

На правах рукописи

МУРУГОВА
Татьяна Николаевна

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВО ВНУТРЕННЕЙ
МЕМБРАНЕ МИТОХОНДРИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ
СИСТЕМОЙ ОБЪЕМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Специальность: 03.00.02 — биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино 2009

Работа выполнена в отделе биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ягужинский Лев Сергеевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Зигченко Валерий Петрович

доктор химических наук
Чупин Владимир Викторович

Ведущая организация: **Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН**

Защита диссертации состоится « 2 » декабря 2009 г. в 15 часов 30 минут на заседании совета Д 002.093.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН по адресу: 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ИЦБИ РАН по адресу: 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат физ.-мат. наук



Ланина Надежда Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В бактериях и клетках животных и растений существует специфическая система регуляции метаболизма, в основе которой лежит эффект изменения объема цитоплазмы клетки (система объемной регуляции). Клеточный объем регулируется осмолярностью среды и системами ионного транспорта, локализованными в бактериальных и клеточных мембранах. Система объемной регуляции, по-видимому, используется для того, чтобы управлять метаболизмом клетки при изменении внешних условий, в частности, при изменении содержания солей в окружающей среде. В работах Э. Халестрапа (Halestrap, 1989) и нашей лаборатории (Красинская и др., 1989; Yaguzhinsky et al., 2006) было показано, что система объемной регуляции присутствует в митохондриях. В частности было показано, что при увеличении объема митохондриального матрикса происходит стимуляция синтеза АТФ, β -окисления жирных кислот, увеличение скорости дыхания и степени фосфорилирования некоторых митохондриальных белков. В условиях наших экспериментов функционирование системы объемной регуляции индуцировалось путем изменения тоничности среды инкубации. Ранее было обнаружено, что при снижении тоничности среды инкубации система окислительного фосфорилирования митохондрий резко меняет свои кинетические параметры (Krasinskaya et al., 1984; Yaguzhinsky et al., 2006): ее функционирование соответствует модели локального сопряжения, предложенного Вильямсом. Согласно этой модели дыхательные протонные помпы и АТФ-синтаза работают как единый мембранный суперкомплекс (см. Рис. 1Б). В условиях нормальной тоничности реализуется общепринятый в настоящее время механизм Митчелла, в котором ферменты дыхательной цепи и АТФ-синтаза функционируют независимо друг от друга (см. Рис. 1А). Таким образом, оказалось, что система окислительного фосфорилирования способна функционировать в двух качественно различных состояниях, переход между которыми контролируется системой объемной регуляции.

В настоящее время появляется значительное количество работ, посвященных выделению и описанию свойств суперкомплексов дыхательной цепи (Boekema and Braun, 2007) и олигомеризации комплексов АТФ-синтаз (Allen, 1995; Buzhynskyy

et al., 2007). Увеличивается число работ, посвященных описанию свойств специальной группы белков, контролирующих ультраструктуру митохондрий. Однако связь между системой объемной регуляции и изменением структуры мембран митохондрий остается не исследованной. В этой связи представлялось важным исследовать структурные изменения, которые могут происходить в мембранах митохондрий под действием системы объемной регуляции. Для решения этой задачи был использован метод малоуглового рассеяния нейтронов, который позволил нам регистрировать структурные переходы в мембранах митохондрий без предварительной фиксации материала, которая может приводить к изменениям формы и размеров исследуемого объекта.

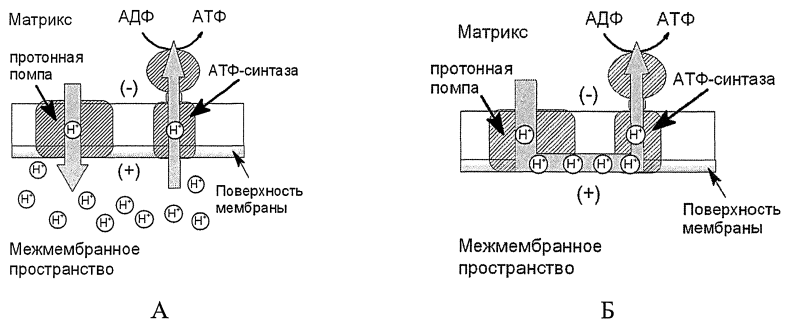


Рис. 1. Две модели сопряжения дыхания и фосфорилирования в митохондриях. А – модель Митчелла (Mitchell, 1961), согласно которой сопряжение происходит через электрохимический потенциал; при этом протоны выходят в водную фазу. Б – модель локального сопряжения (современная интерпретация модели Вильямса (Williams, 1961)), согласно которой ферменты дыхательной цепи и АТФ-синтаза функционируют как единый суперкомплекс; протоны при этом передаются на АТФ-синтазу в составе этого мембранного суперкомплекса, не выходя в водную фазу.

Цель работы. В настоящей работе поставлены две цели. Во-первых, показать возможность применения метода малоуглового рассеяния нейтронов для изучения строения мембран функционирующих (“живых”) митохондрий. Во-вторых, использовать метод малоуглового рассеяния нейтронов для регистрации перестроек ультраструктуры мембран митохондрий, индуцированных системой объемной регуляции (возникающих при низкоамплитудном набухании митохондрий).

Конкретные задачи исследования:

1) показать возможности применения метода малоуглового рассеяния нейтронов для изучения ультраструктуры функционирующих митохондрий;

2) показать влияние системы объемной регуляции на строение крист митохондрий. Исследовать фазовые переходы во внутренней митохондриальной мембране в условиях работы этой системы;

3) определить геометрические параметры крист митохондрий. Сравнить полученные результаты с данными электронной и атомно-силовой микроскопии;

4) сопоставить изменения в ультраструктуре митохондрий печени и сердца;

5) показать, что результаты малоуглового рассеяния нейтронов получены на митохондриях, сохраняющих дыхательную функцию и функцию генерации потенциала. Провести проверку функциональной активности митохондрий после эксперимента по малоугловому рассеянию нейтронов;

6) провести измерения толщины внутренней мембраны митохондрий на модели субмитохондриальных частиц с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Получить основные структурные характеристики этой мембраны (толщину, объемные доли липида и белка, распределение липида и белка по толщине мембраны).

