

## ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2017 г. Л.С. Ягужинский\* \*\*, Ю.А. Скоробогатова\* \*\*, С.В. Нестеров\* \*\*

\*Московский физико-технический институт,  
141700, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

\*\*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/40

E-mail: yag@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 21.11.16 г.

После доработки 09.12.16 г.

Исследованы физико-химическая природа и функциональная значимость структурных перестроек в мембранах митохондрий, обнаруженных при температурах не физиологически низких для теплокровных животных. С помощью флуоресцентного зонда пирена найдены структурные переходы в анулярных липидах при температурах 19 и 25°C, идентифицированные как предпереход и основной фазовой переход. Показано, что наблюдаемые перестройки согласованы с резкими изменениями тушения флуоресценции триптофана пиреном, которые происходят при тех же температурах, что указывает на существенные структурные изменения в зонах контакта белков и липидов. Наблюдаемые эффекты регистрируются в условиях низкоамплитудного набухания митохондрий в среде с пониженной тоничностью. Поскольку именно при таких условиях авторами ранее был продемонстрирован переход фосфорилирующей системы в режим работы суперкомплекса, сделано заключение о вероятной взаимосвязи обнаруженных резких изменений структуры мембраны с формированием суперкомплекса. Проведенные измерения скорости фосфорилирующего дыхания митохондрий в гипотонической среде показали, что энергия активации лимитирующей стадии процесса синтеза АТФ также скачком изменяется при температуре фазового перехода анулярных липидов (25°C). Проведенный анализ литературы показал, что подобный аномальный низкотемпературный скачок энергии активации реакции синтеза АТФ около 25°C наблюдается у многих видов животных. Это указывает на то, что низкотемпературные структурные переходы в мембранах теплокровных должны иметь общебиологическое значение. Сопоставление полученных результатов и литературных данных позволило также дать качественное описание физико-химической природы наблюдаемых перестроек и предложить модель формирования суперкомплекса в митохондриях, сходную с моделью образования «мембранных рафтов».

*Ключевые слова:* митохондрия, анулярный липид, окислительное фосфорилирование, фазовые переходы, мембрана, суперкомплекс, температура.

Исследуя механизмы функционирования системы окислительного фосфорилирования, мы давно обнаружили аномальные структурные изменения при температурах 17–25°C, происходящие в мембранах митохондрий в условиях функционирования этих органелл. Результаты были опубликованы в работе [1], однако не были достаточно обсуждены и не получили полной интерпретации, прежде всего по причине того, что при этих температурах (17–25°C) не обнаруживались фазовые переходы в митохондриальных мембранах методами калориметрии и ЯМР [2]. Кроме того, этот диапазон температур далек от нормальной температуры тела теплокровных.

За прошедшее время знания о функции и структуре митохондрий существенно обогатились, в нашей лаборатории были проведены новые исследования структуры мембран митохондрий с использованием малоуглового рассеяния нейтронов и электронной микроскопии [3], что позволило вновь вернуться к проблеме изучения физико-химической природы и биологической значимости обнаруженного ранее явления.

Было показано, что фосфорилирующая система митохондрий может функционировать в двух качественно различных режимах [4] – как диссоциированная мультиферментная система (модель Митчелла [5]) и как суперкомплекс

(модель Вильямса [6]). Во втором случае интермедиаты реакций передаются от фермента к ферменту непосредственно, без выхода в водную фазу, в результате чего реализуется жесткое сопряжение работы отдельных ферментов. Такое согласованное функционирование ферментов окислительного фосфорилирования наблюдалось в работе [4] на митохондриях печени крыс, причем измерения проводились при комнатной температуре (около 23°C) в гипотонической среде измерения (120 мосМ). В таких условиях под действием системы объемной регуляции [7] митохондрии набухают и их морфология существенно изменяется – образуются так называемые «сухие» кристы [1].

