ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 577.32, 577.352.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСПОЛОЖЕНИЯ ДЕГИДРОГЕНАЗНЫХ КОМПЛЕКСОВ В МАТРИКСЕ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ КРИОГЕННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ ТОМОГРАФИИ

© 2021 г. К.С. Плохих^{1,*}, Ю.М. Чесноков¹, С.В. Нестеров^{1,2}, Р.А. Камышинский¹, Л.С. Ягужинский^{2,3,4}, Р.Г. Василов¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия ² Московский физико-технический институт, Долгопрудный

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

⁴ Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва * E-mail: konstantin.plokhikh@phystech.edu

В данной работе исследуется локализация пируватдегидрогеназных комплексов (ПДК) и *а*-кетоглутаратдегидрогеназных комплексов (КГДК) внутри матрикса митохондрий клеток сердца крысы методом криогенной электронной томографии. Такой подход позволил исследовать данные ферменты в своем естественном окружении. На восстановленных томограммах частично разрушенных митохондрий удалось визуализировать ПДК и КГДК, расположенные вблизи внутренней мембраны митохондрий. По результатам субтомографического усреднения получены трехмерные реконструкции ПДК и КГДК, с разрешением 31 Å и 46 Å соответственно. Полученные данные указывают на специфичность локализации ПДК и КГДК в окрестности комплексов дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий.

введение

Настоящая работа входит в цикл работ, посвященных изучению структуры полиферментных систем, в частности системы клеточного дыхания. Задачей работы являлось исследование окружения внутренней мембраны митохондрий с помощью криогенной электронной томографии. В качестве объекта были рассмотрены митохондрии, выделенные из желудочков сердца крысы. Ранее они уже использовались авторами работы в других исследованиях [1, 2].

Поскольку состав матрикса митохондрий очень обширен, в первую очередь внимание было обращено на достаточно большие комплексы, в частности, на ПДК. Давно известно, что этот глобулярный комплекс находится в матриксе митохондрий [3] и катализирует реакцию окислительного декарбоксилирования пирувата – процесса, который предшествует циклу трикарбоновых кислот в основном пути синтеза АТФ. В результате функционирования ПДК образуется ацетил-кофермент А, используемый в цикле Кребса для образования цитрата, а также восстанавливается NAD+ до NADH, который является субстратом комплекса I дыхательной цепи митохондрий. ПДК достаточно хорошо изучен [4], он состоит из трех ферментов, представленных в нем в большом количестве копий. У млекопитающих жесткое ядро составляют 60 копий фермента пируватдегидрогеназы (Е,), упорядоченные в додекаэдр диаметром примерно 25 нм. Общий диаметр комплекса с учетом периферических нековалентно связанных ферментов (Е, Е, составляет примерно 50 нм. В процессе работы привлекли внимание также КГДК – похожие по структуре и размеру на ПДК [4]. Основное структурное отличие – кубическое ядро, состоящее из 24 копий α-кетоглутаратдегидрогеназы. КГДК осуществляет окислительное декарбоксилирование альфа-кетаглутаровой кислоты с образованием NADH и сукцинил-кофермента А, который далее в цикле Кребса превращается в сукцинат – субстрат комплекса II дыхательной цепи. Таким образом, работа ПДК и КГДК тесно сопряжена с работой дыхательной цепи митохондрий – они являются для нее ключевыми производителями субстратов.

Хотя на данный момент существуют трехмерные модели данных комплексов с высоким разрешением, полученные in vitro [5, 6, 7], их пространственное расположение в матриксе митохондрий практически не изучалось. Исследование структурных контактов сопряженных метаболических систем может позволить найти ранее неизвестные механизмы развития патологических процессов. Так, например, изменения во взаимном расположении ферментных комплексов в митохондриях могут быть важной частью процессов, обеспечивающих метаболический сдвиг в сторону анаэробного пути утилизации глюкозы, который происходит при ишемии, старении [8] и онкогенезе [9]. Кластеризация ферментов одного метаболического пути в так называемые метаболоны, внутри которых происходит прямая передача промежуточных метаболитов от одного активного центра к другому, позволяет значительно повысить их скорость и эффективность, а также устойчивость к неблагоприятным внешним факторам. В то время как ПДК и КДГК сами по себе являются метаболонами, их структурное взаимодействие с сопряженными метаболическими системами неизвестно. Современные подходы криогенной электронной микроскопии, в частности метод криогенной электронной томографии, позволяют восполнить этот пробел и исследовать макромолекулярную организацию белковых комплексов в живых системах.