Научная новизна. В работе показано, что митохондрии могут существовать в двух структурных состояниях, переход между которыми регулируется системой объемной регуляции. В условиях наших экспериментов он регулируется тоничностью среды инкубации. Показано, что при переходе к гипотоническим средам инкубации в митохондриях печени происходит формирование упорядоченных двумембранных структур из складок внутренней мембраны.

Впервые были показаны возможности применения метода малоуглового рассеяния нейтронов для изучения структуры внутренней мембраны функционирующих митохондрий. На модели субмитохондриальных частиц была определена толщина внутренней митохондриальной мембраны. Без предварительной фиксации или заморозки образцов на функционирующих митохондриях показано существование "окон" липидного бислоя во внутренней митохондриальной мембране.

Практическая ценность работы. В работе на примере митохондрий показаны возможности применения метода малоуглового рассеяния нейтронов для определения параметров структуры функционирующих мембранных биологических систем. Существование исследованных в работе двух структурных (и функциональных) состояний митохондрий открывает новые возможности поиска митотропных физиологически активных препаратов, избирательно

взаимодействующих с двумембранными ламеллярными структурами, которые могут возникать *in vivo* при набухании митохондрий, часто наблюдаемом при определенных заболеваниях и при стрессовых воздействиях.

Апробация работы. Основные положения данной работы и ее основные результаты докладывались на XIII научной конференции молодых ученых и специалистов "ОМУС-2009" (Дубна, 16 - 21 февраля 2009), международном совещании "29-th meeting of Programme Advisory Committee for Condensed Matter Physics" (Дубна, 26-27 января 2009), Роснанофоруме (Москва, 3-5 декабря 2008), XLII Зимней школе ПИЯФ (Репино, 25 февраля-1 марта 2008), Первой всероссийской школе-семинаре "Современные достижения бионаноскопии" (Москва, 11-17 июня 2007), VI Национальной конференции по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов (Москва, 12-17 ноября 2007), международной школе "Higher European research course for users of large experimental systems" (Гренобль, 25 февраля – 31 марта 2007), международной школе-семинаре "2nd-Seminar-School Romania-IJNR" (Бая-Маре, 11-15 сентября 2007), международном совещании "International Small-Angle Scattering Workshop is devoted to Yu. M. Ostanevich" (Дубна, 5-8 October 2006), XIX совещании по применению нейтронного рассеяния в изучении твердого тела (Обнинск, 11-15 сентября 2006), международной конференции "14-th European Bioenergetic Conference", (Москва, 22-27 июля 2006), международном совещании "PAC for Condensed Matter Physics", (Дубна, 3-4 апреля 2006), X научной конференции молодых ученых и специалистов (Дубна, 9 – 11 февраля 2006), рабочем совещании "IV Workshop on investigations at the IBR-2 pulsed reactor" (Дубна, 15 -18 июня 2005), международной конференции "Russian bioenergetics: from molecules to the cell", (Москва, 21 – 23 февраля 2005), европейской школе "3rd Central European Training School on Neutron Scattering and COST Training School on Neutron Optics" (Будапешт, 18-23 апреля 2005), VIII научной конференции молодых ученых и специалистов (Дубна, 2 – 6 февраля 2004), совещании пользователей реактора ИБР-2 в рамках программы Германия-ОИЯИ (Дубна, 12 – 16 июнь 2004), международных практических курсах "EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules" (Гамбург, 29 октября - 5 ноября 2004),

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, включая 4 журнальных публикации.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 131 страницу машинописного текста, включая 51 рисунок, 11 таблиц и 236 библиографических ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** показана актуальность исследуемой темы, обозначены основные проблемы, решаемые в данной области, сформулированы цели и задачи, а также кратко описана структура диссертации.

Первая глава посвящена обзору литературных данных. Обзор содержит основные сведения о структурном полиморфизме митохондрий и связи структуры внутренней митохондриальной мембраны с энергетическим состоянием митохондрий и действием различных внешних факторов (оксидативный стресс, гипотоническая среда, апоптоз, химический стресс). Приведены примеры формирования в митохондриях упорядоченных мембранных структур таких, как спиральные кристы, гексагональная и кубическая фазы. Описано влияние системы объемной регуляции митохондрий на их метаболизм, и описаны основные сигнальные пути в митохондриях, связанные с объемной регуляцией. Описаны особенности методики проведения экспериментов по исследованию структуры митохондрий методами нейтронного и рентгеновского рассеяния, и приведены результаты немногочисленных работ, связанных с изучением структуры митохондриальной мембраны методами рентгеновского рассеяния.

Во второй главе описана методика выделения митохондрий и приготовления образцов митохондрий и субмитохондриальных частиц для экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов, митохондрий для электронной микроскопии и митопластов для атомно-силовой микроскопии. Рассмотрены теоретические и экспериментальные основы метода малоуглового рассеяния. Схема малоуглового эксперимента приведена на Рис. 2. Пучок нейтронов формируется коллимационной системой и падает на образец. Рассеянные на образце под углом 2θ нейтроны регистрируются детектором. Результатом обработки сигнала от детектора является зависимость дифференциального сечения рассеяния образца (интенсивности $I(q)$) от вектора рассеяния q . Значение вектора рассеяния зависит угла рассеяния 2θ и длины волны λ рассеянного нейтрона следующим образом:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta. \quad (1)$$

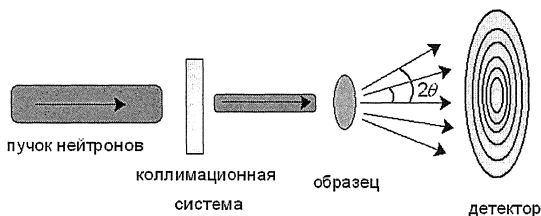


Рис. 2. Схема эксперимента по малоугловому рассеянию нейтронов.