Кроме того, мы обратились к классическим работам Дж. Райсона и других авторов [8–10], в которых был обнаружен эффект скачкообразного роста энергии активации процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях различных видов теплокровных животных при понижении температуры до 25–20°C. При тех же температурах реализуется и описанный нами ранее структурный переход в мембране митохондрий [1], существование которого было подтверждено также методом ЭПР-спектроскопии [8]. В связи с вышеперечисленным становится очевидным факт существования низкотемпературных перестроек в мембране митохондрий теплокровных животных. Наши результаты, полученные в настоящей работе и демонстрирующие излом на графике Аррениуса при температуре около 25°C, а также результаты работ [8,9,11] указывают на высокую биологическую значимость происходящих изменений.

Целью настоящей статьи является детальное изучение физико-химической природы процессов, протекающих при низкотемпературных структурных перестройках в митохондриальных мембранах, и выяснение их связи с функционированием системы синтеза АТФ.

## МЕТОДЫ

### Особенности пирена как мембранного зонда.

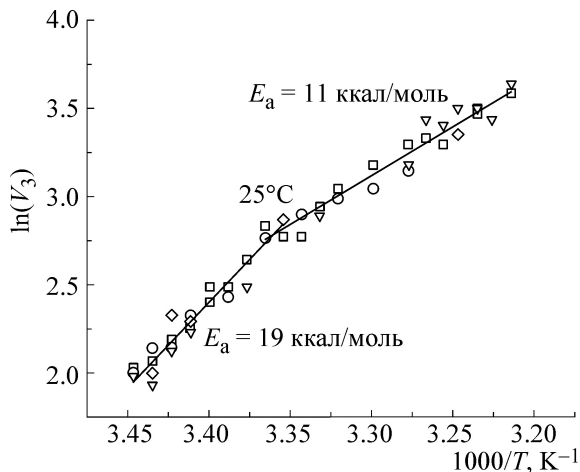
Пирен и его модификации [12] часто используют для анализа состояния мембран [13,14]. При температурах выше фазового перехода липидов в неупорядоченную жидко-кристаллическую фазу ( $L_{\alpha}$ ), пирен равномерно распределяется в бислое. В результате стохастического движения зонда при столкновении возбужденного мономера пирена с невозбужденным происходит образование эксимера (возбужденного димера) [15]. Степень эксимеризации пирена оценивается как соотношение интенсивности максимумов флуоресценции эксимерной (465 нм) и мономерной (373 нм) форм ( $I_3/I_M$ ).

Хотя параметр  $I_3/I_M$  в неоднородных структурах не отражает непосредственно вязкость липидного бислоя, тем не менее данный метод очень чувствителен и хорошо подходит для качественных и сравнительных измерений состояния сложных мембран [16].

При температурах ниже фазового перехода, когда липид находится в геле-фазе ( $L_{\beta}$ ), в липосомах из очищенного дипальмитойлфосфатидилхолина пирен существует в основном в виде кластеров (олигомеров) [14]. Образование эксимеров в этом случае происходит сразу в момент захвата кванта света пиреновой парой [17].

Особенности поведения пирена в области фазовых переходов хорошо изучены на однокомпонентных липидных липосомах. С помощью этого зонда можно регистрировать не только основной фазовый переход, но и так называемый предпереход, возникающий в некоторых системах при температуре на несколько градусов ниже температуры основного перехода [14].

**Измерения флуоресценции.** Встраивание зонда проводили в термостатированных ячейках с постоянным перемешиванием при добавлении порциями по 2–5 мкл спиртового раствора пирена к суспензии митохондрий. Измерения проводили на спектрофотометре Perkin-Elmer MPF-448. При измерении степени эксимеризации пирена в анулярных липидах образцы облучали светом с длиной волны 285 нм (в полосе поглощения триптофана). Триптофан практически отсутствует в белках внешней митохондриальной мембраны, но присутствует в значительном количестве в комплексах дыхательной цепи на внутренней мембране. Спектр флуоресценции триптофана перекрывается со спектром поглощения пирена, ввиду чего происходит перенос энергии с возбужденного триптофана на молекулы пирена, находящиеся в непосредственной близости от белков (в радиусе Ферстера). Эффективность переноса энергии определяет степень тушения флуоресценции триптофана пиреном и зависит от свойств зоны контакта белковой и липидной компонент мембраны. Параметр измеряли как  $1 - I/I_0$ , где  $I$  и  $I_0$  – интенсивности флуоресценции триптофана в присутствии и отсутствии пирена соответственно. Согласно данным работ [18,19], вносили поправки в интенсивность прямого возбуждения молекул пирена светом 285 нм, а также проводили калибровку, учитывающую температурную зависимость светорассеяния. Измерения температурной зависимости флуоресценции пирена, проведенные в данной работе, качественно идентичны результатам работы [1].



