненты).

В 100% D<sub>2</sub>O были обнаружены пики, соответствующие структурным параметрам 226Å (изотония) и 246Å (гипотония). Впервые удалось методом МУРН зарегистрировать, что в митохондриях сердца наблюдается образование липидных структурных кластеров - в 42% D<sub>2</sub>O были обнаружены пики, соответствующие структурным параметрам 216Å (изотония) и 228Å (гипотония). В 12% D<sub>2</sub>O пик был обнаружен только в изотонии и соответствует 94Å.

Результаты ЭМ показали влияние тоничности среды инкубации фосфорилирующей системы на ультраструктуру митохондрий. При инкубации в изотонических средах наблюдается ламеллярная структура – плотный матрикс и большие межмембранные пространства (Рис.6). При переходе в гипотонию наблюдается как ламеллярная, так и трубчатая структура крист митохондрий (Рис.7).

Таким образом, в настоящей работе проведено исследование ультраструктуры митохондрий сердца в условиях формирования функционального суперкомплекса. Обнаружено, что внешнее осмотическое давление влияет на ультраструктуру митохондрий. Методом МУРН показано образование липидных и белковых кластеров во внутренней мембране митохондрий, найдены структурные параметры. Методом ЭМ обнаружено, что и в гипотонической и в изотонической среде образуется ламеллярная ультраструктура, но только в гипотонической среде существуют трубчатые структуры.

#### Литература

1. Natalya V. Dudkina [et al.] Structure and function of mitochondrial supercomplexes. - Biochimica et Biophysica Acta. – 2010. - №1797. – с. 664-670
2. Eugenia Mileykovskaya, William Dowhan Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. - Chemistry and Physics of Lipids. – 2013

3. *Maurizio Sorice [et al.]* Cardiolipin-enriched raft-like microdomains are essential activating platforms for apoptotic signals on mitochondria. - FEBS Letters. – 2009. – 583. – с. 2447–2450
4. *Inna P. Krasinskaya [et al.]* Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria. - FEBS Letters. – 1984. – Т. 167. - №1. – с. 176-180
5. *Bethe A. Scalettar, James R. Abney, Charles R. Hackenbrock* Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. – 1991. – Cell Biology. – Т. 88. - С. 8057-8061
6. *Yaguzhinsky L.S., Vyshenskaya T.V., Tychinsky V.P., Kretushev A.V* Identification of two discrete states of energized mitochondria: Experiments on single mitochondria. – 2008. - Biochemistry (Moscow) Supplement. – T2(2). – с. 144-149
7. *Zaccai, G.. B: Fanchon, E., Geissler, E., Hodeau, J.L., Regnard, J.R., Timmins, P.A.,* Small-angle Neutron Scattering. Structure and Dynamics of Biomolecules: Neutron and Synchrotron Radiation for Condensed Matter Studies. Oxford University Press, Oxford. – 2000

#### Подписи к рисункам

Рис.1

Эксперименты по двойному ингибиторному анализу митохондрий сердца малонатом и карбоксиатрактилазидом (КАТР). А-гипотония (120мОсм), Б-изотония (300мОсм), В-гипертония (600мОсм). Черные круги — фосфорилирующее дыхание частично подвалено ингибитором АТФ-синтеза кластера - КАТР. Белые круги — контроль без КАТР. Большая часть фосфорилирующей системы находится в форме суперкомплекса.

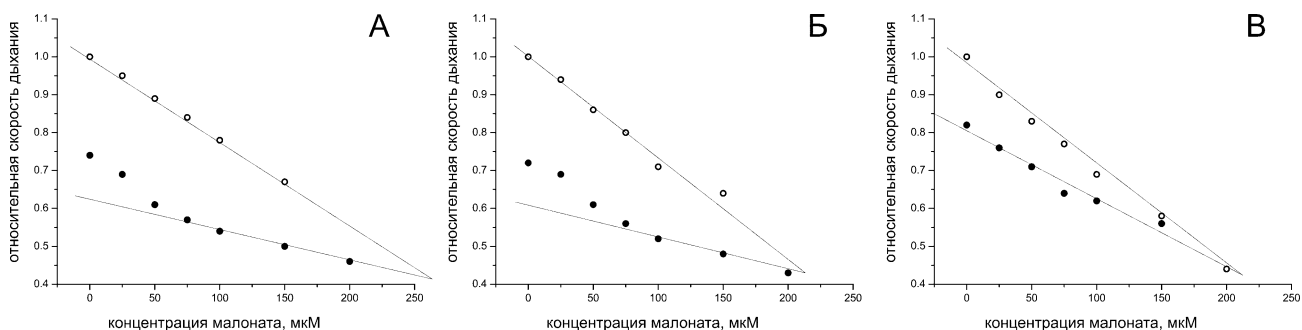


Рис.2

Полярнографические кривые митохондрий до (А) и после (Б) экспериментов по МУРН. При добавлении фосфата (после ротенона, АДФ и сукцината) в обоих случаях происходит ускорение дыхания, что свидетельствует о работе системы окислительного фосфорилирования.