Если в исследуемом объекте присутствует упорядоченность, то в кривых рассеяния появляются интерференционные пики. Условие появления этих пиков аналогично условию Вульфа-Брэгга, выведенному для дифракции волн на кристаллической решетке (Рис. 3):

$$2d \sin \theta = n\lambda, \quad (2)$$

где d – расстояние между плоскостями решетки, θ – угол скольжения (на схеме малоуглового эксперимента 2θ – угол рассеяния), λ – длина волны нейтрона, n – порядок отражения. Если подставить в уравнение (2) выражение (1) для используемого в наших экспериментах вектора рассеяния q , то получим следующее условие появления интерференционных пиков в кривых рассеяния:

$$q_m = \frac{2\pi n}{d}, \quad (3)$$

где q_m – значение вектора рассеяния, при котором интенсивность интерференционного пика имеет максимум.

Третья глава посвящена исследованию с помощью малоуглового рассеяния нейтронов структурных изменений во внутренней мембране митохондрий печени и сердца крысы, происходящих при переходе от изотонических сред инкубации к гипотоническим.

Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов на митохондриях печени крысы. Формирование двумембранных упорядоченных структур. Ранее работах Э. Халестрапа (Halestrap, 1989) и нашей лаборатории (Красинская и др.,

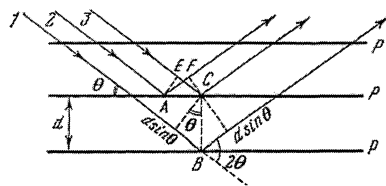


Рис. 3. Геометрическая иллюстрация дифракции, демонстрирующая вывод уравнения Вульфа-Брегга. Разность фаз лучей 1 и 3, отраженных плоскостями P, равна $2d \sin \theta$. Совпадающие по фазе лучи будут давать максимум интенсивности под углом θ при условии, выраженном уравнением (1).

1989; Yaguzhinsky et al., 2006) была описана система объемной регуляции, присутствующая в митохондриях. Функционирование этой системы основано на эффекте изменения объема митохондриального матрикса. В наших опытах это достигалось путем варьирования осмолярности среды инкубации митохондрий. Ранее было обнаружено, что при снижении тоничности среды инкубации до 120-150 мОсм ферменты дыхательной цепи и АТФ-синтетаза функционируют как единая ферментная система (Krasinskaya et al., 1984; Yaguzhinsky et al., 2006). В этих условиях с помощью электронной микроскопии в митохондриях печени наблюдалось образование сильно сжатых крист (Красинская и др., 1989).

В настоящей работе были проведены исследования влияния описанных выше условий на ультраструктуру митохондрий с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов. Митохондрии помещались в изотоническую (300 мОсм) и гипотоническую (120 мОсм) среды инкубации. При этом использовалась тяжелая вода (D_2O) с целью повышения контраста между средой и исследуемым объектом. Кривые малоуглового рассеяния нейтронов представлены на Рис. 4. Видно, что в случае изотонической среды интенсивность рассеяния нейтронов на митохондриях монотонно убывает с ростом значения вектора рассеяния q (Рис. 4А). В случае гипотонической среды кривая рассеяния имеет широкий интерференционный пик. Качественное различие в кривых рассеяния говорит об изменениях в ультраструктуре митохондрий, которые происходят при понижении тоничности

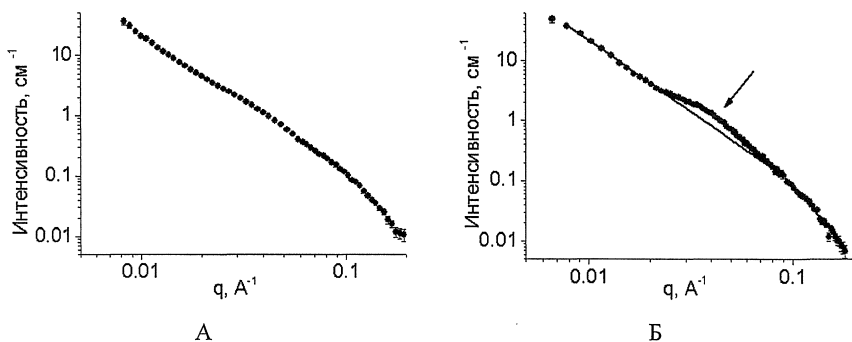


Рис. 4. Кривые малоуглового рассеяния нейтронов для митохондрий печени крысы, помещенных в изотоническую (300 мОсм) (А) и гипотоническую (120 мОсм) (Б) D_2O – среды. На рисунке Б сплошной линией представлена фоновая монотонно убывающая функция; стрелкой указано положение интерференционного пика.

среды инкубации. Появление интерференционного пика в кривой рассеяния указывает на формирование в митохондриях под действием гипотонических условий упорядоченных структур. Анализ экспериментальных кривых рассеяния показал, что сжатые кристы, формирующиеся в гипотонических условиях, представляют собой упорядоченные двумембранные структуры с фиксированным расстоянием между мембранами. Расстояние

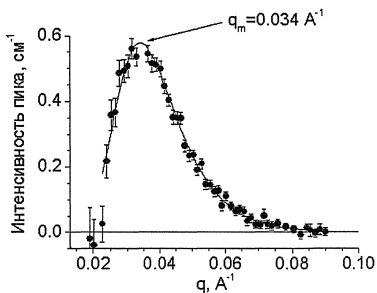


Рис. 5. Пик, выделенный из кривой рассеяния нейтронов, представленной на Рис. 4Б.

между центрами мембран в этой структуре было определено из положения максимума интерференционного пика. Из экспериментальной кривой рассеяния интерференционный пик выделялся путем вычитания монотонно убывающей степенной функции из общей интенсивности рассеяния. Выделенный пик представлен на Рис. 5. Из положения максимума пика q_m было получено значение расстояния d между центрами мембран, формирующих кристу, согласно соотношению: $d = 2\pi / q_m$. Среднее значение позиции максимума q_m пика, полученное из ряда экспериментов, составляет $(0.034 \pm 0.002) \text{ \AA}^{-1}$. Это соответствует значению расстояния d между центрами мембран, равному $(190 \pm 10) \text{ \AA}$ (Рис. 7).