МЕТОДЫ

Митохондрии для исследований были выделены из самок крыс линии Wistar по стандартной процедуре [2]. В эксперименте использовалась суспензия митохондрий с концентрацией около 0.3 мг/мл. За 10 минут до витрификации был запущен процесс окислительного фосфорилирования.

Митохондрии были смешаны с раствором наночастиц золота (10 nm Colloidal Gold Labeled Protein A, UMC Utrecht, Нидерланды) в соотношении 20:1. 3 мкл образца было нанесено на сетку с углеродом, содержащим отверстия, предварительно обработанную в тлеющем разряде с помощью PELCO easiGlow (Ted Pella, США) в течение 30 с при токе 25 мА для придания поверхности гидрофильных свойств. Витрификания осуществлялась при помощи Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 4°C и относительной влажности 95–100% внутри камеры прибора. Далее сетка подвергалась одновременному двустороннему промакиванию фильтровальной бумагой в течение 2.5 с для удаления излишков раствора с образцом и получения льда оптимальной толщины и немедленно погружалась в жидкий этан при температуре жидкого азота для фиксации в тонком слое аморфного льда.

Исследования проводились с помощью криогенного электронного микроскопа Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США) при ускоряющем напряжении 300 кВ. С использованием программного обеспечения Tomography 4 (Thermo Fisher Scientific, США) было собрано 11 томографических серий, состоящих из 61 изображения, полученных при наклоне образца от -60° до 60° с шагом в 2°. Увеличение составляло 18000, а дефокусировка варьировалась от -6 до -8 мкм. Суммарная доза облучения образца не превышала 120 *e*⁻/Å².

Полученные серии изображений были восстановлены с использованием программного обеспечения IMOD [10]. Добавленные в раствор образца наночастицы золота были использованы для выравнивания угловых серий. Процедура томографического восстановления трехмерной структуры производилась методом одновременной итерационной реконструкции (Simultaneous Iterative Reconstruction Technique, SIRT) и методом обратно взвешенных проекций (Weighted Back Projection, WBP). В дальнейшем томограммы, полученные методом SIRT, использовались для определения положения частиц на них, а томограммы, полученные методом WBP, – для субтомографического усреднения.

На томограммах, полученных методом SIRT, с помощью программного пакета IMOD в ручном режиме были отобраны 2 типа частиц, соответствующих различным дегидрогеназным комплексам, и определены координаты 48 частиц ПДК и 24 частицы КГДК. Далее производилась экстракция субтомограмм из томограмм, полученных методом WBP, содержащих интересующие комплексы с помощью программного пакета RELION2 [11, 12] с последующими оценкой функции передачи контраста при помощи CTFFIND4 [13]. В RELION2 было проведено субтомографическое усреднение – итерационный алгоритм, включающий в себя выравнивание частиц друг относительно друга с последующим усреднением. Первоначальное усреднение производилось без применения априорных знаний о симметрии комплексов. После подтверждения наличия симметрии у полученных реконструкций, было произведено субтомографическое усреднение с икосаэдрической симметрией для ПДК и с октаэдрической – для КГДК. Для визуализации полученных трехмерных моделей был использован программный пакет UCSF Chimera [14]. Для ПДК пространственное разрешение трехмерной реконструкции с соответствующей симметрией составило 31 Å, а для КГДК – 46 Å. Оценка разрешения производилась по критерию объемной корреляции фурье с пороговым значением 0.143 (Fourier Shell Correlation).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные криогенной электронной томографии позволили визуализировать фрагменты частично разрушенных митохондрий сердца в тонком слое аморфного льда. Разрушение митохондрий происходило из-за эффектов поверхностного натяжения во время нанесения суспензии на сетку. На реконструкциях можно заметить шарообразные комплексы ПДК и КГДК, располагающиеся вблизи мембраны, а также в свободном виде в объеме матрикса. Пример среза томограммы с обозначенны-



Рис. 1. Фрагмент среза томограммы, реконструированной методом SIRT. Длина масштабного отрезка – 50 нм. Зеленым обведены ПДК, синим – КГДК



Рис. 2. Центральный срез трехмерной реконструкции ПДК, полученной с помощью субтомографического усреднения с икосаэдрической симметрией. Длина масштабного отрезка – 10 нм



Рис. 3. Центральный срез трехмерной реконструкции КГДК, полученной с помощью субтомографического усреднения с октаэдрической симметрией. Длина масштабного отрезка – 10 нм

ми на нем дегидрогеназными комплексами представлен на рис. 1.