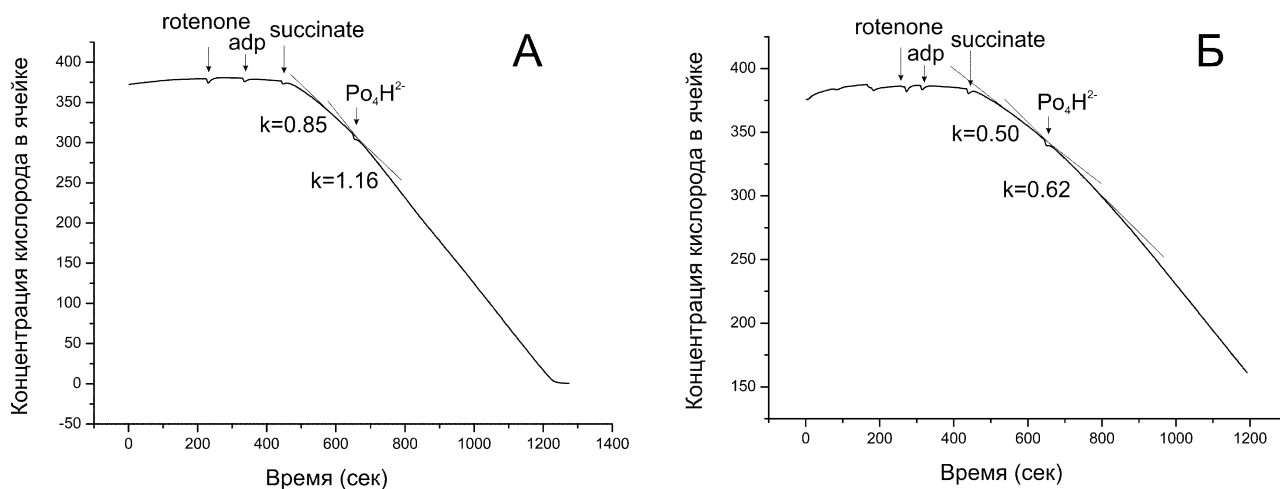


Рис.3

Кривые МУРН митохондрий, помещенных в среду, приготовленную на 100%  $D_2O$  (по оси абсцисс интенсивность  $I$ ,  $cm^{-1}$ , по оси ординат вектор рассеяния  $q$ ,  $\text{\AA}^{-1}$ ). А – изотоническая среда (300мОсм), Б – гипотоническая среда (120мОсм). В обоих случаях видны пики на кривой рассеяния.

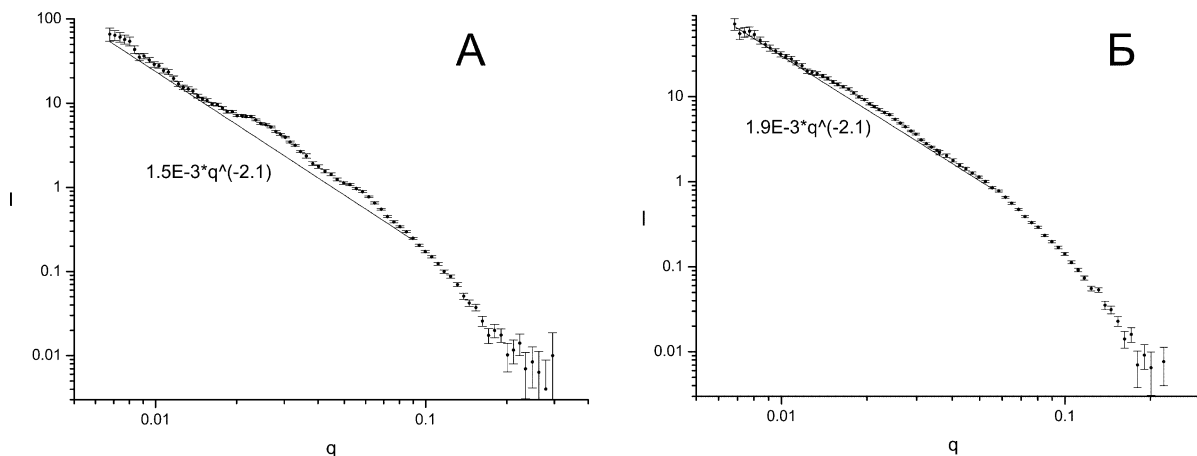


Рис.4

Кривые МУРН митохондрий, помещенных в среду, приготовленную на 42%  $D_2O$  (по оси абсцисс интенсивность  $I$ ,  $cm^{-1}$ , по оси ординат вектор рассеяния  $q$ ,  $\text{\AA}^{-1}$ ). А – изотоническая среда (300мОсм), Б – гипотоническая среда (120мОсм). В обоих случаях видны пики на кривой рассеяния.