С помощью метода вариации контраста было показано участие липидного бислоя в формировании упорядоченной двумембранной структуры. Митохондриальные мембраны сформированы из двух основных составляющих – белков и липидов. Методом вариации контраста нами были получены кривые рассеяния отдельно для каждой из этих компонент. Контраст является разностью между плотностями рассеяния буфера и помещенного в него объекта, т.е. между митохондрией и средой, в которую она помещена. Контраст регулировался соотношением легкой и тяжелой воды в среде. Митохондрии помещались в среды, содержащие 42% D_2O (для "затенения" белков) и 100% H_2O (для "затенения" липидов). Некоторые из полученных кривых рассеяния приведены на Рис. 6.

В кривой рассеяния для липидной компоненты (Рис. 6А) присутствует интерференционный пик. Также в области малых значений векторов рассеяния q наблюдается рост интенсивности, что указывает на формирование молекулами липидов бислоев. Кривые рассеяния для белковой компоненты интерференционных

пиков не имеют (Рис. 6Б) как в случае изотонической среды, так и в случае гипотонической среды. Поведение этих кривых рассеяния описывается степенной функцией, что может указывать на фрактальную организацию белков. Таким образом, в экспериментах по малоуглового рассеянию нейтронов нам удалось наблюдать наличие липидного бислоя во внутренней митохондриальной мембране. Наличие пика в кривых рассеяния для липидной компоненты указывает *на участие липидного бислоя в формировании упорядоченной двумембранной структуры*: липидные бислои в близко расположенных мембранах этой структуры находятся на фиксированном расстоянии друг от друга.

Из положения максимума пика нами было определено расстояние между центрами этих липидных бислоев. Оно составило $(170 \pm 5) \text{ \AA}$. В случае рассеяния нейтронов на митохондриях, помещенных в D_2O -среду, рассеяние происходит на всей липидно-белковой мембране. Как описано выше расстояние между центрами липидно-белковых мембран составляет $(190 \pm 10) \text{ \AA}$. Различие в расстояниях между центрами липидных бислоев и центрами липидно-белковых мембран говорит об асимметричности внутренней мембраны – белки с одной стороны мембраны выступают из бислоя дальше, чем белки с другой стороны этой же мембраны. Из анализа данных малоуглового рассеяния смещение ΔT центров тяжести липидно-белковой мембраны относительно центра тяжести липидного бислоя составляет

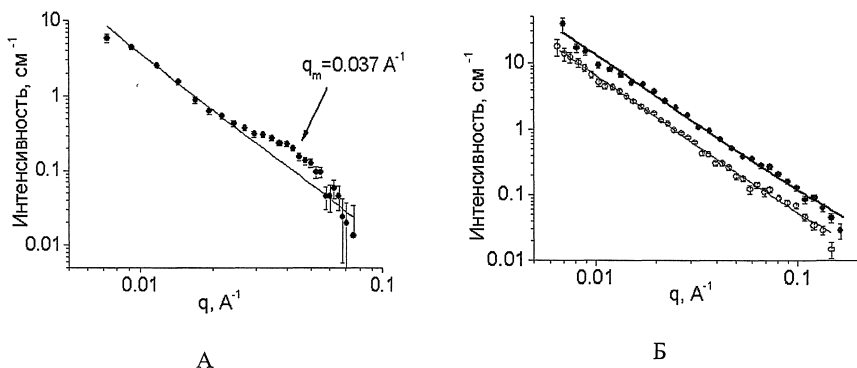


Рис. 6. Кривые малоуглового рассеяния нейтронов на митохондриях печени крысы. А – среда основана на 42% D_2O (рассеяние на липидах); стрелкой указано положение интерференционного пика. Б – среда основана на H_2O (рассеяние на белках); пустые кружки – изотоническая среда, закрашенные кружки – гипотоническая среда; кривые смещены относительно друг друга для наглядности.

$(10 \pm 5) \text{ \AA}$. При этом основная масса белка смещена в сторону матрикса.

Толщина двумембранной упорядоченной структуры. Из экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов на митохондриях печени мы оценили расстояние d между центрами мембран, формирующих под действием гипотонических условий кристу в виде двумембранной упорядоченной структуры. Оно составило, как отмечалось, $(190 \pm 10) \text{ \AA}$. Зная толщину одиночной внутренней мембраны T_{BM} , можно оценить толщину T_{KP} всей кристы митохондрии. Для оценки толщины внутренней митохондриальной мембраны нами были проведены эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов на субмитохондриальных частицах (этой работе посвящена глава 4). Полученное значение толщины составило $(53.4 \pm 0.7) \text{ \AA}$. Тогда толщина кристы T_{KP} составляет $d + T_{BM} = (240 \pm 10) \text{ \AA}$, а зазор L между мембранами, формирующими ее ($d - T_{BM}$), равен $(140 \pm 10) \text{ \AA}$. Схема строения кристы митохондрий в гипотонических условиях приведена на Рис. 7. Из литературных данных по электронной микроскопии среднее значение толщины внутренней митохондриальной мембраны составляет $50\text{--}75 \text{ \AA}$. Возьмем верхнее значение этой толщины. Тогда толщина кристы будет составлять $(265 \pm 10) \text{ \AA}$, а зазор между мембранами $(115 \pm 10) \text{ \AA}$.

В пределах ошибок эти значения совпадают с полученными выше значениями.

В изотонических условиях внутренняя мембрана не формирует упорядоченных структур, поскольку в кривой рассеяния интерференционный пик отсутствует. Анализ полученных нами кривых малоуглового рассеяния не дает

возможности получить информацию о структуре крист митохондрий в изотонических условиях. Представление о форме крист в этих условиях дает электронная микроскопия (Рис. 8А). На фотографии межмембранное (внутрикристное) пространство представляет собой расширенные светлые участки. Расстояние между мембранами, формирующими кристы, нерегулярное.

