

## САФАРИ С ЭЛЕКТРОННОЙ ПУШКОЙ: ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКОВ И МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ В ЕСТЕСТВЕННОЙ СРЕДЕ

© 2024 С.В. Нестеров<sup>1\*</sup>, К.С. Плохих<sup>1</sup>, Ю.М. Чесноков<sup>1</sup>, Д.А. Мустафин<sup>1</sup>,  
Т.Н. Голева<sup>1</sup>, А.Г. Рогов<sup>1</sup>, Р.Г. Васильев<sup>1</sup>, Л.С. Ягужинский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт»,  
123182 Москва, Россия; электронная почта: semen.v.nesterov@phystech.edu

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.09.2023

После доработки 06.02.2024

Принята к публикации 07.02.2024

В работе приводятся новые данные по структурным исследованиям митохондрий с помощью корреляционной свето-электронной микроскопии и криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) – современных методов структурной биологии, позволяющих исследовать биологические объекты в нанометровых масштабах с минимальным вмешательством в естественные условия. Такая неинвазивность позволяет сравнивать эти методы с наблюдением за животными во время сафари. В работе приведены два направления исследований, которые можно осуществить только этими методами. В частности, визуализировано расположение агрегатов амилоида Аβ42 по отношению к митохондриям, и тем самым проверена одна из гипотез развития митохондриальной дисфункции при болезни Альцгеймера. Показано, что агрегаты Аβ42 не взаимодействуют с митохондриями, хотя некоторая часть из них и имеет близкую локализацию. Таким образом, показано, что митохондриальная дисфункция не связана с прямым влиянием агрегатов на структуру митохондрий, а её истоки нужно искать в других процессах. Вторым уникальным направлением, представленным в работе, является визуализация мембран митохондрий и белков в них с высоким разрешением. Анализ данных крио-ЭТ, проведённый в работе, показал наличие в ламеллярных структурах крист митохондрий сердца тороидальных отверстий, в которых располагаются АТР-синтазы. Также был предложен новый механизм сортировки и кластеризации белковых комплексов в мембране на основе топологии. Согласно этому механизму, место белков системы окислительного фосфорилирования в мембране определяется её кривизной. Таким образом, томография высокого разрешения расширяет и дополняет имеющиеся представления о структурно-функциональной организации митохондрий, позволяя исследовать ранее недоступные структурные связи белков между собой и с мембранами в естественных условиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** мембрана, митохондрии, окислительное фосфорилирование, криоэлектронная микроскопия, суперкомплекс, АТР-синтаза, респирасома, Аβ42, амилоидные агрегаты.

DOI: 10.31857/S0320972524020064 EDN: XMXELF

*Работа посвящена памяти академика В.П. Скулачёва*

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы существенный прорыв в структурной биологии был обусловлен повышением доступности и комплексным совершен-

ствованием методов криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), произошедшим как в аппаратной части, связанной с улучшением качества детекторов и устранением шумов и аберраций, так и в области программного обеспечения для автома-

Принятые сокращения: ОКСФОС – окислительное фосфорилирование; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ЭТ – криоэлектронная томография; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; СЛЕМ – корреляционная свето-электронная микроскопия.

\* Адресат для корреспонденции.

тической классификации и обработки изображений [1–3]. Большое число работ по теме микроскопии посвящено исследованию выделенных белков с высоким разрешением, но в данной работе мы сосредоточимся на более узкой теме – исследовании макромолекулярной организации ферментных систем в митохондриальных мембранах в целых митохондриях без выделения из них белков. Также будут показаны возможности корреляционной свето-электронной микроскопии (CLEM) [4], которая в сочетании с генетической инженерией позволяет визуализировать с разрешением в несколько нанометров взаимодействие между любыми белками интереса, а также между белками и мембранами. По своей разрешающей способности CLEM превосходит любые чисто световые методики, в том числе микроскопию с супер-разрешением, такую как STED-микроскопия [5], позволяющую визуализировать мембраны, но не отдельные белки в них [6]. Будут представлены собственные новые результаты, выполнен глубокий анализ ряда полученных в наших предыдущих работах томографических данных, а также проведено обсуждение литературы, посвящённой «фотоэлектронной охоте» на белки митохондрий в «диких» природных условиях их обитания в белково-липидных мембранах.

Несмотря на значительное количество структурных данных о белках митохондрий, данные об их нативной организации в мембране и матриксе весьма ограничены, что затрудняет формирование цельной модели работы этих органелл. В последнее время, во многом благодаря крио-ЭМ, этот пробел начал восполняться – в том числе, например, удалось установить, что в митохондриях млекопитающих АТФ-синтазы находятся на сгибах складок внутренней мембраны (крист), а компоненты дыхательной цепи – в менее искривлённых частях мембраны. Также появилось достаточно много информации о структурном взаимодействии комплексов дыхательной цепи (респирасом). При этом, однако, многие вопросы остаются открытыми. Так, например, стандартными лабораторными методами выделения респирасом с мягким детергентом нельзя получить достоверную информацию о том, какой процент дыхательных комплексов образует респирасомы, так как часть из них все же распадается в процессе выделения, а часть может не экстрагироваться из мембраны. В то же время подробный анализ томограмм крио-ЭМ позволяет решить эту задачу – так, например, нам удалось показать, что в сердце крысы все комплексы I и III входят в состав респирасом [7]. Данные многих научных групп показывают, что перенос протона между протонными помпами и АТФ-синтазой происходит не за счёт электрохимического градиента между объёмами матрикса и межмембранного

пространства, а локализовано – латерально вдоль поверхности мембраны на небольшие расстояния. Благодаря детальному исследованию структуры мембран митохондрий и белков в них можно получить уникальную информацию, необходимую для проверки имеющихся гипотез и моделирования процессов передачи протонов в системе окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) [8]. Остаются неизвестными и многие структурные аспекты взаимодействия митохондрий с другими органеллами или различными агрегатами. Даже такой крайне актуальный, в связи с высоким распространением болезни Альцгеймера, вопрос, как наличие или отсутствие взаимодействия агрегатов амилоида с мембраной митохондрий, всё ещё не имеет ответа, так как колокализация флуоресцентных меток не даёт достаточного разрешения для однозначных заключений. В настоящей работе благодаря CLEM нам удалось ответить в том числе и на этот вопрос.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование дрожжевых клеток.** В работе использовали дрожжи *Yarrowia lipolytica* Po1f, экспрессирующие конструкцию eGFP-Аβ42 [9]. Клетки выращивали в 250-мл колбах Эрленмейера при 28 °С на роторной качалке (220 об./мин) в 50 мл полусинтетической среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии 1,3%-ный сукцинат. Клетки собирали в ранней экспоненциальной фазе роста ( $ОП_{600} = 1,0$ ).

**Подготовка образца для крио-ЭМ.** Клетки отмывали от среды выращивания в 50 мМ фосфатном буфере (рН = 5,5) и инкубировали с 500 нМ MitoTracker Red CMXRos («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 30 мин. Затем клетки отмывали от красителя и концентрировали до  $ОП_{600} = 25$ . Перед нанесением на сетку для крио-ЭМ в суспензию вводили 5% глицерина, чтобы снизить количество кристаллов льда [10]. Электронно-микроскопические сетки («Ted Pella», США) предварительно подвергались процедуре гидрофилизации с помощью установки easiGlow («Pelco», США) при значении силы тока 25 мА и давлении 0,26 мБар в течение 30 с. Суспензию клеток объёмом 5 мкл наносили на сетку для микроскопии. Сетки с исследуемыми объектами подвергались двустороннему промакиванию фильтровальной бумагой и быстрой заморозке в сжиженном этане, охлаждённом до температуры жидкого азота. В процессе нанесения образца на сетку температура в камере системы Vitrobot («Thermo Fisher Scientific») составляла 4 °С, влажность – не менее 95%. В случае использования гомогената сердечной ткани или выделенных митохондрий сердца крыс

проводилась аналогичная процедура подготовки сеток, но без использования глицерина, описанная в ранее опубликованных работах [7, 11]. Кратко, 3 мкл гомогенизированной ткани сердца крысы линии Wistar или выделенных митохондрий сердца (дифференциальным центрифугированием без детергентов и протеаз, как описано ранее [12]), наносили на сетку для микроскопии и витрифицировали с помощью системы Vitrobot.