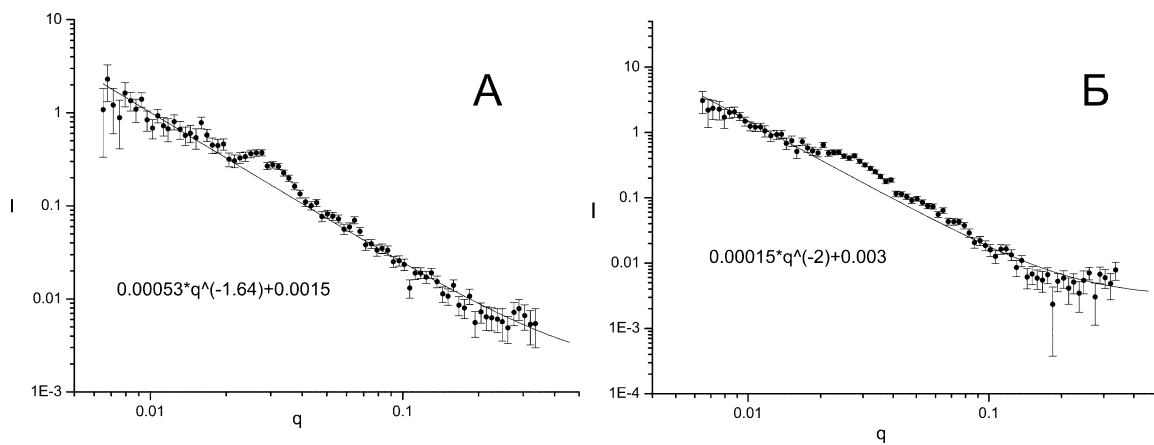


Рис.5

Кривые МУРН митохондрий, помещенных в среду, приготовленную на 12% D<sub>2</sub>O (по оси абсцисс интенсивность  $I$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , по оси ординат вектор рассеяния  $q$ ,  $\text{\AA}^{-1}$ ). А – изотоническая среда (300мОсм), Б – гипотоническая среда (120мОсм). Пик виден только в изотонии в области больших  $q$ .

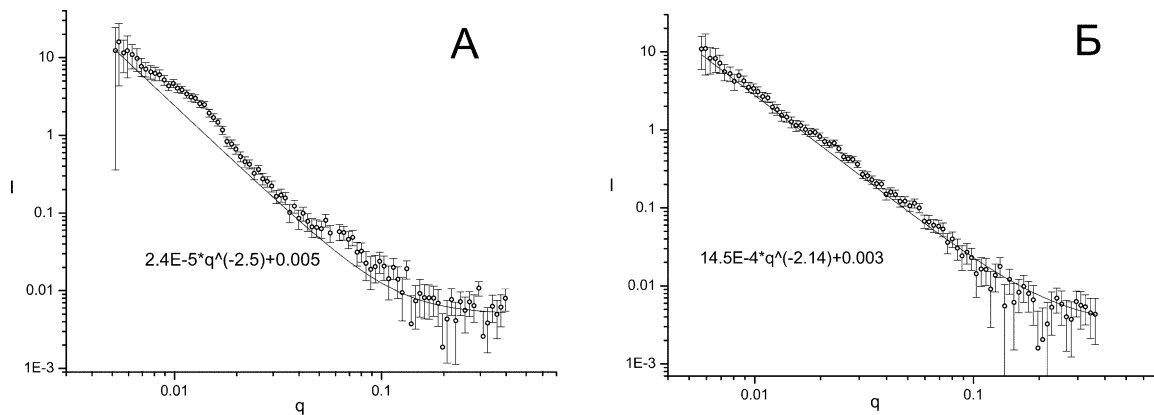


Рис.6

Электронная микроскопия митохондрий в изотонических условиях (300мОсм). Наблюдается ламеллярная структура.

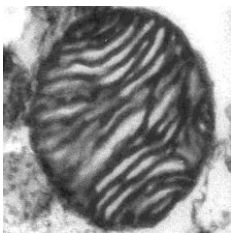


Рис.7

Электронная микроскопия митохондрий в гипотонических условиях (120мОсм). Наблюдается как ламеллярная, так и трубчатая структура.