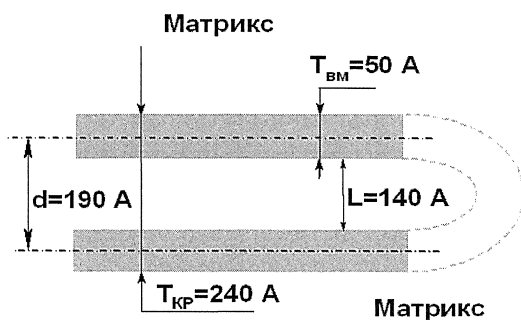


Рис. 7. Схема строения двумембранной упорядоченной структуры, сформированной из кристы митохондрий печени, помещенных в гипотоническую среду.

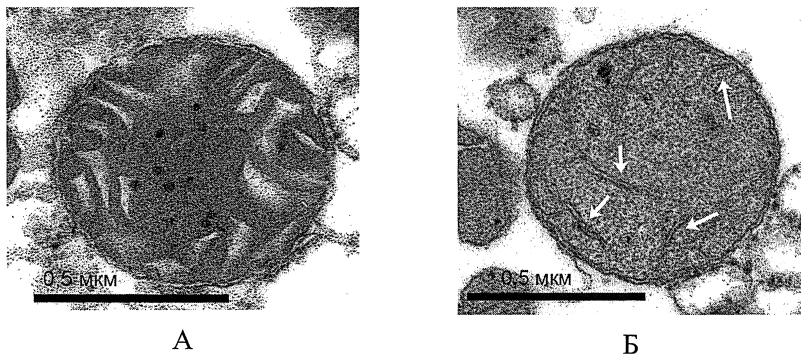


Рис. 8. Влияние тоничности среды инкубации на структуру крист митохондрий печени крысы, исследованное с помощью электронной микроскопии. А – изотоническая среда (250 мОсм), светлые участки – межмембранное пространство (внутрикристное пространство). Б – гипотоническая среда (120 мОсм), стрелки указывают на сжатые кристы. Инкубирование проводилось при 16 °С.

Полученная из экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов информация о толщине двумембранной структуры была независимо подтверждена с помощью электронной микроскопии митохондрий печени крысы и атомно-силовой микроскопии митопластов печени крысы. На фотографии электронной микроскопии в гипотонических условиях кристы представляются сильно сжатыми двумембранными объектами (Рис. 8Б). Их толщина составляет в среднем $(220 \pm 20) \text{ \AA}$. Мы оценили толщину сжатых крист митохондрий, помещенных в среду той же тоничности (120 мОсм), по фотографии электронной микроскопии, полученной ранее в работе Красинской (Красинская и др., 1989). Среднее значение толщины составило $(250 \pm 30) \text{ \AA}$.

С помощью атомно-силовой микроскопии мы исследовали поверхность митопластов, полученных из митохондрий печени крысы. Предварительно митохондрии были помещены в условия формирования двумембранных упорядоченных структур – в гипотоническую среду (120 мОсм). После этого внешняя мембрана была удалена с помощью осмотического шока в среде тоничностью 20 мОсм. На АСМ-изображениях митопласты выглядят как объекты диаметром 0,5-1 мкм и высотой 100-250 нм. На поверхности ряда митопластов видны регулярные параллельные гребневидные структуры (Рис. 9). Ширина одного такого "гребня" составляет 300-400 \AA , а наблюдаемая высота складок – 50-100 \AA .

Данные структуры мы интерпретируем как сжатые кристы. Формирование крист в отсутствие внешней мембраны, вероятно, должно поддерживаться белками группы динаминов и другими митохондриальными белками, которые согласно литературным данным играют роль факторов, контролирующих форму крист. Таким образом, с помощью независимых методов – электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии – мы подтвердили формирование упорядоченных двумембранных структур складками внутренней митохондриальной мембраны. Значения толщин этих структур, полученных тремя независимыми методами, находятся в хорошем согласии между собой. Эти значения приведены в Таб. 1.

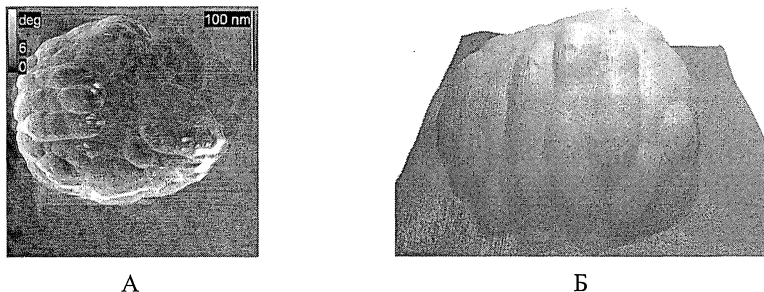


Рис. 9. АСМ-изображения митопласта печени крысы с наличием "гребней" (сжатых крист). А – изображение, записанные по каналу "фаза", Б – трехмерное представление.

Таб. 1. Значения толщины двумембранных упорядоченных структур, получаемые тремя различными методами. *- значение получено с учетом литературных данных по толщине одиночной внутренней митохондриальной мембраны; # - толщина измерена по фотографии из работы И.Красинской (Красинская и др., 1989).

Метод	Толщина двумембранной структуры, Å
Малоугловое рассеяние нейтронов	240±10
	*265±10
Электронная микроскопия	220±20
	#250±30
Атомно-силовая микроскопия	300-400

Особенности ультраструктуры митохондрий сердца крысы. В отличие от митохондрий печени внутренняя мембрана митохондрий сердца плотно заполняет ограниченный внешней мембраной объем. Эксперименты по малоугловому рассеянию были проведены на митохондриях, помещенных в изотоническую и гипотоническую среды, основанные на тяжелой воде. Полученные кривые рассеяния представлены на Рис. 10 (А и В). В обоих случаях (в изотонических и гипотонических условиях) внутренняя мембрана митохондрий сердца формирует упорядоченные структуры. Это приводит к появлению в кривых рассеяния