**Флуоресцентная микроскопия.** Витрифицированные образцы дрожжей в шаттле с жидким азотом помещали в криогенную камеру флуоресцентного микроскопа THUNDER Imager EM Cryo CLEM («Leica», Германия), оснащённого объективом HC PL APO 50×/0,90 CRYO CLEM («Leica»). Флуоресценцию eGFP-Аβ42 и MitoTracker Red выявляли с помощью соответствующих фильтров, и оценивали колокализацию агрегатов eGFP-Аβ42 и митохондрий. 3D-Реконструкцию клеток дрожжей с последующей деконволюцией изображений проводили по алгоритму «Leica Thunder» силами встроенного программного обеспечения [13]. Снимки всей сетки позволяли получить своего рода «карту» для ориентации при травлении ламелей. По полученным снимкам всей сетки выбирали области интереса.

**Получение ламелей сфокусированным ионным пучком (ФИП).** Микроскопические сетки с витрифицированным образцом переносили в растровый электронно-ионный микроскоп Versa 3D («Thermo Fisher Scientific»), оборудованный криодержателем и системой загрузки образцов при температуре жидкого азота Quorum 3100P («Quorum Technologies», Канада). С помощью газовой-инжекционной системы напыляли защитный слой платины на поверхность всей сетки, что позволяло снизить накопление заряда и защитить поверхность от радиационных повреждений в процессе эксперимента. Учитывая морфологию поверхности и полученные карты флуоресцентной микроскопии, выбирали области для приготовления тонких клеточных срезов с помощью крио-ФИП. Выбирали области ближе к центру сетки с клетками, лежащими в один слой. Ламели прорезали в данных квадратах с расчётом прохождения вдоль нескольких клеток, лежащих на достаточном расстоянии от металлического каркаса сетки. Для этого использовали ионы Ga<sup>+</sup> с энергией 30 кэВ и последовательное понижение тока от 1 нА до 30 пА для минимизации радиационных повреждений приповерхностного слоя. Данный подход позволяет получить срезы объекта толщиной 150–250 нм. Наклон плоскости среза по отношению к плоскости микроскопической сетки составлял 10–12°.

**Просвечивающая крио-ЭМ и криоэлектронная томография (крио-ЭТ).** Крио-ЭМ-исследования

проводили с помощью криогенного просвечивающего электронного микроскопа Titan Krios 60–300 («Thermo Fisher Scientific»), оснащённого системой прямого детектирования электронов Falcon II при ускоряющем напряжении 300 кВ. Для каждой микроскопической сетки отбирали участки для получения поворотных серий изображений. Каждый набор данных состоял из 56 изображений, полученных в результате наклона образца в диапазоне от –50 до 60 градусов с угловым шагом в 2°. Набор данных проводили в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения Tomography4 («Thermo Fisher Scientific») в режиме малых доз, что позволило минимизировать радиационные повреждения, сохраняя нативную структуру исследуемых объектов. Для набора томографических серий использовали увеличение 18 000× (размер пикселя – 0,37 нм; размер изображения – 1516 нм) со значением дефокусировки в диапазоне 5–8 мкм. Суммарное значение дозы электронов, прошедших через единицу площади образца, за всё время экспозиции не превышало ~120 е<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>.

**Обработка данных.** Для полученных данных применялась процедура томографического восстановления с использованием метода взвешенной обратной проекции (WBP, Weighted Back Projections) в программном пакете IMOD [14]. Выравнивание поворотных серий изображений клеток осуществляли с помощью вычисления кросс-корреляции между областями томографической серии (процедура «patch tracking» [15]), так как в образец невозможно внести наночастицы коллоидного золота. В случае исследования фрагментов выделенных митохондрий для получения более высокого разрешения использовались коллоидные наночастицы золота диаметром 10 нм [7, 16].

Для уменьшения шума и анизотропии разрешения в разных плоскостях полученных томограмм использовалась фильтрация в программе IsoNet [17]. Данный инструмент использует нейронную сеть типа U-net и обучается на небольших участках томограмм с добавлением дополнительного шума. Сегментация мембран митохондрий производилась в автоматическом режиме с использованием программы TomoSegMemTV [18]. Дефекты автоматической сегментации корректировали вручную на основе исходных данных томограммы.

Томограммы после фильтрации использовали для определения положения различных молекулярных комплексов в ручном режиме. Положения и ориентации различных макромолекул определялись также и в автоматическом режиме посредством использования трёхмерных шаблонов этих молекул в программе Dynamo [19] или WARP [20]. Для исключения ложно-выбранных координат проводилась последующая итерационная трёхмерная

классификация. Для увеличения соотношения сигнал/шум и пространственного разрешения [21] макромолекул использовалось усреднение выровненных друг относительно друга небольших участков томограммы (так называемых субтомограмм), содержащих отдельные макромолекулы [22]. Данный процесс называется субтомографическим усреднением и позволяет одновременно получить информацию об ориентации макромолекул, которая используется для последующей визуализации объекта путём вставки модели усреднённой структуры в нужной ориентации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Визуализация амилоидных агрегатов в клетках.** На основе данных флуоресцентной микроскопии ранее предполагалось, что агрегаты бета амилоида (A $\beta$ 42) могут взаимодействовать с мембранами митохондрий, за счёт чего нарушать биоэнергетику [9]. Для эксперимента была выбрана ранее использованная модель на основе дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica*, экспрессирующая конструкцию eGFP–A $\beta$ 42 [9]. Авторами было показано, что экспрессия A $\beta$ 42 или репортёрной генетической конструкции eGFP–A $\beta$ 42 приводила к дисфункции и фрагментации митохондрий дрожжей [9]. Выявленная в работе колокализация амилоидных агрегатов и митохондрий привела к гипотезе о прямом физическом контакте амилоидных агрегатов с мембраной митохондрий. Для проверки этого предположения была проведена работа по протоколу CLEM-микроскопии, завершающаяся крио-ЭТ выбранных областей интереса. Важно отметить, что крио-ЭТ для данной задачи является единственным подходящим методом исследования, поскольку при процедуре витрификации и дальнейшем микроскопическом исследовании практически не нарушается нативность образцов, что является важным параметром, ведь флуоресцирующие объекты находятся на небольшом расстоянии, и даже незначительное изменение их колокализации в случае применения стандартной методики фиксации и контрастирования образца для электронной микроскопии могло привести к появлению артефактов.