**Рис. 1.** Зависимость логарифма скорости фосфорилирования митохондрий печени крыс от температуры, представленная в координатах Аррениуса. Средние значения наблюдаемых энергий активации реакции указаны на рисунке. Излом наблюдается при температуре 25°C. Разные виды точек соответствуют различным сериям измерений (всего четыре серии). Систематические погрешности находятся в пределах размера точек. Аппроксимирующие прямые построены по методу наименьших квадратов.

Среда измерения содержала 0,5 мМ ЭДТА, 20 мМ КСl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 10 мМ НЕРЕС, 1 мкМ ротенона, 5 мМ янтарной кислоты (сукцината) и сахарозу до величины тоничности 120 и 300 мосМ, рН 7,5. Все используемые в работе реактивы (производства фирм MP Biomedical (США), Sigma (США), Amresco (США), Helicon (Россия)) имели квалификацию «х. ч.» или «ос. ч.».

#### Измерение скорости фосфорилирования.

Скорость дыхания митохондрий измерялась полярографическим методом (Strathkelvin Mitocell MT200, OxugenMeter 782) в термостатируемой ячейке. Фосфорилирование измеряли в условиях работы сукцинатдегидрогеназы, в присутствии 1,5 мкМ ротенона, 0,5 мМ янтарной кислоты, 80–160 мкМ АДФ и 0,4–0,8 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>. Среда измерения содержит 3 мМ НЕРЕС, 0,25 мМ ЭДТА, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 13 мМ КСl, 90,5 мМ D-маннитола (гипотоническая, 120 мосМ) либо 320,5 мМ D-маннитола (изотоническая, 350 мосМ), рН = 7,4. Наблюдаемую энергию активации реакций определяли как коэффициент угла наклона прямой на графике в координатах Аррениуса. Прямые строились по методу наименьших квадратов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

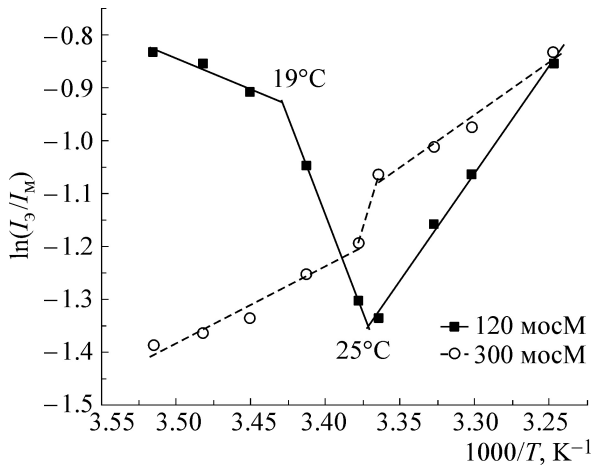
**Изменение энергии активации реакции синтеза АТФ при 25°C.** Наши препараты митохон-

дрий печени крыс обнаруживают те же особенности, что описаны в работах [8,9] – излом графика Аррениуса скорости окислительного фосфорилирования ( $V_3$ ) при температуре около 25°C (рис. 1). В отличие от условий, использованных в работах [8,9], наши эксперименты были проведены в гипотонической среде, в которой происходит набухание митохондрий и переход фосфорилирующей системы в режим работы суперкомплекса [4]. Тем не менее наблюдаемая энергия активации при температурах ниже 25°C (равная  $19 \pm 1$  ккал/моль) по значению близка к значению энергии, найденному в работе [20], и к энергии активации транслокатора нуклеотидов [21]. В диапазоне температур 25–35°C наблюдаемая нами энергия активации ( $11 \pm 1$  ккал/моль) больше, чем общается в работе [20].

