

РЯД СВОЙСТВ ПРОТОМИТОХОНДРИЙ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

© 2018 г. К.Е. Крехова, Н.Л. Векшин

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

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.05.17 г.

Исследован ряд свойств изолированных протомитохондрий – малых молодых органелл клеток животных. Протомитохондрии были получены фильтрованием легкой фракции митохондрий печени крысы через калиброванные миллиметровые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Оказалось, что протомитохондрии обладают пониженной способностью к синтезу АТФ из-за гораздо меньшего содержания АТФ-синтазы. Количество цитохромов у протомитохондрий и митохондрий практически не отличается. Обнаружено, что протомитохондрии имеют больше флавопротеинов, чем митохондрии. Продемонстрировано, что протомитохондрии, в отличие от митохондрий, практически не содержат «пигмента старения» липофусцина. Указанные различия отражают процессы внутриклеточного созревания протомитохондрий до митохондрий и последующего старения до пост-митохондрий. Полученные результаты важны для понимания роли протомитохондрий в клеточном метаболизме специализированных клеток животных.

Ключевые слова: митохондриогенез, протомитохондрии, митохондрии, постмитохондрии, АТФ-аза, флавопротеины, цитохромы, дыхательная цепь, липофусцин.

Митохондрии (МХ) – двухмембранные органеллы эукариотических аэробных клеток, одной из основных функций которых является перенос электронов, сопровождающийся генерацией трансмембранного потенциала и синтезом АТФ [1]. МХ разных клеток отличаются по размеру, плотности, участию в метаболизме, старении и апоптозе [2–5]. В каждой животной клетке содержатся многие сотни и тысячи МХ. В специализированных клетках органов (печень, мышцы, сердце, почки и др.) МХ практически не делятся, а возникают в виде зародышевых прото-МХ диаметром 0,1–0,2 мкм, которые постепенно вырастают до зрелых МХ диаметром около 1 мкм ($\pm 0,5$ мкм), со временем деградирующих до старых пост-МХ диаметром 1–6 мкм [6,7]. Соотношение популяций прото-МХ, МХ и пост-МХ в каждой клетке зависит от вида клеток, возраста животного и других параметров [6]. Прото-МХ размером менее 0,45 мкм в специализированных клетках животных обычно составляют свыше 30% [6,7].

В нашей лаборатории впервые были выделены прото-МХ из клеток органов животных (сердце и печень) и изучены некоторые их свойства [7–10]. В частности, с помощью электронной микроскопии было определено, что прото-МХ размером 0,2–0,45 мкм обладают обеими мембранами – наружной и внутренней. На при-

мере печеночных прото-МХ было показано, что эти мелкие сферические частицы не являются обрывками МХ. Они обладают дыханием и некоторой фосфорилирующей активностью. Прото-МХ имеют полную дыхательную цепь, о чем свидетельствует потребление кислорода на цитохромоксидазе при окислении сукцината и НАДН. Кроме того, прото-МХ обладают высокими сукцинат- и НАДН-тетразолий-редуктазными активностями. Горизонтальный электрофорез показал, что прото-МХ имеют меньшее количество молекул ДНК, чем МХ, но с тем же молекулярным весом. Вертикальный электрофорез и гель-фильтрация показали совпадение большинства белковых полос прото-МХ и МХ, но с некоторыми количественными отличиями. Спектр белковой триптофановой флуоресценции прото-МХ близок к спектру МХ, немного отличается его тирозиновая компонента.

В работе [11] другими авторами, независимо от нас, были описаны свойства прото-МХ проростков растительных клеток.

Цель данной работы – дальнейшее изучение свойств прото-МХ из печени крысы (в сравнении со зрелыми МХ). Это необходимо для понимания процесса их созревания до МХ в специализированных клетках животных и для установления их возможного вклада в метаболизм.