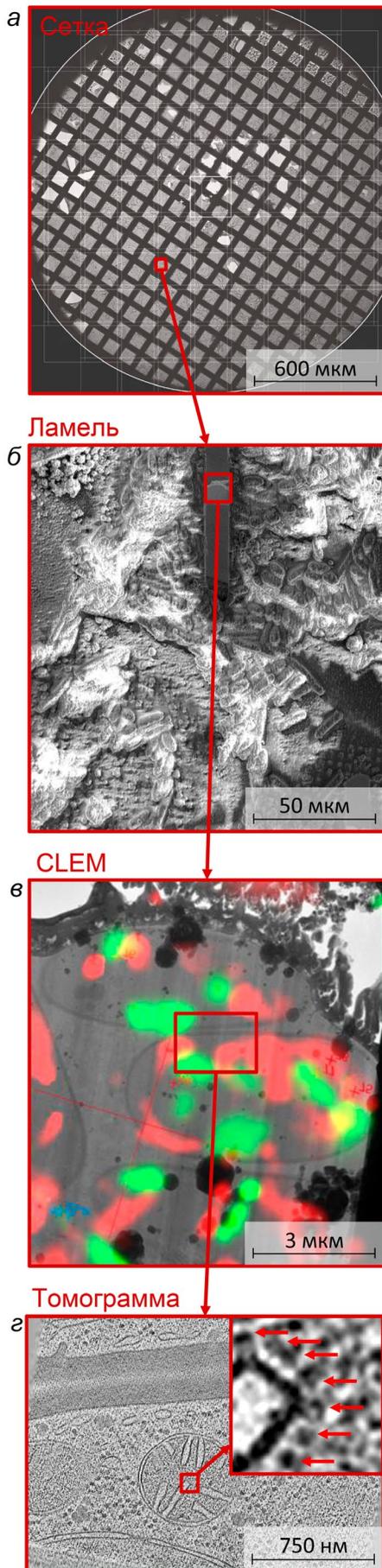
Протокол криогенной CLEM предполагал поиск методом флуоресцентной микроскопии в витрифицированном образце наиболее представительных полей зрения, где предполагалась колокализация митохондрий, окрашенных MitoTracker Red, и флуоресцирующих агрегатов eGFP–A $\beta$ 42. При выявлении области интереса проводилась съёмка z-стека изображений с реконструкцией трёхмерного расположения участков, содержащих митохондрии и агрегаты eGFP–A $\beta$ 42. На основании

этой информации проводилась настройка ФИП для получения ламели, содержащей интересующий участок, для которой были получены криоэлектронные томограммы. На рис. 1 изображены промежуточные результаты каждой стадии исследования.

В результате была получена серия подробных томограмм областей интереса, в которых накладывается как флуоресценция митохондрий (красный канал, MitoTracker Red), так и агрегаты амилоида (зелёный канал, eGFP–A $\beta$ 42). При этом разрешение криоэлектронных томограмм существенно превосходило разрешение флуоресцентного микроскопа и позволило различать как мембраны, так и отдельные белки в митохондриях, имеющие характерные особенности структуры, например, АТФ-синтазы (рис. 1, 2). Благодаря флуоресцентному сигналу eGFP удалось однозначно идентифицировать локализацию агрегатов амилоида, которые без флуоресцентной метки и использования CLEM нельзя было бы точно распознать. Показано, что агрегаты не взаимодействуют с мембраной митохондрий. Как видно из рис. 1, часть агрегатов вообще не локализуется рядом с митохондриями, что видно даже при флуоресцентной микроскопии. Что касается неоднозначных областей, где есть пересечение флуоресцентных сигналов, то были собраны статистические данные для нескольких десятков агрегатов в этих зонах (рис. 2) и показано, что подавляющее большинство агрегатов находилось на расстоянии 30–300 нм от поверхности мембраны митохондрий.

Среди наиболее близко расположенных агрегатов не найдено их физических контактов с мембраной митохондрий. Этот результат имеет большое значение для понимания механизмов развития болезни Альцгеймера, так как указывает на то, что нарушение биоэнергетики митохондрий, коррелирующее с накоплением агрегатов [23, 24], не вызвано прямым действием амилоидных агрегатов на структуру и функцию митохондрий, а опосредовано другими факторами.

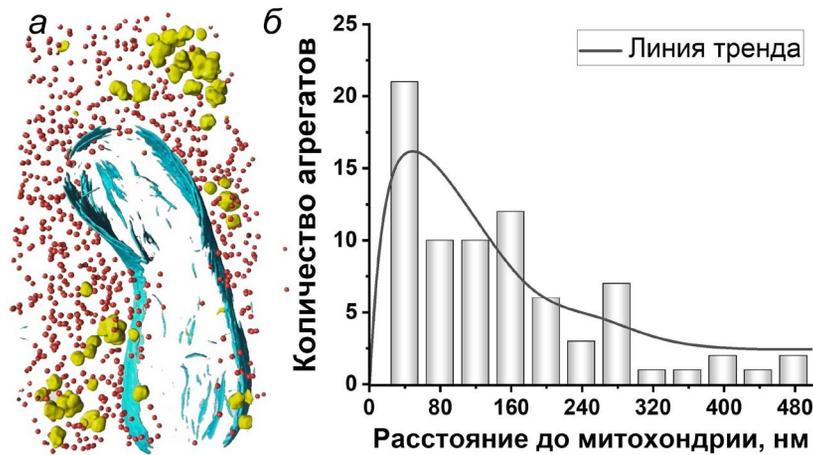
**Исследование топологии внутренней мембраны митохондрий и расположения белков системы ОКСФОС.** Метод крио-ЭМ одиночных частиц (single-particle cryo-EM), который основан на компьютерной классификации и усреднении огромных массивов изображений, полученных с помощью просвечивающей ЭМ, позволяет изучать структуры крупных белковых комплексов и суперкомплексов. Наличие или отсутствие суперкомплексов долгое время было дискуссионной темой в биоэнергетике, в то время как этот факт является крайне важным. Наличие суперкомплексов предполагает прямую передачу метаболитов в них с минимальным участием диффузии в этом процессе. Такая схема гораздо более устойчива



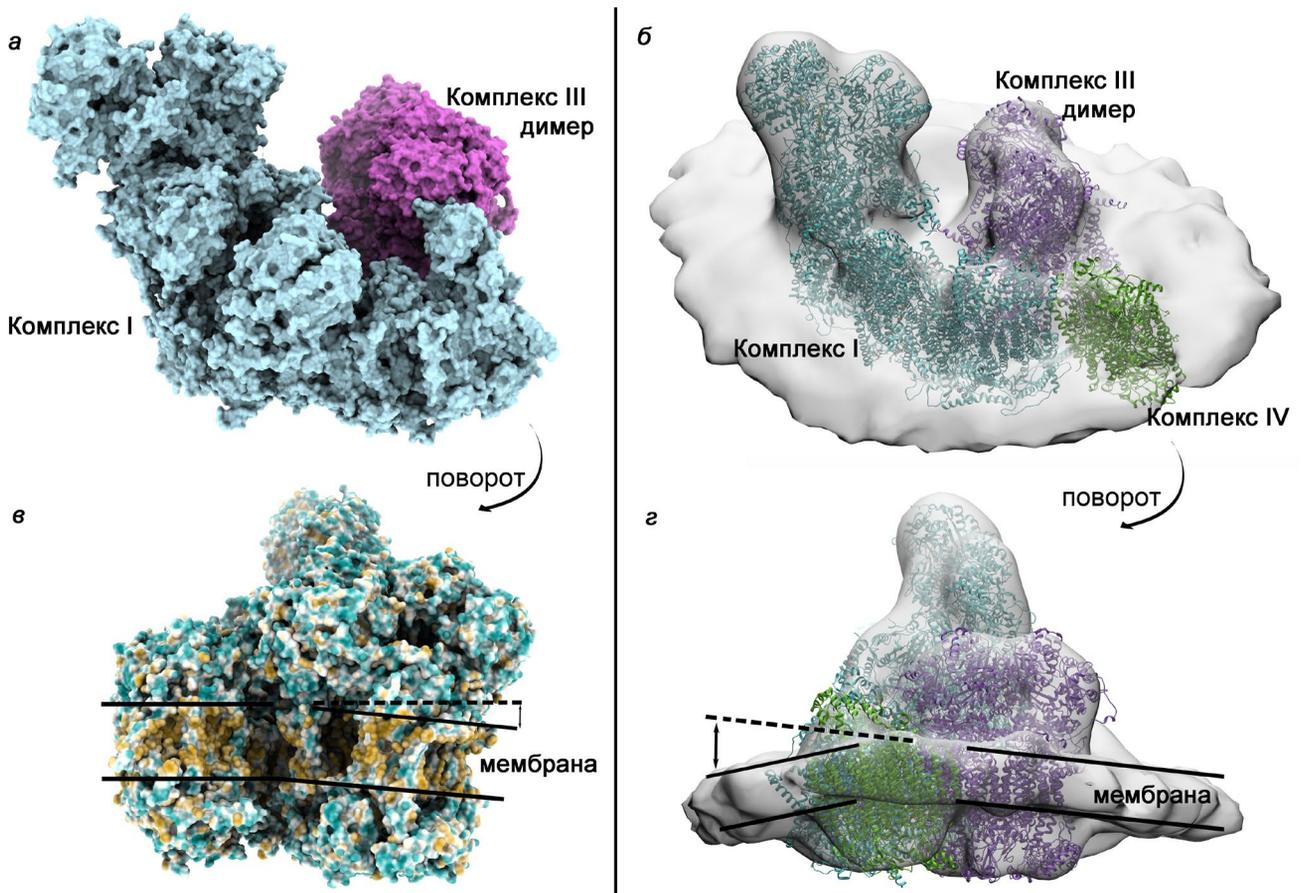
к стрессам, снижает утечку электронов и генерацию активных форм кислорода, что делает всю систему более энергоэффективной. Существование крупных суперкомплексов дыхательной цепи в митохондриях до использования крио-ЭМ удалось доказать наличием совместной миграции их компонент при нативном электрофорезе после экстракции белка из мембран мягкими детергентами [25]. В настоящее время благодаря крио-ЭМ одиночных частиц существование суперкомплексов дыхательной цепи – респирасом – уже не вызывает ни у кого сомнений, так как их структуры из разных организмов и тканей продемонстрированы в большом числе работ [26–33]. Тем не менее остаются дискуссионными более детальные вопросы, такие как точная конфигурация и состав суперкомплексов в тех или иных условиях, их функциональная, регуляторная и структурная значимость для биоэнергетики. В частности, не до конца ясны механизмы регуляции респирасом, наличие какого-либо их структурного взаимодействия с АТР-синтазами, а также роль мембраны в этих процессах. Для решения этих проблем мы провели анализ наших ранее полученных данных совместно с анализом новых литературных данных. На рис. 3 приведены эволюционно достаточно далёкие структуры респирасом из митохондрий растения *Arabidopsis* sp. и из митохондрий сердца крысы, которые на удивление оказались не только схожи по структуре, но и схожим образом искривляют мембрану, создавая её перегиб в месте контакта комплексов I и III.