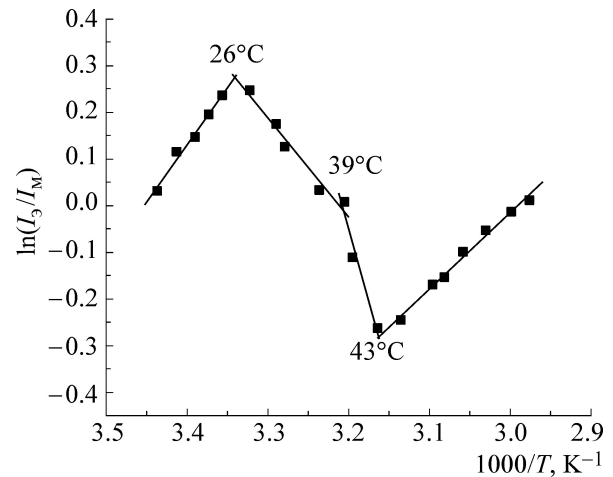
**Структурные перестройки в анулярных липидах функционирующих митохондрий.** Состояние анулярного липида митохондриальной мембраны отслеживалось в диапазоне температур 10–35°C. Для установления связи между структурными перестройками и состоянием фосфорилирующей системы митохондрий измерения проводились в изо- и гипотонических средах (300 и 120 мосМ, см. раздел «Методы») в условиях работы протонных помп, т.е. при наличии на мембране электрохимического потенциала.

Выяснилось, что поведение зонда в анулярном липиде кардинально различается в средах с разной тоничностью (рис. 2). В изотонической среде пирен ведет себя в соответствии с диффузионной моделью образования эксимеров. Вязкость анулярного липида падает с повышением температуры во всем исследованном диапазоне температур и около 25°C уменьшается скачком, что хорошо заметно на графике, построенном в координатах Аррениуса (рис. 2). Такое поведение соответствует типичному переходу между двумя «жидкими» фазами, обе из которых допускают образование эксимеров по диффузионному механизму.

По сравнению с изотоническими условиями в гипотонической среде состояние пиренового зонда в анулярном липиде мембраны митохондрий претерпевает качественные изменения. При температурах 10–15°C количество эксимеров пирена по отношению к мономерам увеличено. Это является следствием реализации недиффузионного механизма образования эксимеров (см. раздел «Методы») и обусловлено олигомеризацией пирена вследствие перехода липида в гель-фазу при этих температурах. Уменьшение с температурой степени эксимеризации пирена в диапазоне 10–25°C обусловлено распадом олигомеров пирена, которые существуют в гель-фазе липида [14].



**Рис. 2.** Степень эксимеризации ( $I_3/I_M$ ) пиренового зонда в митохондриальной мембране в координатах Аррениуса. В изотонической среде достоверно удается выделить лишь излом в районе 25°C, в то время как в гипотонии четко видны два перегиба – при 19 и 25°C.



**Рис. 3.** Степень эксимеризации пиренового зонда в координатах Аррениуса, измеренная на модельной системе – липосомах из дипальмитоилфосфатидилхолина. График построен по данным работы [14]. Форма зависимости после 26°C качественно совпадает с наблюдаемой в гипотонических условиях на митохондриях (см. рис. 2).