Сокращение: МХ – митохондрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общую фракцию МХ из печени крысы выделяли по стандартной методике с некоторыми модификациями [7–9], позволяющими получить широкий диапазон тяжелых и легких органелл. Работу проводили при температуре 4°C, все растворы охлаждали на льду. Все процедуры проводили в холодной комнате. Печень крысы помещали в 60 мл холодной среды выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА и 10 мМ НЕРЕС (рН 7,5), затем продавливали печень через пресс и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенат центрифугировали 10 мин на центрифуге РС-6 при 1000 об/мин для осаждения эритроцитов и целых гепатоцитов. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, получая осадок МХ (тяжелая фракция), который после суспендирования в 7 мл среды расфасовывали в эппендорфовские пробирки и использовали для опытов. Оставшийся супернатант центрифугировали 20 мин при 5500 об/мин. Осадок (легкая фракция) суспендировали в 3 мл среды и сразу пропускали через фильтры на нитроцеллюлозной основе Whatman (США) с размером пор 0,45 мкм или через микропористые капроновые мембранные фильтры ООО НПП «Техно-фильтр» (Россия) с такими же порами. Полученные прото-МХ (размером до 0,45 мкм) разделяли на аликвоты и затем использовали для опытов. Для сравнения брали тяжелую фракцию МХ или калиброванные МХ, которые получили фильтрованием разбавленной суспензии тяжелых МХ через фильтры с размером пор 3 мкм.

Дыхательную активность прото-МХ и МХ определяли по скорости потребления кислорода с помощью электрода Кларка с термооксиметром «Эксперт-001» (ООО «Эконикс», Россия). Инкубационная среда содержала 5 мМ сукцината, 2 мМ фосфата калия и 150 мМ сахарозы, рН 7,5.

Относительное количество АТФ-синтетазы в прото-МХ и МХ определяли по скорости ферментативного гидролиза АТФ – по закислению среды в слабом буфере (при рН 7,6, когда фосфатные группы АТФ ионизированы):



Спектры флуоресценции регистрировали в кварцевых кюветах на спектрофлуориметрах MF44B (Perkin Elmer, США) и Cary Eclipse (Agilent, США), используя прозрачные детергентные растворы, получаемые обработкой прото-МХ и МХ с помощью 1% додецилсульфата натрия (в отсутствие ионов калия, чтобы не

вызывать агрегацию детергента). Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой области регистрировали на спектрофотометре [«ПромЭкоЛаб-5400УФ» (Санкт-Петербург, Россия) или «Specord M-40» (Carl Zeiss Jena, Германия) в отсеке для мутных образцов, позволяющем с помощью полусферического детектора компенсировать светорассеяние суспензии. Рассеяние света на каждой отдельной частице было устранено путем разрушения прото-МХ и МХ с помощью 1% додецилсульфата натрия (в отсутствие ионов калия), что делало из мутноватых суспензий достаточно прозрачные растворы. Концентрацию по белку определяли УФ-экспресс-методом [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

И в предыдущих опытах [7,13], и в данной работе прото-МХ имели невысокий дыхательный контроль, т.е. потребление кислорода активировалось добавлением АДФ не слишком сильно. Пониженная активность АТФ-синтетазы прото-МХ не является методическим артефактом, обусловленным повреждением мембран в ходе выделения и фильтрации, а присуща самим прото-МХ. В принципе пониженная активность АТФ-синтетазы могла быть связана с тем, что дыхательная цепь исходно разобщена с ней. Однако оказалось, что дело не в разобщении, а в том, что в прото-МХ мало самой АТФ-синтетазы. Чтобы уйти от неопределенности с вопросом о сопряжении, мы оценили количество этого фермента не по синтезу АТФ, а наоборот – по гидролизу. Мы провели опыты по ферментативному гидролизу АТФ на разрушенных заморозкой–разморозкой и гипотонией (чтобы устранить транспортные барьеры, способные лимитировать скорость) фрагментах прото-МХ и МХ. Оказалось, что фрагменты прото-МХ имеют примерно втрое меньшую АТФазную активность, чем фрагменты МХ (рис. 1). Начальная скорость гидролиза АТФ составляла для прото-МХ около 130 мкМ/(мин·мг белка), а для МХ – 390 мкМ/(мин·мг белка). Вероятно, прото-МХ содержат втрое меньше АТФазы (т.е. АТФ-синтетазы), чем МХ. Гидролиз АТФ конкурентно подавлялся избытком АДФ (на рисунке не показано).

Судя по спектру поглощения в видимой области, прото-МХ имеют суммарно столько же цитохромов, что и МХ (пик при 410 нм на рис. 2), в частности столько же цитохрома с (небольшой пик при 540 нм) и цитохром-оксидазы (небольшой пик при 640 нм). Вероятно, прото-МХ диаметром до 0,45 мкм имеют примерно такое же количество респираторных центров, что и МХ.