Метод крио-ЭТ позволяет реконструировать целые области мембраны, определяя расположение в ней белков, имеющих характерные структурные особенности. Такими белками, например,

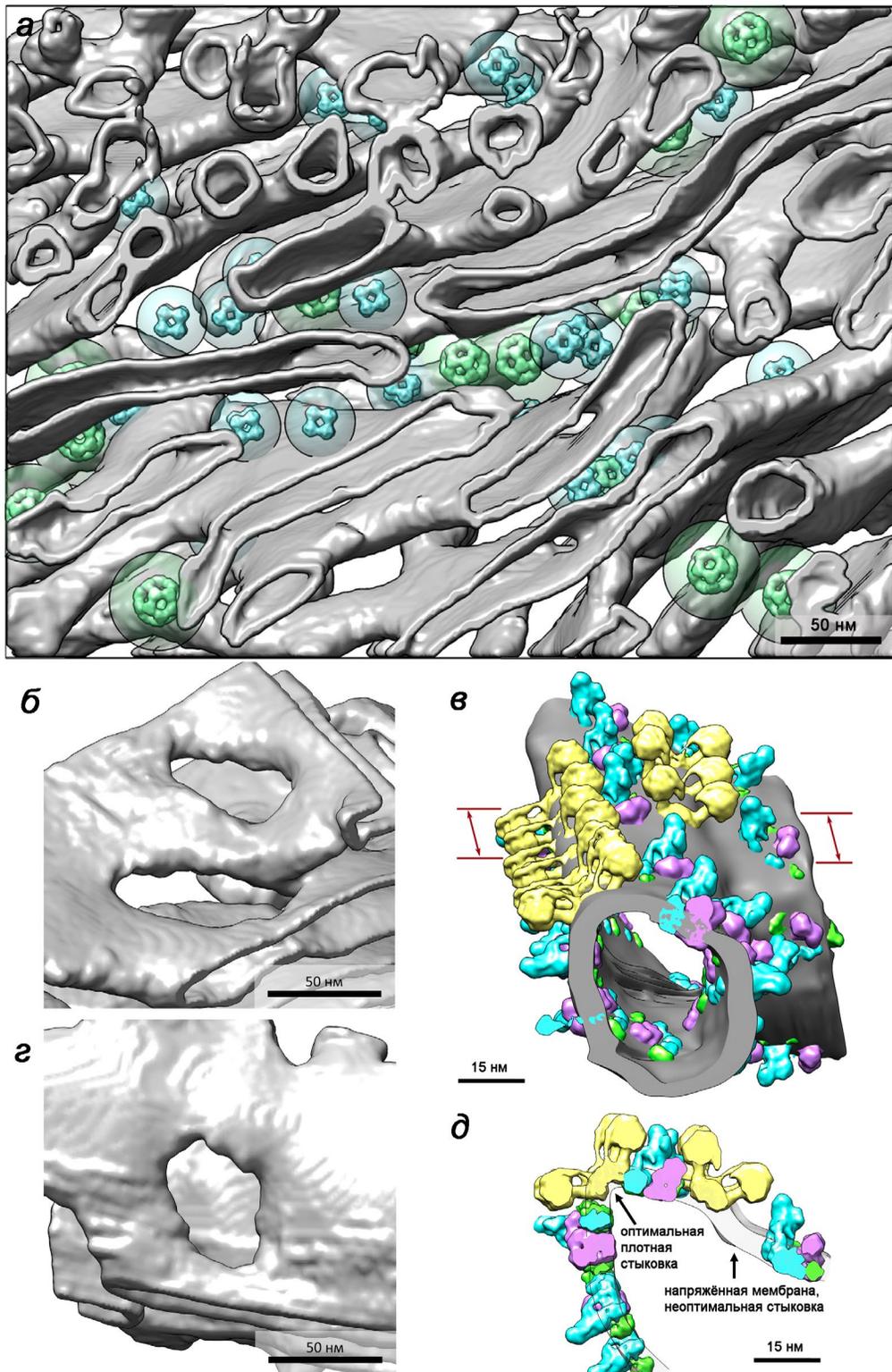
**Рис. 1.** Последовательность работы с образцом клеток при CLEM-микроскопии в сочетании с крио-ЭТ. *а* – Фотография сетки с витрифицированным образцом под просвечивающим световым микроскопом; *б* – увеличение выделенной на панели *а* области с напылённым слоем платины и вырезанной методом криогенного фокусированного ионного пучка областью, в которой оставлена тонкая ламель (выделена красной рамкой). Снимок с помощью растрового электронно-ионного микроскопа. *в* – Корреляционная свето-электронная микроскопия (CLEM) ламели. Наложение области флуоресцентной съёмки, соответствующей вытравленной ламели. Красная флуоресценция – Mitotracker Red (митохондриальный маркер); зелёная флуоресценция – eGFP (из конструкции eGFP- $\beta$ 42). *г* – Срез томограммы, построенной по области внутри ламели, на котором видны две митохондрии, а также другие компоненты клетки (клеточная стенка, рибосомы, агрегаты амилоида, различные везикулярные структуры); на вставке – увеличенный фрагмент кристы митохондрии, на котором красные стрелки указывают на  $F_1$ -субъединицы АТР-синтазы, выступающие из мембраны