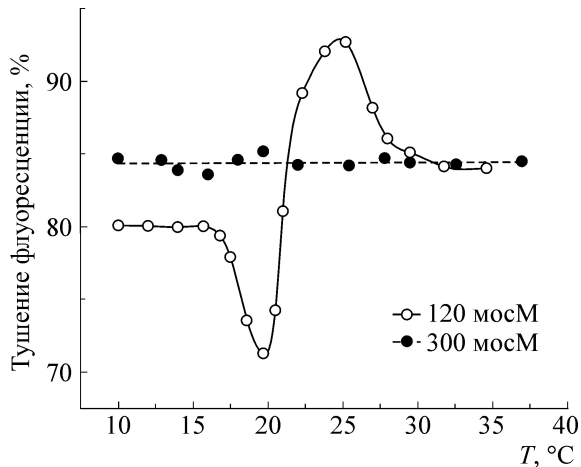
После 19°C идет плавление гель фазы и диссоциация пиреновых кластеров усиливается. В диапазоне температур 20–25°C анулярный липид находится в некотором промежуточном состоянии, предполагающем сосуществование фаз. Повышение температуры до 35°C разрушает дефекты и неоднородности, приводя зонд с его липидным окружением к состоянию, аналогичному наблюдаемому в изотонии. На графиках, построенных в координатах Аррениуса (рис. 2), хорошо различимы температуры переходов между тремя различными состояниями анулярного липида: 19 и 25°C.

Анализ литературных данных показал, что такое поведение зонда наблюдается и в простых модельных системах, например в липосомах из дипальмитоилфосфатидилхолина. Для наглядности на рис. 3 данные работы [12] перестроены в координатах Аррениуса. Поскольку фазовое поведение этой простой системы хорошо изучено средствами калориметрии [22] и микроскопии [23], известно, что перестройки, регистрируемые флуоресцентным методом, соответствуют основному фазовому переходу и так называемому предпереходу [22] липида. Такое сходство дает возможность предполагать наличие аналогичных фаз и переходов в изучаемой нами сложной липид-белковой системе: предперехода при 19°C и основного перехода при 25°C. Заметим, что в настоящей работе впервые постулируется существование предперехода (или его близкого аналога) в биологической мембране.

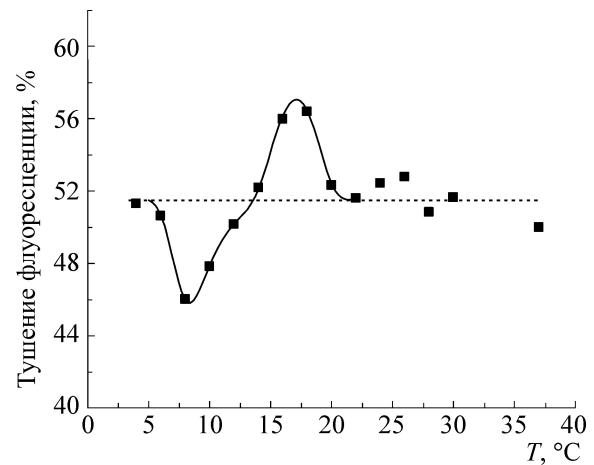
**Структурные изменения в липид-белковых контактах.** Второй исследуемый параметр – сте-

пень тушения флуоресценции триптофана пиреном – отражает эффективность переноса энергии с белковой на липидную компоненту мембраны, т.е. характеризует свойства липид-белковых контактов (см. раздел «Методы»). Тушение флуоресценции, так же как и степень эксимеризации зонда, измерялось в диапазоне температур 10–35°C в изо- и гипотонических средах в условиях работы протонных помп митохондрий.

Как и уровень эксимеризации пирена, степень тушения флуоресценции триптофана оказывается кардинально различной в средах с разной осмолярностью (рис. 4). В изотонических условиях зонд практически не регистрирует изменений в липид-белковых контактах во всем диапазоне температур. Однако в гипотонической среде наблюдаются резкие перестройки. В диапазоне температур 10–15°C перенос энергии между триптофанами белков и пиреном подавлен по сравнению с изотоническими условиями (рис. 4). Это состояние реализуется параллельно с повышенной эксимеризацией пирена в анулярном липиде, т.е. с существованием липида в гель-фазе. Повышение температуры до 35°C, как и в случае липид-липидных контактов, приводит систему липид-белковых контактов к тому же состоянию, что наблюдается в изотонии (рис. 4). Таким образом, повышение температуры вплоть до характерной температуры тел теплокровных сводит на нет осмоиндуцированные изменения мембраны, наблюдаемые при более низких температурах.