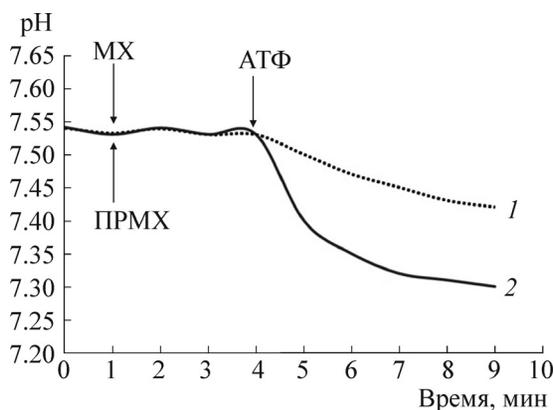


Рис. 1. Закисление pH при гидролизе АТФ частицами прото-МХ размером < 0,45 мкм (1) и частицами МХ размером < 3 мкм (2) в слабом гипотоническом буфере (0,8 мМ триса, 25 мМ сахарозы).

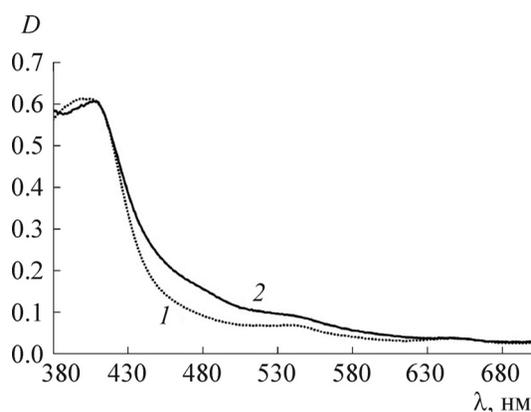


Рис. 2. Спектры поглощения цитохромов прото-МХ размером < 0,45 мкм (1) и МХ размером < 3 мкм (2) после их разрушения детергентом (1% додецилсульфата натрия). Спектры приведены за вычетом светорассеяния.

В спектре поглощения прото-МХ, в отличие от МХ, нет полосы в районе 450 нм. Природа этой полосы не ясна. Проще всего было бы предположить, что эта полоса принадлежит флавином. Однако флуориметрические данные опровергают такое предположение. Общее содержание флавопротеинов в прото-МХ, судя по интенсивности флавиновой флуоресценции (с максимумом при 525 нм), наоборот, заметно (на ~30%) выше, чем в МХ (рис. 3). Это несколько неожиданный результат, если считать, что при созревании прото-МХ до МХ количество флавопротеинов должно возрастать, чтобы обеспечить быстрое функционирование дыхательной цепи. Полученный результат отличается от наших данных по флавином в работе [13], где выделение и инкубацию прото-МХ и МХ проводили без ЭДТА, что вело к повышению проницаемости мембран и, как следст-

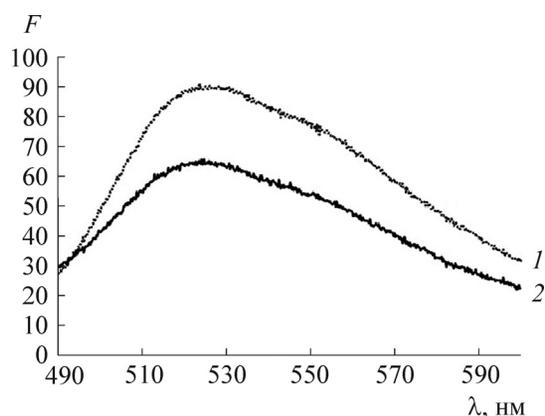


Рис. 3. Спектры флавиновой флуоресценции (при возбуждении 450 нм) прото-МХ размером < 0,45 мкм (1) и МХ размером < 3 мкм (2) после их разрушения детергентом (1% додецилсульфата натрия).