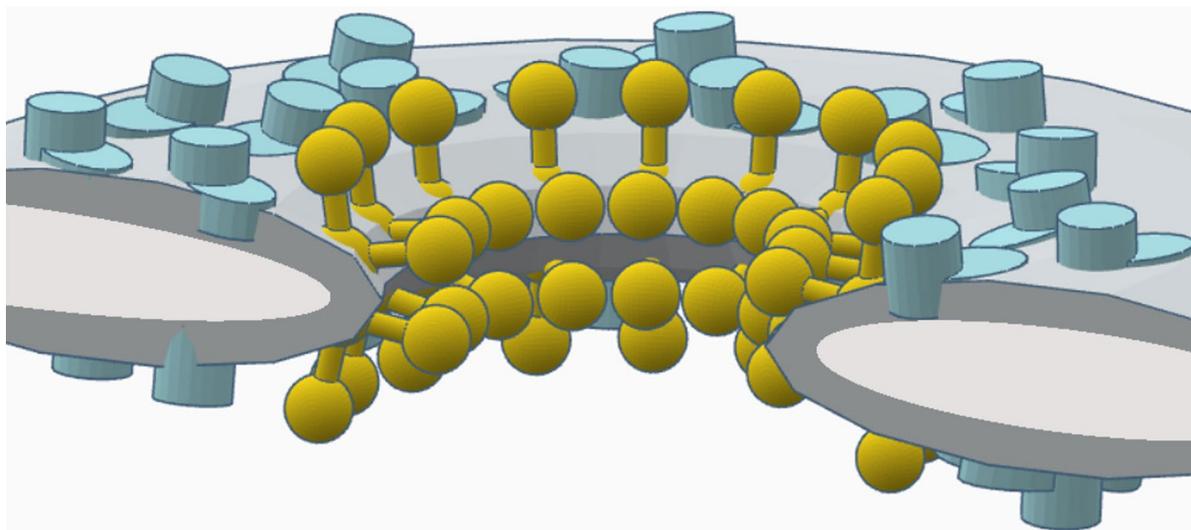
**Рис. 2.** Визуализация и оценка расстояний между агрегатами Аβ42 и внешней мембраной митохондрий на нескольких томограммах. *а* – Пример компьютерной реконструкции томограммы с автоматически размеченными митохондриальными мембранами (показано голубым), агрегатами амилоида (показано жёлтым) и рибосомами (показано красным). *б* – Распределение расстояний между агрегатами и внешней митохондриальной мембраной, собранное на основе данных из томограмм



**Рис. 3.** Иллюстрация структур суперкомплекса дыхательной цепи митохондрий различных организмов. *а, в* – Разные проекции структуры поверхности респирасомы из митохондрий *Arabidopsis* sp., полученной методом крио-ЭМ одиночных частиц (разрешение ~ 2Å, PDB ID: 8VPX) [34]. *б, г* – Разные проекции структуры респирасомы из митохондрий сердца крысы, полученной с помощью субтомографического усреднения без экстракции респирасом из мембраны, по данным работы Nesterov et al. [7]. На панелях *а* и *б* цветом выделены различные комплексы в составе суперкомплекса (голубой – комплекс I; фиолетовый – комплекс III; зелёный – комплекс IV (присутствует только в респирасомах крысы)). На панели *в* цветовое отображение сделано по гидрофильности поверхности (синий – гидрофильный; жёлтый – гидрофобный) для более наглядной иллюстрации наличия изгиба мембраны



**Рис. 4.** Реконструкция сложной структуры мембран митохондрий сердца. *а* – Реконструкция томограммы большой области в целой интактной митохондрии сердца крысы; голубым указаны ядра комплексов кето-глутаратдегидрогеназ или дегидрогеназ кетокислот с разветвлённой цепью; зелёным – ядра комплексов дегидрогеназ пирувата. *б, г* – Фрагменты, иллюстрирующие наличие отверстий тороидальной топологии. *в* – Реконструкция фрагмента томограммы кристы митохондрии сердца крысы. Жёлтым указаны АТР-синтазы; голубым – комплексы I; фиолетовым – димеры комплексов III; зелёным – комплексы IV. Мембрана показана серым цветом (не прозрачной) и закрывает гидрофобные части комплексов. *д* – Тонкий срез части кристы в месте, показанном стрелками на панели *в*. Мембрана показана прозрачной, что позволяет видеть также гидрофобные части комплексов. Визуализация выполнена на основе томографических данных, полученных в ходе выполнения предыдущих работ [7, 11]



**Рис. 5.** Схематичная модель предполагаемого расположения белковых комплексов системы ОКСФОС в окрестности тороидальных отверстий в псевдоламеллярных участках крист. Модель построена на основе ручной обработки крио-ЭТ нескольких тороидальных отверстий с разметкой расположения  $F_1$ -субъединиц АТФ-синтаз во внутренней мембране митохондрий сердца крыс. Жёлтым обозначены димеры АТФ-синтаз; голубым – респирасомы; тёмно-серым – мембрана; светло-серым – межмембранное пространство

являются АТФ-синтазы и комплексы I, имеющие уникальную форму большой выступающей из мембраны гидрофильной части (рис. 4, а и б). Помимо этого, можно выполнять реконструкцию трёхмерной структуры внутренней мембраны митохондрий с разрешением, которое существенно превышает разрешение томографии, основанной на анализе срезов фиксированных образцов митохондрий. В результате на крио-ЭТ внутренние мембраны митохондрий сердца представлены с большей детализацией и представляют собой не волнообразные ламеллярные структуры, как они интерпретируются на основе просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) ультратонких срезов [35], а сложную структуру из множества небольших плоских фрагментов, испещрённых множеством трубчатых перемычек (рис. 4). Такая структура даёт ответ на вопрос, как димеры АТФ-синтаз размещаются во внутренней мембране митохондрий сердца. Наиболее распространены олигомеры из АТФ-синтаз на перегибах крист с высокой кривизной [36], однако встречаются менее длинные кластеры АТФ-синтаз в областях меньшей кривизны, где, однако, создаётся возмущённая структура, в которой невозможна плотная упаковка респирасом и АТФ-синтаз (рис. 4, б).

При меньшем масштабе (без визуализации отдельных мембранных белков) можно провести подробную реконструкцию внутренней мембраны митохондрий сердца с высоким разрешением, доступным с помощью крио-ЭТ. Такая реконструкция была проведена нами недавно с целью визуализации положения крупных дегидрогеназных комплексов относительно мембраны в нативных

условиях [11]. Полученные данные свидетельствуют о том, что митохондрии сердца представляют собой сложный лабиринт из сильно искривлённых мембран, имеющих ламеллярно-трубчатую структуру (рис. 5). При этом в полностью ламеллярных плоских участках не могут располагаться димеры АТФ-синтаз [36]. С точки зрения обеспечения оптимальной структуры и функциональности митохондрий ламеллярная структура мембраны получается не подходящей для размещения ключевых компонентов ОКСФОС. Отчасти это может решаться формированием волнообразных искривлений бислоя внутренней мембраны, на искривлённых участках которых могут локализоваться АТФ-синтазы. Такая топология действительно наблюдается на некоторых снимках ПЭМ [37]. Однако часто структуры мембраны визуализируются именно как ламеллярные, что не позволяет образовываться даже напряжённым структурам с димерами АТФ-синтаз, одна из которых приведена на рис. 4, в. Парадокс наличия видимых с помощью классической электронной микроскопии ламелей был решён нами благодаря более высокому разрешению крио-ЭТ. Компьютерная реконструкция показала, что в ламеллярных участках образуются тороидальные отверстия, на краях которых могут размещаться димеры АТФ-синтаз, а около них в областях с меньшей кривизной – респирасомы. В отличие от краёв кристы, показанных на рис. 3, в тороидальных отверстиях по краям может располагаться не только один ряд из димеров АТФ-синтаз, но даже два плотно стыкованных ряда АТФ-синтаз. Это обеспечивает максимально эффективное использование достаточно небольших

(по сравнению со всей площадью крист) искривлённых областей мембраны для расположения на них димеров АТР-синтаз. В тороидальных отверстиях в области высокой кривизны может располагаться олигомерная структура из димеров АТР-синтаз, схожая с изображённой на рис. 4, в. Однако предварительный ручной анализ показывает в некоторых тороидных отверстиях большее количество структур, по размерам совпадающих с  $F_1$ -субъединицами АТР-синтаз, что говорит о возможности размещения на складке мембраны сразу двух рядов из димеров АТР-синтаз. Из-за высокой плотности белка, препятствующей получению высокого разрешения, точной компьютерной реконструкции с усреднением АТР-синтаз в этих областях пока сделать не удалось. Схематичное отображение предполагаемого нами расположения комплексов ОКСФОС в таких структурах показано на рис. 5.