**Рис. 4.** Тушение флуоресценции триптофана пиреном в митохондриях. Параметр отражает эффективность переноса энергии между белковой и липидной компонентами мембраны. В отличие от изотонических условий, в гипотонии наблюдаются резкие изменения белок-липидных взаимодействий при изменении температуры.



**Рис. 5.** Тушение флуоресценции триптофана пиреновым зондом в протеолипосомах. Белок (пермеаза лактозы) встроен в липосомы из POPE/POPG. Рисунок перестроен по данным работы [24] с учетом калибровки. Вид кривой качественно совпадает с наблюдаемым в гипотонических условиях на митохондриях (см. рис. 4).

В гипотонической среде система также обнаруживает две особые для белок-липидных взаимодействий температуры – 19 и 25°C. При 19°C взаимодействие между триптофаном и пиреном подавлено, а при 25°C, наоборот, перенос энергии между ними происходит крайне эффективно. Эти два особых состояния белково-липидной мембраны, несомненно, тесно связаны с перестройками анулярного липида при тех же температурах – аналогами предперехода при 19°C и основного фазового перехода при 25°C.

Качественно аналогичное поведение пиренового зонда в более простой модельной липид-белковой системе наблюдалось в работе [24] на липосомах из смеси липидов POPE/POPG (1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилэтаноламин/1-пальмитоил-2-олеоил-фосфатидилглицерол) со встроенным мембранным белком (нормированный аналогично нашим результатам график тушения флуоресценции, построенный по данным статьи [24], изображен на рис. 5). Особые температуры, так же как и в нашем случае, совпадают с температурами переходов в липидной компоненте мембраны. Это непосредственно подтверждает, что изменения тушения флуоресценции триптофана обусловлены именно особенностями физико-химического состояния анулярных липидов вблизи температур их фазовых переходов.

Таким образом, при переходе к гипотоническим условиям, где фосфорилирующая система может функционировать в режиме суперкомплекса, внутренняя мембрана митохондрий при комнатных температурах претерпевает

сильные перестройки на уровне липид-липидных и липид-белковых взаимодействий.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждая полученные результаты, представляется важным ответить на вопрос, в чем причина различий в состоянии мембраны митохондрий в гипотонической и изотонической средах.

**Влияние тоничности среды на структурные переходы.** В первую очередь, необходимо отметить, что морфология крист митохондрий в изо- и гипотонических средах заметно различается. Набухание митохондрий в гипотонической среде при входе воды в матрикс сопровождается образованием «сухих» крист, т.е., по сути, двойного липидного бислоя, на который с обеих сторон оказывается давление из матрикса. Такое изменение морфологии может быть причиной различного состояния мембран в изо- и гипотонии.

Во-вторых, ряд экспериментальных данных, полученных как на митохондриях, так и на модельных липидных системах, свидетельствует о том, что низкая тоничность среды вызывает латеральное разделение компонент мембраны. Осмотическое давление на мембрану во многом аналогично гидростатическому давлению [25] и, в частности, повышает степень гидратации мембраны. На липосомах показано, что гипотонические условия стимулируют латеральное разделение липидов на отдельные фракции [26], а также вызывают фазовые переходы [27]. Для

митохондрий в гипотонической среде разделение мембраны на различные латеральные фракции подтверждается данными работы [3], в которой показано возникновение липидных кластеров в митохондриальной мембране. В митохондриях в условиях сжатия крист дополнительным стимулом для латерального разделения мембраны может выступать также тесный контакт мембраны и цитохрома *c* [28].

Приведенные данные позволяют использовать для описания наблюдаемых явлений существующую модель «мембранных рафтов» [29,30]. Можно предполагать, что в гипотонических условиях вокруг белков внутренней мембраны митохондрий формируются домены, подобные «рафтам» в плазматических мембранах. Несмотря на отсутствие во внутренней мембране митохондрий холестерина, рафтообразующей компонентой могут выступать сами мембранные белки. Известно, что белки во многокомпонентных мембранах могут селективно окружать себя определенными липидами, отбирая их как по длине гидрофобного «хвоста» [31], так и по типу «головы» [32]. Повышение плотности анулярного липида вокруг белка зарегистрировано даже в односоставных липидных мембранах [33].