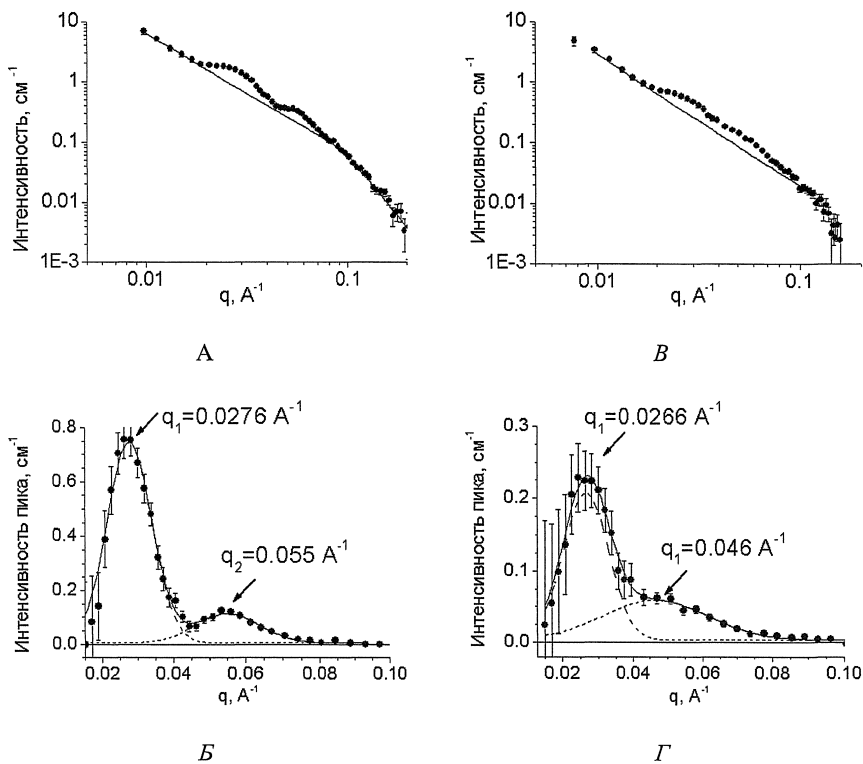


Рис. 10. Результаты малоуглового рассеяния нейтронов на митохондриях сердца крысы. А и Б – кривая рассеяния и выделенные из нее пики для митохондрий, помещенных в изотоническую среду. В и Г – кривая рассеяния и выделенные из нее пики для митохондрий, помещенных в гипотоническую среду. На рисунках А и В сплошной линией показана фоновая монотонно убывающая функция. На рисунках Б и Г сплошными линиями показана аппроксимация экспериментальных пиков, пунктирными – разложение этой аппроксимации на отдельные пики.

интерференционных пиков. При этом в зависимости от тоничности среды положение их максимумов отличается (Рис. 10 Б и Г). Кривые рассеяния для митохондрий, помещенных в изотоническую среду, содержат от двух до трех пиков.

Соотношение позиций максимумов этих пиков равно 1:2:3. Это говорит о формировании внутренней митохондриальной мембраной упорядоченной ламеллярной упаковки. Полученное из позиций максимумов пиков среднее расстояние между центрами мембран в этой упаковке составляет (220 ± 10) Å. Таким образом, оказалось, что в митохондриях сердца кристы образуют ламеллярные упорядоченные структуры в изотонических условиях.

Возможно два варианта интерпретации данных по малоугловому рассеянию для случая гипотонической среды. В этом случае соотношение позиций максимумов пиков близко к 1:1.73. Такое соотношение пиков может объясняться формированием внутренней мембраной инвертированной гексагональной фазы H_{II} , которая должна давать пики с соотношением позиций максимумов $1:\sqrt{3}...$ Кристы в митохондриях сердца расположены на близком расстоянии друг от друга, поэтому можно также предполагать образование мультислойной структуры с двумя характерными расстояниями между центрами мембран d_1 и d_2 (Рис. 11).

Если предположить наличие в митохондриях гексагональной фазы, то анализ интерференционных пиков дает структурный параметр a этой фазы, равным (270 ± 10) Å. Формирование гексагональной фазы было обнаружено в нашей лаборатории В. Сапруновой в условиях слабого увеличения объема матрикса в

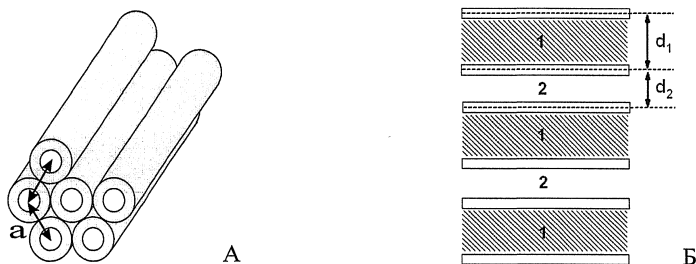


Рис. 11. Два варианта интерпретации данных малоуглового рассеяния нейтронов на митохондриях сердца, помещенных в гипотоническую среду. А - схематическое представление гексагональной фазы H_{II} с параметром a . Б - мультислойная двухфазная структура: мембраны разделяют две разные водные фазы - 1 и 2 (матрикс и межмембранное пространство).

митохондриях сердца крысы при апоптозе, вызванном аноксией (Сапрунова и др., 2003). По фотографии электронной микроскопии из этой работы мы оценили параметр a сформированной гексагональной фазы. Он составил $(260 \pm 30) \text{ \AA}$. Это значение близко значению, полученному нами из экспериментов по малоугловому рассеянию. Следуя модели мультиламеллярной структуры, анализ пиков дает значения расстояний между центрами мембран в этой структуре, равными $d_1 = (230 \pm 6) \text{ \AA}$ и $d_2 = (150 \pm 10) \text{ \AA}$ (Рис. 11Б).

Результаты измерения функциональной активности митохондрий после проведения экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов. После экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов была проведена проверка функциональной активности митохондрий печени крысы. Митохондрии разделялись на две части: одна использовалась для экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов, а вторая – сохранялась при пониженной температуре. После эксперимента по нейтронному рассеянию проверялась активность обоих образцов митохондрий. Результат полярографических измерений приведен на Рис. 12. Измерения показали, что митохондрии после облучения нейтронами сохраняют дыхательную активность.