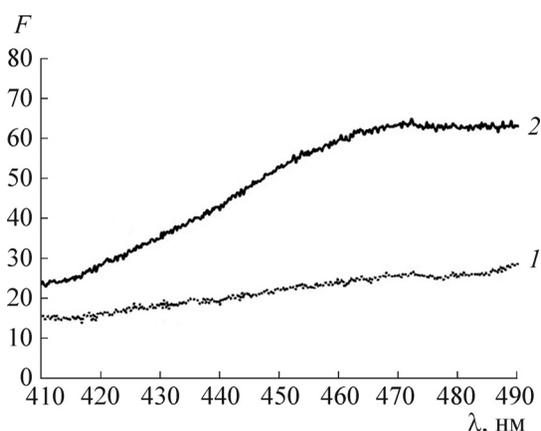


Рис. 4. Спектры липофусциновой флуоресценции (при возбуждении 360 нм) прото-МХ размером < 0,45 мкм (1) и МХ размером < 3 мкм (2) мкм после их разрушения детергентом (1% додецилсульфата натрия). При 490 нм виден вклад от полосы флавиновой флуоресценции.

вие, к спонтанной утрате флавиномононуклеотида, выходящего из мембранной НАДН-дегидрогеназы во внешний раствор в ходе фракционирования прото-МХ. Нужно отметить, что в печеночных МХ содержится несколько флавинаденидинуклеотидсодержащих флавопротеинов, не имеющих прямого отношения к дыхательной цепи [14]. Можно предположить, что в прото-МХ они отсутствуют и поэтому не дают полосы поглощения при 450 нм.

Оказалось, что прото-МХ, в отличие от МХ, практически не содержат «пигмента старения» липофусцина: в спектре флуоресценции прото-МХ нет интенсивной «голубой» полосы в районе 460 нм (рис. 4). Этот важный факт означает, что прото-МХ действительно явля-

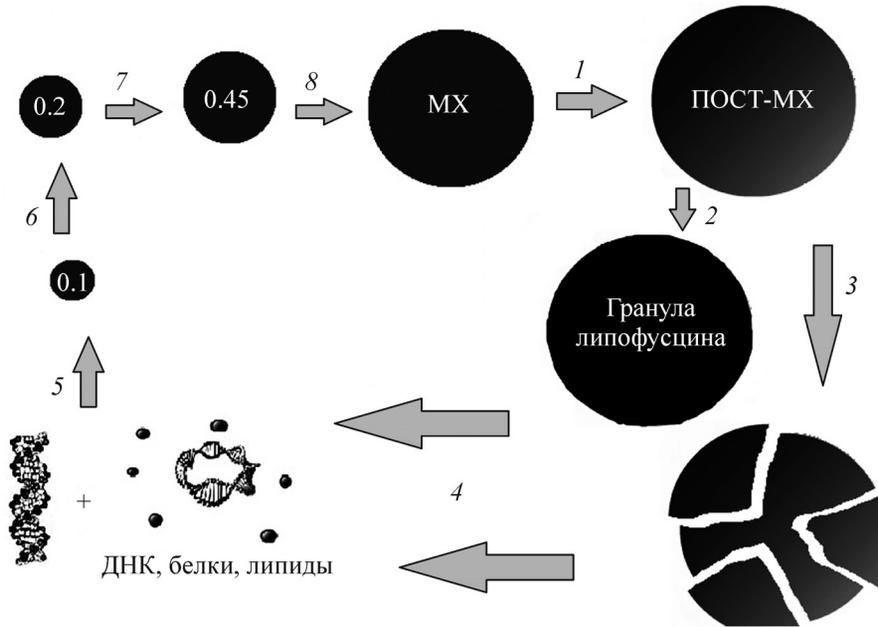


Рис. 5. Схема жизненного цикла митохондриальных органелл в специализированных клетках животных: 1 – деградация пост-МХ; 2 – трансформация пост-МХ в липофусциновые гранулы или 3 – лизис пост-МХ протеазами и лизосомами; 4 – выход ДНК (возможно, в комплексе с белками) в цитоплазму; 5 – зарождение 0,1-микронной прото-МХ (с участием ядерной ДНК в синтезе белков для прото-МХ); 6 – появление двух мембран; 7 – рост прото-МХ и развитие до МХ, 8 – старение МХ до пост-МХ.

ются молодыми органеллами, в которых, в отличие от МХ, еще не образовались шиффовы основания за счет перекисного окисления липидов и межбелковых сшивок. Полученный результат согласуется в данными работы [6], где была описана сильная липофусциновая флуоресценция пост-МХ. Нами было показано [15], что липофусцин образуется в стареющих МХ без участия лизосом, причем возникновение липофусцина можно активировать умеренным нагревом. Необходимо отметить, что полоса при 460 нм в МХ не принадлежит НАДН или НАДФН, так как МХ были исходно проинкубированы до полного окисления эндогенных субстратов (см. работу [15]).