На рис. 2 показан центральный срез трехмерной реконструкции ПДК с разрешением 31 Å, полученной с помощью субтомографического усреднения с использованием икосаэдрической симметрии, а на рис. 3 – КГДК (разрешение 46 Å) с использованием октаэдрической симметрии. Относительно низкое пространственное разрешение объясняется малым количеством частиц, по несколько десятков каждого типа, а также подвижностью внешних оболочек комплексов – известно, что ПДК и КГДК содержат неупорядоченные связующие фрагменты, обеспечивающие подвижность внешних субъединиц относительно ядра и друг друга. Полученные данные не позволили установить точный механизм взаимодействия дегидрогеназ с мембраной. Тем не менее, полученное разрешение оказалось достаточным, чтобы достоверно отличить ПДК и КГДК от других белков, разлить между собой и определить их пространственное расположение. Продолжение исследований, в том числе увеличение статистической выборки и проведение субтомографического усреднения без применения операции симметрии, позволит в дальнейшем получить трехмерные модели более высокого разрешения и выяснить механизм взаимодействия комплексов и функциональное значение примембранной локализации дегидрогеназ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено исследование локализации ПДК и КГДК внутри матрикса митохондрий. На полученных томограммах заметно их преимущественное расположение вблизи внутренней

19

мембраны митохондрий (рис. 1), где локализованы белки дыхательной цепи [2] – другой метаболической системы митохондрий, которая для своей работы использует производимые ПДК и КГДК метаболиты. Полученные результаты указывают на возможность структурного взаимодействия между разными метаболическими кластерами митохондрий и показывают перспективность продолжения исследований в области локализации ферментных комплексов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (Грант №19-04-00835) и НИЦ «Курчатовский институт» в рамках тематического плана «Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нестеров С.В. и др. Определение расположения и структуры атф-синтетазы в мембранах митохондрий сердца крыс с помощью крио-электронной томографии // Российские нанотехнологии. 2020, т. 15, №1, с. 93–100.

2. Nesterov S. et al. Ordered clusters of the complete oxidative phosphorylation system in cardiac mitochondria // International journal of molecular sciences. 2021, m. 22, N_{23} , c. 1462.

3. Schnaitman C., Greenawalt J.W. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria // The Journal of cell biology. 1968, m. 38, №1, c. 158–175.

4. Reed L.J. A trail of research from lipoic acid to α-keto acid dehydrogenase complexes // Journal of Biological Chemistry. 2001, m. 276, №42, c. 38329–38336.

5. Yu X. et al. Structures of the human pyruvate dehydrogenase complex cores: a highly conserved catalytic center with flexible N-terminal domains // Structure. 2008, m. 16, N (c. 104–114.

6. Murphy G.E., Jensen G.J. Electron cryotomography of the E. coli pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes // Structure. 2005, m. 13, №12, c. 1765–1773.

7. Zhou Z.H. et al. The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001, m. 98, №26, c. 14802–14807.

8. Ravera S. et al. Discrete changes in glucose metabolism define aging // Scientific reports. 2019, m. 9, №1, c. 1–8.

9. Кобляков В.А. Гипоксия и гликолиз как факторы, определяющие злокачественный фенотип // Цитология. 2016, т. 58, №7, с. 499–506.

10. Kremer J.R., Mastronarde D.N., McIntosh J.R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD // Journal of structural biology. 1996, m. 116, N_{21} , c. 71–76.

11. Scheres S.H.W. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination // Journal of structural biology. 2012, m. 180, N_{23} , c. 519–530.

12. Bharat T.A.M., Scheres S.H.W. Resolving macromolecular structures from electron cryo-tomography data using subtomogram averaging in RELION //Nature protocols. 2016, m. 11, $N \ge 11$, c. 2054–2065.

13. Rohou A., Grigorieff N. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs //Journal of structural biology. 2015, m. 192, №2, c. 216–221.

14. Pettersen E.F. et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis // Journal of computational chemistry. 2004, m. 25, №13, c. 1605–1612.