Таким образом, структурные изменения, регистрируемые в данной работе в гипотонических условиях, происходят именно в белково-липидных доменах, образованных при латеральном разделении компонент мембраны. В таких условиях появляется возможность наблюдать резкие термо-индуцированные переходы, характерные для простых модельных систем. В тех же условиях происходит жесткое сопряжение работы протонных помп и АТФ-синтазы [4], в связи с чем можно предполагать, что наблюдаемые структурные изменения сопровождаются усилением белок-белковых контактов и создают возможность для образования суперкомплекса. Именно в районе 19°C в гипотонии наблюдается особое состояние фосфорилирующей системы, защищенное от разобщающего действия жирных кислот [34].

**Функциональные особенности наблюдаются при комнатных температурах.** Еще один важный вопрос: почему фазовые перестройки и сопутствующие им функциональные изменения наблюдаются при температурах ниже температуры тела теплокровных. Стоит отметить, что подобные функциональные изменения и изломы на графиках Аррениуса наблюдаются в том же диапазоне температур на многих исследуемых препаратах [11,21,35], полученных из различных теплокровных организмов. Интересно, что в печени крыс при одних и тех же температурах происходят функциональные изменения не

только в митохондриях, но и в эндоплазматическом ретикулуме [8] и в плазматической мембране [36]. Такое многообразие и согласование явлений указывает на их не случайность и физиологическую значимость. Вопрос о том, каким образом подобные структурные переходы могут реализовываться *in vivo*, остается открытым.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена исследованию физико-химической природы и функциональной значимости структурных перестроек в мембранах митохондрий, обнаруженных при температурах не физиологически низких для теплокровных животных. В экспериментах использовался флуоресцентный зонд пирен, позволяющий избирательно исследовать структурные особенности мембраны в области анулярных липидов. Было обнаружено, что в гипотонических условиях мембраны митохондрий претерпевают существенные структурные изменения при температуре ниже 25°C. Сопоставление флуоресценции пирена в мембранах митохондрий и в простых модельных системах позволило предполагать, что в анулярных липидах митохондриальной мембраны при 19 и 25°C происходят предпереход и основной фазовый переход липидов соответственно. Наблюдаемые эффекты регистрируются в условиях низко-амплитудного набухания митохондрий. В связи с тем, что именно при таких условиях фосфорилирующая система функционирует в режиме работы суперкомплекса, в настоящей статье сделано заключение о вероятной взаимосвязи обнаруженных изменений структуры мембраны с формированием суперкомплекса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00107) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-01043).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. I. P. Krasinskaia, et al., *Biokhimiya* (Moscow) **54** (9), 1550 (1989).
2. D. J. Pehowich, et al., *Biochemistry* (Moscow) **27** (13), 4632 (1988).
3. T. N. Murugova, et al., *Biophysics* **51** (6), 882 (2006).
4. I. P. Krasinskaya, et al., *Febs Lett.* **167** (1), 176 (1984).
5. P. Mitchell, *Nature* **191**, 144 (1961).
6. R. J. P. Williams, *J. Theor. Biol.* **1** (1), 1 (1961).
7. A. P. Halestrap, *Biochim. Biophys. Acta* **973** (3), 355 (1989).
8. J. K. Raison and E. J. McMurchie, *Biochim. Biophys. Acta* **363** (2), 135 (1974).