Такая сложная топология мембран митохондрий может поддерживаться благодаря высокой концентрации в мембране липидов конической формы, таких как кардиолипин и фосфатидилэтаноламин. Предположительно, перемычки мембраны настолько обогащены этими липидами, и их структура так отличается от бислоя, что методом ЯМР они определялись как небислояная фаза липида [37, 38]. Учитывая необходимость кардиолипина для работы системы ОКСФОС [39] и оптимальность его структуры для обеспечения переноса протона вдоль мембраны [8], можно предположить, что склонность респирасом и АТР-синтаз создавать кривизну мембраны по крайней мере отчасти может быть эволюционно обусловлена необходимостью концентрации кардиолипина в приграничной зоне белков системы ОКСФОС.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Отсутствие прямого взаимодействия амилоидных агрегатов с мембранами митохондрий.** Продвинутое моделирование хронических заболеваний, связанных с дисфункцией митохондрий, на основе дрожжей аэробного типа обмена *Y. lipolytica* [9] показали себя мощным инструментом для выявления внутриклеточного действия маркеров этих заболеваний. В случае патологий, связанных с дисфункцией митохондрий [40], это является важной задачей, поскольку митохондрии довольно глубоко вовлечены в работу систем клеточной сигнализации, и зачастую сложно понять, является ли их дисфункция первичной или опосредована патологическими изменениями клеточного окружения. Дрожжи *Y. lipolytica*, будучи одноклеточными организмами, лишены сложной системы межклеточных взаимодействий, а кроме этого, обладают

разветвлённой системой полностью функциональных митохондрий «животного типа», содержащих все комплексы дыхательной цепи.

В работе Eremyan et al. [9] показано, что экспрессия Аβ42 в дрожжах вызывала дисфункцию митохондрий, характерную для ранних стадий развития болезни Альцгеймера в нейронах. Кроме того, колокализация митохондрий и амилоидных агрегатов позволили предположить наличие физического контакта митохондрий и амилоидных агрегатов, на что указывали некоторые другие работы [41]. Поскольку витрификация образцов для криогенной микроскопии является наименее разрушающим методом фиксации объектов, данные, полученные в этой работе, можно считать наиболее достоверно показывающими отсутствие контакта агрегатов амилоидного белка и митохондрий.

Тем не менее распределение расстояний между агрегатами и митохондриальной мембраной свидетельствует о концентрации агрегатов вблизи митохондрий, что может иметь значение в процессах транспорта митохондриальных субстратов, или влиянии агрегатов на биосинтез белков по причине большого числа рибосом, располагающихся также вблизи митохондрий.

**Модель топологической связи суперкомплексов в мембране митохондрий.** Интересной особенностью, которую удалось установить именно благодаря крио-ЭТ, оказался факт, что АТР-синтазы не только димеризуются (это можно обнаружить и с помощью нативного электрофореза), но ещё и образуют олигомерные ряды, которые деформируют мембрану, создавая на ней существенную кривизну [16, 42, 43]. Как оказалось, респирасомы тоже влияют на кривизну мембраны, что видно на криоэлектронных изображениях респирасом разных организмов [30, 34]. При этом взаимодействие комплекса I и димера комплекса III в респирасоме консервативно, и структура респирасомы имеет высокое сходство между видами [44], что указывает и на консервативность взаимодействия респирасом с мембраной. Это позволяет предположить, что связь респирасом с АТР-синтазами, показанная в работе Nesterov et al. [7] (рис. 4, в), может осуществляться в значительной степени за счёт механических свойств мембраны, стремящейся компенсировать избыточное напряжение. Димеры АТР-синтаз создают около себя область наибольшей кривизны мембраны [36], создавая тем самым напряжение в бислое и отклоняя его от энергетически оптимальной структуры, которая была бы при самоорганизации липида при отсутствии белка. В области, отстоящей от АТР-синтаз, мембрана стремится прийти к равновесной топологии ламеллярного бислоя. В то же время респирасомы также создают напряжение мембраны,

но липидный бислои вокруг них обладает существенно меньшей кривизной, чем около димеров АТФ-синтаз. Для того чтобы респирасомы не создавали отдельную область с искривлением мембраны, им выгодно располагаться ближе к АТФ-синтазам в той части мембраны, где кривизна для них уже и так является оптимальной и не требуется дополнительная энергия для механического напряжения липидного бислоя. В таком случае должна наблюдаться предпочтительная ориентация респирасом вдоль одной оси, что действительно подтверждается экспериментом на митохондриях сердца [7]. Таким образом, сила, притягивающая респирасомы к АТФ-синтазе, имеет энтропийную топологическую природу и определяется мембраной, которая стремится минимизировать своё отклонение от равновесной приближенной к бислою структуры. Необходимо также отметить, что интегральные белковые комплексы, которые создают искривление митохондриальной мембраны, создают вместе с тем вокруг себя мембранные домены (рафты) из кардиолипина и других липидов, имеющих коническую форму, так как именно они оптимально подходят для создания кривизны в липидном бислое [45]. Связь с кардиолипином АТФ-синтаз и дыхательных комплексов (как по отдельности, так и собранных в респирасомы) многократно подтверждена экспериментами [38, 46–53]. Способность кардиолипина формировать мембранные домены также показана в эксперименте [54].

Сортировка белков на основе их взаимодействия с липидами мембраны хорошо известна – в клетке на основе рафтов и нанорафтов функционирует система сортировки [55]. Сортировка белков в мембранных рафтах происходит преимущественно на основе совпадения или несовпадения толщины их гидрофобной мембранной зоны с толщиной определённого кластера из липидов мембраны (принцип гидрофобного несоответствия, *hydrophobic mismatch*). Вышеприведённые данные о мембранах митохондрий, помимо хорошо известного принципа кластеризации белков со схожей гидрофобной зоной, позволяют добавить ещё один принцип сортировки – на основе сродства белковых комплексов к зонам разной кривизны мембраны. Сложная топология внутренней мембраны митохондрий сердца и наличие в ней небислоиных фаз наводит на мысль, что самоорганизация комплексов системы ОКСФОС в митохондриях сердца может идти по механизму, схожему с кристаллизацией *in meso* мембранных белков [56].

Таким образом, вышеприведённые данные показывают, что структура респирасом эволюционно отобрана так, что посредством взаимодействия с липидами мембраны она обеспечивает локализа-