На основании вышеизложенных фактов, дополняющих полученные ранее результаты, мы утверждаем, что при созревании молодой прото-МХ до зрелой МХ происходит не просто рост органеллы, но имеет место заметное увеличение количества фермента АТФ-синтетазы и уменьшение количества флавопротеинов. При этом постепенно начинает образовываться липофусцин, т.е. зрелая МХ начинает понемногу стареть.

Можно предложить схему (рис. 5) жизненного цикла МХ. Мелкие зародышевые прото-МХ размером 0,1 мкм возникают в клетке за счет ДНК, выходящей из пост-МХ или гидролизованных МХ в цитоплазму. Для синтеза

белков для прото-МХ подключается также ядерная ДНК. Что является сигналом для активации нужных генов ядерной ДНК, пока неизвестно. Поврежденная, окисленная или мутировавшая МХ-ДНК, не способная формировать прото-МХ, подвергается в цитоплазме расщеплению ДНКазами и нуклеазами. В процессе жизненного цикла клетки происходит развитие прото-МХ во взрослые МХ, затем – старение до пост-МХ с накоплением больших количеств липофусцина, вплоть до образования липофусциновых гранул. Если протеазы и лизосомы достаточно активны, то происходит лизис старых МХ с выходом ДНК из них в цитоплазму клетки.

Выражаем благодарность аспирантам ИБК РАН А.В. Чаплыгиной и А.М. Львову за помощь в работе, а фирме BRL (Тайвань) – за финансовую поддержку исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. R. Friedman and J. Nunnari, *Nature* **505**, 335 (2014).
2. J. Bereiter-Hahn and M. Voth, *Miscoscopy Research Technique* **27**, 198 (1994).
3. K. J. De Vos, V. J. Allan, A. J. Grierson, and M. P. Sheetz, *Curr. Biol.* **15** (7), 678 (2005).
4. N. C. Mishra and S. Kumar, *Indian J. Exp. Biol.* **43**, 25 (2005).

5. D. J. Granville and R. A. Gottlieb, *Scientific World J.* **2**, 1569 (2002).
6. А. Г. Белякович, *Изучение митохондрий и бактерий с помощью соли тетразолия n-НТФ* (ОНТИ НЦБИ, Пушино, 1990).
7. Д. А. Шишмаков, Р. Л. Анисимов и Н. Л. Векшин, *Биол. мембраны* **21** (5), 389 (2004).
8. А. Н. Зинина и Н. Л. Векшин, *Биол. мембраны* **25** (6), 480 (2008).
9. Н. Л. Векшин, *Биол. мембраны* **27** (5), 424 (2010).
10. Н. Л. Векшин, *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров* (Фотон-век, Пушино, 2008).
11. K. A. Howell, A. N. Millar, and J. Whelan, *Plant Mol. Biol.* **60**, 201 (2006).
12. Н. Л. Векшин, *Биол. науки* **4**, 107 (1988).
13. Е. А. Бегунова и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **60** (6), 1109 (2015).
14. А. Ленинджер, *Биохимия* (Мир, М., 1976).
15. М. С. Фролова, А. М. Сурич, А. В. Браславский и Н. Л. Векшин, *Биофизика* **60** (5), 1125 (2015).

A Number of Properties of Protomitochondria from Rat Liver

K.E. Krekhova and N.L. Vekshin

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

A number of properties of isolated protomitochondria – small young organelles of animal cells – have been studied. Protomitochondria were obtained by filtering the rat liver mitochondria light fraction through calibrated millipore filters with a 0.45 μm pore size. Protomitochondria is shown to possess low ability to synthesize ATP because the ATP-synthetase content is smaller than in mitochondria. The number of cytochromes in such protomitochondria and mitochondria is almost the same. It is found that these protomitochondria have more flavoproteins than mitochondria. It is demonstrated that protomitochondria, in contrast to mitochondria, contain very little lipofuscin (an age pigment). These differences reflect the processes of intracellular maturation of protomitochondria to mitochondria and subsequent aging to post-mitochondria. The results obtained are important for understanding the role of protomitochondria in cellular metabolism of specialized animal cells.

Keywords: mitochondriogenesis, protomitochondria, mitochondria, postmitochondria, ATPase, flavoproteins, cytochromes, respiratory chain, lipofuscin