Добавление разобщителя ТТФБ стимулирует дыхание.

Следовательно, внутренняя мембрана митохондрий сохранила свою целостность, и на ней поддерживается потенциал, создаваемый работой протонных помп. Таким образом, пучок нейтронов не подавляет функциональную активность митохондрий, и поэтому метод рассеяния тепловых нейтронов может быть адекватно использован для структурных исследований функционирующих митохондрий.

Подобные исследования, очевидно, могут быть проведены также на других органеллах, бактериях, а возможно, и клетках.

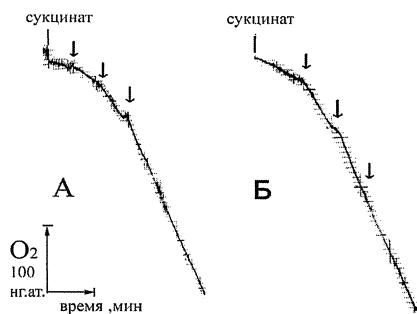


Рис. 12. Полярографическое исследование дыхания митохондрий, не облученных нейтронами (А), и после проведения эксперимента по рассеянию нейтронов (Б). Стрелками указано добавление разобщителя (ТТФБ) в концентрации 10^{-6} M . Субстрат дыхания – сукцинат.

Четвертая глава посвящена исследованию с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов структуры внутренней митохондриальной мембраны на модели субмитохондриальных частиц (СМЧ). Субмитохондриальные частицы (СМЧ) представляют собой однослойные везикулы, сформированные внутренней митохондриальной мембраной. При этом F_1 -фактор (каталитический компонент АТФ-синтетазы) локализован на внешней поверхности СМЧ. Диаметр СМЧ в среднем составляет 400 нм. Нами проводились измерения малоуглового рассеяния нейтронов на СМЧ в диапазоне векторов рассеяния q от 0.008 до 0.1 \AA^{-1} . В этой области в кривую рассеяния основной вклад дает форм-фактор толщины мембраны, и кривые рассеяния описываются приближением Кратки-Порода:

$$I(q) = \frac{I(0) \exp(-R_T^2 q^2)}{q^2}, \quad (4)$$

где R_T – радиус инерции толщины мембраны, $I(0)$ – интенсивность рассеяния в нулевой угол, q – вектор рассеяния. СМЧ помещались в среды со следующим содержанием D_2O : 0, 8, 12, 20, 35, 42, 55, 70, 80, 90 и 95%.

Определение объемных долей липида и белка в мембране СМЧ. Кривые рассеяния для каждого типа растворителя были аппроксимированы функцией (4), и получены соответствующие значения R_T и $I(0)$. Из построения $\sqrt{I(0)}$ от ρ_s (ρ_s – плотность рассеяния для буфера) была определена средняя плотность рассеяния $\bar{\rho}$ мембраны СМЧ, равная $(1.08 \pm 0.13) \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$. В области значений ρ_s , близких $\bar{\rho}$ в построении наблюдается разрыв. Это означает, что компоненты СМЧ (липиды и белки) не смешиваются однородно друг с другом, а образуют белковые и липидные области. Это свидетельствует о формировании "окон" из бислоев молекулами липидов. Зная среднюю плотность рассеяния мембраны, мы можем оценить объемные доли липида V_L и белка V_B в ней. Они составили 0.5 для каждой компоненты. Если рассмотреть мембрану СМЧ как объект, состоящий из углеводородной области (углеводородные цепи липидов) и полярной области (белки и полярные фрагменты липидов), объемные доли полярной $V_{пол}$ и углеводородной $V_{угв}$ областей соответственно равны 0.7 и 0.3.

Неравномерное распределение липида и белка в мембране СМЧ по толщине. Для неоднородной мембраны значение радиуса инерции R_T^2 зависит от контраста $\Delta\rho$. Контраст есть разность между средней плотностью рассеяния объекта $\bar{\rho}$ и

плотностью рассеяния растворителя ρ_s : $\Delta\rho = \bar{\rho} - \rho_s$. Зависимость R_T^2 от $\Delta\rho$ можно представить следующим образом:

$$R_T^2 = R_\infty^2 + \frac{\alpha}{\Delta\rho} - \left(\frac{1}{\Delta\rho}\right)^2 \cdot \beta^2, \quad (5)$$

где R_∞ – радиус инерции толщины мембраны при "бесконечном контрасте" (параметр, связанный со средней толщиной мембраны); параметры α и β характеризуют неоднородное распределение плотности в мембране.

Из аппроксимации экспериментальной зависимости R_T^2 от $\Delta\rho$ функцией (5) были получены следующие характеристики мембраны: радиус инерции формы мембраны R_∞ , равен (15.4 ± 0.2) Å, связанная с ним средняя толщина мембраны T ($T = \sqrt{12}R_\infty$) составляет (53.4 ± 0.7) Å; геометрический центр мембраны и центр тяжести распределения неоднородностей в ней не совпадают – мембрана асимметрична. Расстояние L ($L = \beta / \bar{\rho}$) между этими центрами тяжести составляет (13.3 ± 0.7) Å. Положительное значение параметра α указывает на то, что компоненты с большей плотностью (белки) находятся на периферии мембраны. Схема мембраны, формирующей субмитохондриальные частицы, представлена на Рис. 13.



Рис. 13. Схема внутренней митохондриальной мембраны в составе СМЧ, полученная из анализа данных малоуглового рассеяния нейтронов. Жирной линией обозначена форма мембраны, наблюдаемая при "бесконечном контрасте" – она заполнена однородной плотностью; данной форме соответствует радиус инерции $R_\infty = 15.4$ Å. Прерывистой линией показан контур этой формы в приближении плоской мембраны, которая имеет толщину $T = 53.4$ Å. L – смещение между геометрическим центром мембраны и центром тяжести распределения неоднородностей плотности в этой форме.