цию респирасом около димеров АТФ-синтаз и тем самым кластеризацию всей системы ОКСФОС.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано экспериментальное применение одного из самых современных методов структурной биологии для исследования взаимодействия агрегатов с мембранами, топологии самих мембран и взаимного расположения мембранных белков в митохондриях в нативных условиях. Проведён ряд новых экспериментов с использованием CLEM, которые показали, что амилоидные агрегаты не взаимодействуют с внешней мембраной митохондрий и не попадают в митохондрии. Также более глубоко проанализированы собственные данные последних лет и современные литературные данные по криоэлектронной просвечивающей микроскопии и томографии митохондрий и митохондриальных мембран. Показано комплексное устройство и сложная топология мембран митохондрий сердца крыс, обогащённых крупными суперкомплексами, влияющими на кривизну мембраны. В полном соответствии с этим мембрана митохондрий сердца имеет лишь незначительные области, в которых она близка к плоскому бислою, в то время как большая часть мембраны представляет собой сложную сеть из перемычек с высокой кривизной, на которых расположены ряды из димеров АТФ-синтаз и суперкомплексов дыхательной цепи. Те области мембраны, которые на ПЭМ тонких срезов выглядят как ламеллярные, на самом деле испещрены множеством отверстий, в которых размещаются плотно стыкованные кластеры белковых комплексов системы ОКСФОС. В работе обсуждаются также теоретические основы, объясняющие кластеризацию мембранных белков системы ОКСФОС и кардиолипина минимизацией энергии деформации липидной части мембраны. Такой принцип организации мембранных белков предложено назвать топологическим.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке НИЦ Курчатовский институт (тематический план 1ф.4.1 «Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах, направленное на поиск новых подходов к созданию терапевтических средств, новых биоэнергетических устройств и систем искусственного фотосинтеза»).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** В рамках настоящей статьи не проводилось каких-либо новых экспериментов с участием людей или животных, кроме дрожжей, в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saibil, H. R. (2022) Cryo-EM in molecular and cellular biology, *Mol. Cell*, **82**, 274-284, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.016>.
2. Guaita, M., Watters, S. C., and Loerch, S. (2022) Recent advances and current trends in cryo-electron microscopy, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **77**, 102484, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102484>.
3. Chua, E. Y. D., Mendez, J. H., Rapp, M., Ilca, S. L., Tan, Y. Z., Maruthi, K., Kuang, H., Zimanyi, C. M., Cheng, A., Eng, E. T., Noble, A. J., Potter, C. S., and Carragher, B. (2022) Better, faster, cheaper: recent advances in cryo-electron microscopy, *Annu. Rev. Biochem.*, **91**, 1-32, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-110705>.
4. Hoffman, D. P., Shtengel, G., Xu, C. S., Campbell, K. R., Freeman, M., Wang, L., Milkie, D. E., Pasolli, H. A., Iyer, N., Bogovic, J. A., Stabley, D. R., Shirinifard, A., Pang, S., Peale, D., Schaefer, K., Pomp, W., Chang, C.-L., Lippincott-Schwartz, J., Kirchhausen, T., Solecki, D. J., Betzig, E., and Hess, H. F. (2020) Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells, *Science*, **367**, eaaz5357, <https://doi.org/10.1126/science.aaz5357>.
5. Liu, T., Stephan, T., Chen, P., Keller-Findeisen, J., Chen, J., Riedel, D., Yang, Z., Jakobs, S., and Chen, Z. (2022) Multi-color live-cell STED nanoscopy of mitochondria with a gentle inner membrane stain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2215799119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2215799119>.
6. Wang, C., Taki, M., Sato, Y., Tamura, Y., Yaginuma, H., Okada, Y., and Yamaguchi, S. (2019) A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 15817-15822, <https://doi.org/10.1073/pnas.1905924116>.
7. Nesterov, S., Chesnokov, Y., Kamyshinsky, R., Panteleeva, A., Lyamzaev, K., Vasilov, R., and Yaguzhinsky, L. (2021) Ordered clusters of the complete oxidative phosphorylation system in cardiac mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22031462>.
8. Nesterov, S. V., Yaguzhinsky, L. S., Vasilov, R. G., Kadantsev, V. N., and Goltsov, A. N. (2022) Contribution of the collective excitations to the coupled proton and energy transport along mitochondrial cristae membrane in oxidative phosphorylation system, *Entropy*, **24**, 1813, <https://doi.org/10.3390/e24121813>.
9. Epremyan, K. K., Rogov, A. G., Goleva, T. N., Lavrushkina, S. V., Zinovkin, R. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2023) Altered mitochondrial morphology and bioenergetics in a new yeast model expressing A $\beta$ 42, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24020900>.
10. Bischof, J., Hunt, C. J., Rubinsky, B., Burgess, A., and Pegg, D. E. (1990) Effects of cooling rate and glycerol concentration on the structure of the frozen kidney: Assessment by cryo-scanning electron microscopy, *Cryobiology*, **27**, 301-310, [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90029-4).
11. Plokhikh, K. S., Nesterov, S. V., Chesnokov, Y. M., Rogov, A. G., Kamyshinsky, R. A., Vasiliev, A. L., Yaguzhinsky, L. S., and Vasilov, R. G. (2024) Association of 2-oxoacid dehydrogenase complexes with respirasomes in mitochondria, *FEBS J.*, **291**, 132-141, <https://doi.org/10.1111/febs.16965>.
12. Nesterov, S. V., Skorobogatova, Y. A., Panteleeva, A. A., Pavlik, L. L., Mikheeva, I. B., Yaguzhinsky, L. S., and Nartsissov, Y. R. (2018) NMDA and GABA receptor presence in rat heart mitochondria, *Chem. Biol. Interact.*, **291**, 40-46, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.004>.
13. Sibarita, J.-B. (2005) Deconvolution microscopy, in *Microscopy Techniques* (Rietdorf, J., ed) Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 201-243.
14. Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., and McIntosh, J. R. (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD, *J. Struct. Biol.*, **116**, 71-76, [https://doi.org/10.1016/1047-8477\(96\)00029-4](https://doi.org/10.1016/1047-8477(96)00029-4).
15. Wan, W., and Briggs, J. A. G. (2016) *Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging*, 1st Edn, Elsevier.
16. Nesterov, S. V., Chesnokov, Y. M., Kamyshinsky, R. A., Yaguzhinsky, L. S., and Vasilov, R. G. (2020) Determining the structure and location of the ATP synthase in the membranes of rat's heart mitochondria using cryoelectron tomography, *Nanotechnol. Russia*, **15**, 83-89, <https://doi.org/10.1134/S1995078020010139>.
17. Liu, Y.-T., Zhang, H., Wang, H., Tao, C.-L., Bi, G.-Q., and Zhou, Z. H. (2022) Isotropic reconstruction for electron tomography with deep learning, *Nat. Commun.*, **13**, 6482, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33957-8>.
18. Martinez-Sanchez, A., Garcia, I., Asano, S., Lucic, V., and Fernandez, J. J. (2014) Robust membrane detection based on tensor voting for electron tomography, *J. Struct. Biol.*, **186**, 49-61, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.02.015>.
19. Castaño-Díez, D., Kudryashev, M., Arheit, M., and Stahlberg, H. (2012) Dynamo: A flexible, user-friendly development tool for subtomogram averaging of cryo-EM data in high-performance computing environments, *J. Struct. Biol.*, **178**, 139-151, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.12.017>.
20. Tegunov, D., and Cramer, P. (2019) Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with Warp, *Nat. Methods*, **16**, 1146-1152, <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0580-y>.
21. Bharat, T. A. M., and Scheres, S. H. W. (2016) Resolving macromolecular structures from electron cryo-tomography data using subtomogram averaging in RELION, *Nat. Protoc.*, **11**, 2054-2065, <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.124>.