9. E. J. McMurchie and J. K. Raison, *Biochim. Biophys. Acta* **554** (2), 364 (1979).
10. F. Geiser and E. J. McMurchie, *J. Comp. Physiol. B* **155** (6), 711 (1985).
11. E. J. McMurchie, J. K. Raison, and K. D. Cairncross, *Comp. Biochem. Physiol. B* **44** (4), 1017 (1973).
12. H. J. Galla and W. Hartmann, *Chem. Phys. Lipids* **27** (3), 199 (1980).
13. M. Dembo, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **552** (2), 201 (1979).
14. H. J. Galla and E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta* **339** (1), 103 (1974).
15. N. L. Vekshin, in *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin-Heidelberg, 2002), pp. 165–171.
16. R. L. Melnick, et al., *Biophys. J.* **34** (3), 499 (1981).
17. J. Y. Lehtonen, J. M. Holopainen, and P. K. Kinnunen, *Biophys. J.* **70** (4), 1753 (1996).
18. A. D. Dergunov, A. S. Kaprel'iants, and D. N. Ostrovskii, *Biokhimiya* (Moscow) **46** (8), 1499 (1981).
19. I. S. Litvinov and V. V. Obraztsov, *Biofizika* **27** (1), 81 (1982).
20. J. K. Raison, J. M. Lyons, and W. W. Thomson, *Arch. Biochem. Biophys.* **142** (1), 83 (1971).
21. H. M. Levy, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 118 (1962).
22. K. A. Riske, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (5), 954 (2009).
23. T. Kaasgaard, et al., *Biophys. J.* **85** (1), 350 (2003).
24. L. Picas, et al., *J. Fluoresc.* **17** (6), 649 (2007).
25. H. Pfeiffer, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1609** (2), 148 (2003).
26. K. Oglecka, et al., *E-life* **3**, e03695 (2014).
27. W. R. Perkins, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1327** (1), 41 (1997).
28. G. P. Gorbenko, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1788** (6), 1358 (2009).
29. I. Levental and S. L. Veatch, *J. Mol. Biol.* **428**, 4749 (2016). DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.022.
30. M. Carquin, et al., *Prog. Lipid Res.* **62**, 1 (2016).
31. J. Y. Lehtonen and P. K. Kinnunen, *Biophys. J.* **72** (3), 1247 (1997).
32. C. Suárez-Germà, et al., *J. Phys. Chem. B* **116** (8), 2438 (2012).
33. B. Píknová, et al., *Gen. Physiol. Biophys.* **10** (4), 395 (1991).
34. S. V. Nesterov, I. A. Skorobogatova, and L. S. Iaguzhinskii, *Biofizika* **59** (6), 1113 (2014).
35. V. Luzzati and F. Husson, *J. Cell Biol.* **12**, 207 (1962).
36. L. M. Gordon, et al., *J. Biol. Chem.* **255** (10), 4519 (1980).

## Functionally Significant Low Temperature Structural Alterations in Mitochondrial Membranes of Homoiothermic Animals

**L.S. Yaguzhinsky\* \*\*, Y.A. Skorobogatova\* \*\*, and S.V. Nesterov\* \*\***

*\*Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

*\*\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119991 Russia*

The present work is focused on physicochemical nature and functional meaning of structural alterations in mitochondrial membranes. These alterations are observed at subnormal temperatures for homoiothermic animals. By means of pyrene as a fluorescent probe some structural transitions in annular lipids are detected at 19 and 25°C identified as the pretransition and main phase transition temperature. The observed changes are consistent with abrupt alterations in efficiency of tryptophan fluorescence quenching by pyrene occurring at the same temperatures. The data imply considerable changes in protein-lipid contact area. The effects are observed under low-amplitude mitochondrial swelling in media with lowered tonicity. Since the transition of the phosphorylating system into the supercomplex state has been previously shown under these conditions, it allows us to assume a relation between the observed membrane structural alterations and the supercomplex formation. Measurements of the respiration rate in mitochondria in hypoosmotic medium show that activation energy of rate-limiting step in the process of ATP synthesis changes abruptly at the temperature of the phase transition of annular lipids (25°C). Analysis of literature data indicates that similar abnormal low temperature abrupt change in activation energy in the reaction of ATP synthesis around 25°C is observed for a variety of animal species. Hence, the low temperature structural alterations in membranes of warm-blooded animals should have general biological significance. A comparison of the results obtained in our study and literature data led, therefore, to a qualitative description of physicochemical nature of the observed membrane alterations. Similar to the membrane rafts model, the model of supercomplex formation in mitochondria is proposed.

*Key words: mitochondria, annular lipids, oxidative phosphorylation, phase transition, membrane, supercomplex, temperature*