ВЫВОДЫ

1. С помощью малоуглового рассеяния нейтронов идентифицированы два структурных состояния мембран митохондрий печени и сердца, переход между которыми регулируется системой осморегуляции.
2. Было показано формирование из складок внутренней мембраны митохондрий печени и сердца высокоупорядоченных структур, дающих интерференционные пики в кривых малоуглового рассеяния нейтронов.
3. Определены геометрические параметры двумембранной упорядоченной структуры, образующейся в митохондриях печени, и показано участие липидного бислоя в формировании этой структуры.
4. Полученные значения толщины двумембранных структур независимо подтверждены методами электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии.
5. Обнаружены различия в условиях формирования упорядоченных структур в митохондриях печени и сердца: в митохондриях печени эти структуры образуются в гипотонических условиях, а в митохондриях сердца – в изотонических средах.
6. Получены основные характеристики внутренней мембраны митохондрий на модели СМЧ: толщина мембраны, объемные доли липида и белка, степень неоднородности распределения белка и липида по толщине мембраны.
7. Полученные результаты показали возможности метода малоуглового рассеяния нейтронов для исследования структуры функционирующих митохондрий.

МАТЕРИАЛЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

1. Murugova T.N., Gordeliy V.I., Islamov A.K., Kovalev Y.S., Kuklin A.I., Vinogradov A.D., Yaguzhinsky L.S. (2006) Structure of membrane of submitochondrial particles studied by small angle neutron scattering. *Materials structure* 2(3), 68-70.
2. Муругова Т.Н., Горделий В.И., Куклин А.И., Ковалев Ю.С., Юрков В.И., Нюренберг А., Исламов А.Х., Ягужинский Л.С. (2006) Обнаружение новых двумембранных структур в нативных митохондриях с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов. *Биофизика* 51(6), 1001-1007.
3. Муругова Т.Н., Горделий В.И., Куклин А.И., Солодовникова И.М., Ягужинский Л.С. (2007) Регистрация трёхмерно упорядоченных структур в интактных митохондриях с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов. *Кристаллография* 52(3), 568-571.
4. Dubrovin E.V., Murugova T.N., Motovilov K.A., Yaguzhinskii L.S., Yaminskii I.V. (2009) Application of Atomic Force Microscopy Technology to a Structural Analysis of the Mitochondrial Inner Membrane. *Nanotechnologies in Russia* 4(11-12), 876-880.
5. Murugova T.N., Gordeliy V.I., Islamov A.K., Kuklin A.I., Nuerenberg A., Yaguzhinsky L.S. (2003) Changes in mitochondrial structure induced by swelling. *FLNP Annual Report*. Dubna.
6. Murugova T.N., Gordeliy V.I., Islamov A.K., Kuklin A.I., Nuerenberg A., Yaguzhinsky L.S. (2004) Application of SANS for investigation of structural parameters of mitochondrial crista. *Germany-JINR User Meeting "Condensed Matter Physics with Neutrons at IBR-2. Proceedings: 64-65.*
7. Murugova T.N., Gordeliy V.I., Islamov A.K., Kuklin A.I., Nuerenberg A., Yaguzhinsky L.S. (2004) Structural changes in mitochondria studied by small angle neutron scattering. 2nd Central European Training School. Budapest, Hungary. *Contributed papers: 49-51.*
8. Муругова Т.Н., Горделий В.И., Исламов А.Х., Куклин А.И., Нюренберг А., Ягужинский Л.С. (2004) Структурные изменения в мембранах митохондрий, обнаруженные с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов. VIII научная конференция молодых ученых и специалистов ОИЯИ. Дубна, Россия. Тезисы докладов: 47 - 50.
9. Murugova T.N., Gordeliy V.I., Islamov A.K., Kuklin A.I., Solodovnikova I.M., Yaguzhinsky L.S. (2005) Structural reorganization of mitochondrial membrane under low-amplitude swelling studied by small angle neutron scattering. *Annual report FLNP: 156-157.*
10. Murugova T.N., Gordeliy V.I., Islamov A.K., Kuklin A.I., Solodovnikova I.M., Yaguzhinsky L.S. (2006) Detection of new type of membrane structure in mitochondria under low-amplitude swelling by small angle neutron scattering. 14-th European

Bioenergetics Conference. Moscow, Russia. Abstract book // Biochim. Biophys. Acta 14, 524-525.

11. Murugova T.N., Gordeliy V.I., Islamov A.K., Kuklin A.I., Solodovnikova I.M., Yaguzhinsky L.S. (2006) Investigation of rat heart mitochondria by small angle neutron scattering. International Small-Angle Scattering Workshop is devoted to Yu. M. Ostanevich. Dubna, Russia. Proceedings: 45.

12. Муругова Т.Н., Горделий В.И., Куклин А.И., Солодовникова И.М., Ягужинский Л.С. (2007) Изучение структуры митохондрий с помощью метода малоуглового рассеяния нейтронов. Первая Всероссийская Школа-семинар "Современные достижения бионаноскопии". Москва. Сборник тезисов: 40-41.

13. Муругова Т.Н., Горделий В.И., Куклин А.И., Иванов А.И., Солодовникова И.М., Юрков В.И., Ягужинский Л.С. (2007) Исследование ультраструктуры митохондриальных мембран методом малоуглового рассеяния нейтронов. VI Национальная конференция по применению рентгеновского, синхротронного излучений, нейтронов и электронов для исследования материалов. Москва. Тезисы докладов: 143.

14. Муругова Т.Н., Горделий В.И., Куклин А.И., Иванов О.И., Солодовникова И.М., Юрков В.И., Ягужинский Л.С. (2009) Влияние осмотического стресса на структурные перестройки в митохондриях. XIII научная конференция молодых ученых и специалистов ОИЯИ. Дубна, Россия. Тезисы докладов: 23-26.

Получено 26 октября 2009 г.

Отпечатано методом прямого репродуцирования
с оригинала, предоставленного автором.

Подписано в печать 27.10.2009.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,44. Уч.-изд. л. 1,72. Тираж 100 экз. Заказ № 56746.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/