22. Asano, S., Fukuda, Y., Beck, F., Aufderheide, A., Förster, F., Danev, R., and Baumeister, W. (2015) A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons, *Science*, **347**, 439-442, <https://doi.org/10.1126/science.1261197>.
23. Ashleigh, T., Swerdlow, R. H., and Beal, M. F. (2023) The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis, *Alzheimers Dement.*, **19**, 333-342, doi: 10.1002/alz.12683.
24. Bhatia, S., Rawal, R., Sharma, P., Singh, T., Singh, M., and Singh, V. (2022) Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: opportunities for drug development, *Curr. Neuropharmacol.*, **20**, 675-692, <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210517114016>.
25. Eubel, H., Heinemeyer, J., and Braun, H.-P. (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria, *Plant Physiol.*, **134**, 1450-1459, <https://doi.org/10.1104/pp.103.038018>.
26. Chaban, Y., Boekema, E. J., and Dudkina, N. V. (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilization, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 418-426, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.004>
27. Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H.-P., and Boekema, E. J. (2010) Structure and function of mitochondrial supercomplexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 664-670, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.013>.
28. Bultema, J. B., Braun, H.-P., Boekema, E. J., and Kouril, R. (2009) Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 60-67, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.010>.
29. Dudkina, N. V., Kudryashev, M., Stahlberg, H., and Boekema, E. J. (2011) Interaction of complexes I, III, and IV with the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15196-15200, <https://doi.org/10.1073/pnas.1107819108>.
30. Mühleip, A., Flygaard, R. K., Baradaran, R., Haapanen, O., Gruhl, T., Tobiasson, V., Maréchal, A., Sharma, V., and Amunts, A. (2023) Structural basis of mitochondrial membrane bending by the I-II-III<sub>2</sub>-IV<sub>2</sub> supercomplex, *Nature*, **615**, 934-938, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05817-y>.
31. Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., and Yang, M. (2017) Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I<sub>2</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>, *Cell*, **170**, 1247-1257.e12, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>.
32. Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., and Yang, M. (2016) The architecture of the mammalian respirasome, *Nature*, **537**, 639-643, <https://doi.org/10.1038/nature19359>.
33. Vercellino, I., and Sazanov, L. A. (2021) Structure and assembly of the mammalian mitochondrial supercomplex CIII<sub>2</sub>CIV, *Nature*, **598**, 364-367, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03927-z>.
34. Klusch, N., Dreimann, M., Senkler, J., Rugen, N., Kühlbrandt, W., and Braun, H.-P. (2023) Cryo-EM structure of the respiratory I + III<sub>2</sub> supercomplex from *Arabidopsis thaliana* at 2 Å resolution, *Nat Plants.*, **9**, 142-156, <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01308-6>.
35. Kühlbrandt, W. (2015) Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes, *BMC Biol.*, **13**, 89, <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>.
36. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R., and Kühlbrandt, W. (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane, *EMBO J.*, **27**, 1154-1160, <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>.
37. Garab, G., Yaguzhinsky, L. S., Dlouhý, O., Nesterov, S. V., Špunda, V., and Gasanoff, E. S. (2022) Structural and functional roles of non-bilayer lipid phases of chloroplast thylakoid membranes and mitochondrial inner membranes, *Prog. Lipid. Res.*, **86**, 101163, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101163>.
38. Gasanov, S. E., Kim, A. A., Yaguzhinsky, L. S., and Dagda, R. K. (2018) Non-bilayer structures in mitochondrial membranes regulate ATP synthase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 586-599, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.11.014>.
39. Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., and Petrosillo, G. (2014) Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 408-417, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006>.
40. Epremyan, K. K., Goleva, T. N., Rogov, A. G., Lavrushkina, S. V., Zinovkin, R. A., and Zvyagil'skaya, R. A. (2022) The first *Yarrowia lipolytica* yeast models expressing hepatitis B virus X protein: changes in mitochondrial morphology and functions, *Microorganism*, **10**, 1817, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091817>.
41. Völgyi, K., Badics, K., Sialana, F. J., Gulyássi, P., Udvari, E. B., Kis, V., Drahos, L., Lubec, G., Kékesi, K. A., and Juhász, G. (2018) Early presymptomatic changes in the proteome of mitochondria-associated membrane in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 7839-7857, <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0955-6>.
42. Buzhynskyy, N., Sens, P., Prima, V., Sturgis, J. N., and Scheuring, S. (2007) Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes, *Biophys. J.*, **93**, 2870-2876, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.109728>.
43. Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K. M., and Kühlbrandt, W. (2019) Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 4250-4255, <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>.

44. Davies, K. M., Blum, T. B., and Kühlbrandt, W. (2018) Conserved *in situ* arrangement of complex I and III<sub>2</sub> in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 3024-3029, <https://doi.org/10.1073/pnas.1720702115>.
45. Beltrán-Heredia, E., Tsai, F.-C., Salinas-Almaguer, S., Cao, F. J., Bassereau, P., and Monroy, F. (2019) Membrane curvature induces cardiolipin sorting, *Commun. Biol.*, **2**, 1-7, <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0471-x>.
46. Arias-Cartin, R., Grimaldi, S., Arnoux, P., Guigliarelli, B., and Magalon, A. (2012) Cardiolipin binding in bacterial respiratory complexes: structural and functional implications, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1937-1949, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.04.005>.
47. Arnarez, C., Marrink, S. J., and Periole, X. (2013) Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome *c* oxidase at the entrance of proton channels, *Sci. Rep.*, **3**, 1-9, <https://doi.org/10.1038/srep01263>.
48. Duncan, A. L., Robinson, A. J., and Walker, J. E. (2016) Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8687-8692, <https://doi.org/10.1073/pnas.1608396113>.
49. Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., and Schägger, H. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.*, **278**, 52873-52880, <https://doi.org/10.1074/jbc.M308366200>.
50. Mühleip, A., McComas, S. E., and Amunts, A. (2019) Structure of a mitochondrial ATP synthase with bound native cardiolipin, *eLife*, **8**, e51179, <https://doi.org/10.7554/eLife.51179>.
51. Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2014) Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes, *Chem. Phys. Lipids*, **179**, 42-48, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.012>.
52. Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005) Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29403-29408, <https://doi.org/10.1074/jbc.M504955200>.
53. Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.*, **277**, 43553-43556, <https://doi.org/10.1074/jbc.C200551200>.
54. Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2009) Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 2084-2091, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.003>.
55. Diaz-Rohrer, B., Levental, K. R., and Levental, I. (2014) Rafting through traffic: Membrane domains in cellular logistics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 3003-3013, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.029>.
56. Zabara, A., Meikle, T. G., Newman, J., Peat, T. S., Conn, C. E., and Drummond, C. J. (2017) The nanoscience behind the art of *in meso* crystallization of membrane proteins, *Nanoscale*, **9**, 754-763, <https://doi.org/10.1039/C6NR07634C>.

## SAFARI WITH AN ELECTRON GUN: VISUALIZATION OF PROTEIN AND MEMBRANE INTERACTIONS IN MITOCHONDRIA IN THE NATURAL ENVIRONMENT

S. V. Nesterov<sup>1\*</sup>, K. S. Plokhikh<sup>1</sup>, Yu. M. Chesnokov<sup>1</sup>, D. A. Mustaphin<sup>1</sup>, T. N. Goleva<sup>1</sup>, A. G. Rogov<sup>1</sup>, R. G. Vasilov<sup>1</sup>, and L. S. Yaguzhinsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Research Center "Kurchatov Institute",  
123182 Moscow, Russia; e-mail: semen.v.nesterov@phystech.edu

<sup>2</sup> Belozersky Research Institute for Physico Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119992 Moscow, Russia

This paper presents new structural data about mitochondria using correlative light and electron microscopy and cryo-electron tomography (cryo-ET). These state-of-the-art structural biology methods allow the study of biological objects at nanometer scales in natural conditions. The non-invasiveness of these methods makes them comparable to observing animals in their natural environment on a safari. The paper highlights two areas of research that can only be accomplished using these methods. The study visualized the location of A $\beta$ 42 amyloid aggregates in relation to mitochondria to test a hypothesis for the development of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. The results showed that A $\beta$ 42 aggregates do not interact with mitochondria, although some of them are closely located. Therefore, the study demonstrated that mitochondrial dysfunction is not directly influenced by aggregates on mitochondrial structure. The source of mitochondrial dysfunction should be investigated in other processes.

Second unique area presented in this work is the high-resolution visualization of mitochondrial membranes and proteins in them. The analysis of cryo-ET data reveals toroidal holes in the lamellar structures of cardiac mitochondrial cristae, where ATP synthases are located. The study proposes a new mechanism for sorting and clustering protein complexes in the membrane based on topology. According to this mechanism, the position of oxidative phosphorylation system proteins in the membrane is determined by its curvature. High-resolution tomography expands and complements existing ideas about the structural and functional organization of mitochondria. This makes it possible to study the previously inaccessible structural interactions of proteins with each other and with membranes *in vivo*.

*Keywords:* membrane, mitochondria, oxidative phosphorylation, supercomplex, cryo-electron microscopy, ATP-synthase, respirasome, A $\beta$ 42, amyloid aggregates