

Südamerakkude sünnijärgse arengu bioenergeetilised aspektid: struktuuri ja funktsiooni vaheliste seoste väljakujunemine

Tiia Anmann^{1*}, Minna Varikmaa^{1*}, Kersti Tepp^{1*}, Natalja Timohhina¹, Igor Ševtšuk¹, Vladimir Tšekulajev¹, Valdur Saks^{1,2}, Tuuli Käämbre^{1,3}

Eesti Arst 2013;
92(7):372–381

Saabunud toimetusse:
12.03.2013
Avaldamiseks vastu võetud:
24.05.2013
Avaldatud internetis:
31.08.2013

¹ Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi bioenergeetika laboratoorium,
² Grenoble'i Joseph Fourier' Ülikooli fundamentaalse ja rakendusliku bioenergeetika laboratoorium,
³ Tallinna Ülikooli matemaatika ja loodusteaduste instituut

* Kolme esimese autori panus artikli valmimisse on võrdne.

Kirjavahetajaautor:
Kersti Tepp
kersti.tepp@kbfi.ee

Võtmesõnad:
mitokondrid, bioenergeetika, südamerakk, areng

Taust ja eesmärk. Täiskasvanud südamerakkude bioenergeetikas on valdavaks ATP genereerimise mehhanismiks mitokondriaalne oksüdatiivne fosforüülimine, mis katab tavatingimustel üle 90% südame energeetilisest vajadusest. Mitokondrid paiknevad kardiomiotsüütides korrapäraselt müofibrillide vahel, asetudes kohakuti libisevate filamentide kontaktalaga (sarkomeeri anisotroopne (A) vööt). Aktomüosiinisüsteem, mitokondrid, sarkoplasmaatiline võrgustik ja nendega seotud tsütoskeleti valgud moodustavad rakus ühtse struktuurse ja funktsionaalse terviku, nn energeetilise üksuse (EÜ), mis reguleerib efektiivselt energia tootmist ja fosforüülühma ülekannet. Vahetult pärast sündi on mitokondrite paigutus ebakorrapärane, täiskasvanud kardiomiotsüütidega võrreldes on oluliselt erinev ka südamerakkude metabolism ning energiaülekanne regulatsioon. Töö eesmärgiks oli uurida südame mitokondriaalse hingamise regulatsiooni mehhanismide väljakujunemist südame sünnijärgses arengus ning selle seotust mitokondrite ja tubuliini isovormide rakusisese paigutusega. Töö tulemused võimaldavad selgitada südamerakkude teatud patoloogiliste seisundite etioloogiat.

Metoodika. Kardiomiotsüüdid isoleeriti, perfuseerides katseloomade (Wistari liini rotid) südant kollageenaas A lahusega. Skineeritud kiudude eraldamiseks kasutati meetodit, mille käigus lihaskiud eraldatakse õrnalt pintsettidega ja töödeldakse seejärel saponiiniga. Permeabiliseeritud kardiomiotsüütide ja skineeritud kiudude hapnikutarbimine registreeriti suure lahutusvõimega oksügraafil. Preparaatide visualiseerimiseks kasutati konfokaalmikroskoobe Zeiss LSM 510 ja Olympus FluoView FV10i-W.

Tulemused. Katseloomade sünni järel toimuvad esimese pooleteise kuu jooksul südameraku energiaülekanne regulatsioonis kiired muutused: mitokondrite paigutus muutub korrapäraseks, toimub tsütoskeleti funktsionaalselt oluliste komponentide paigutumine mitokondrite lähedusse ja sellega samal ajal kasvavad oluliselt difusioonitakistused adensiindifosfaadile ($K_m(\text{ADP})$ väärtus suureneb $75,0 \pm 4,5 \mu\text{M}$ 3 päeva vanuste rottide kardiomiotsüütides kuni $317 \pm 29,5 \mu\text{M}$ võrreldes 84päevaste katseloomadega) ning käivitub kreatiinkinaasi-fosfokreatiini ülekandevõrgustik mitokondrite ja tsütosoolsete ATPaaside vahel.

Järeldused. Katseloomade sünnijärgse arengu käigus toimuvad dünaamilised muutused kardiomiotsüütide struktuuris, millega kaasnevad muutused nende funktsioonis. Funktsionaalsete vastasmõjude tekkimine mitokondrite ja tsütoskeleti komponentide vahel on eelduseks täiskasvanud südamerakule omase energiametabolismi väljakujunemiseks.

Süda on üks esimesi loote arengus väljakujunevaid elundeid ning hilisemad häired selle töös on tänapäeval üheks peamiseks elukvaliteedi alandajaks ning surma põhjustajaks.

Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi bioenergeetika laboris on juba aastaid uuritud, kuidas toimub kardiomiotsüütides energia vajadusest sõltuv mitokondriaalne

ATP tootmise reguleerimine, rakendades seejuures süsteemibioloogilist käsitlusviisi, kus püütakse arvesse võtta nii süsteemi komponentide omavahelist paigutust kui ka nendevahelisi vastasmõjusid. Selleks oleme kasutanud nii isoleeritud permeabiliseeritud südamerakkude kui ka skineeritud kiudude meetodit, mis võimaldab uurida ATP tootmise reguleerimist keskkonnas, kus mitokondritel on säilinud kontaktid tsütoskeleti valkudega.

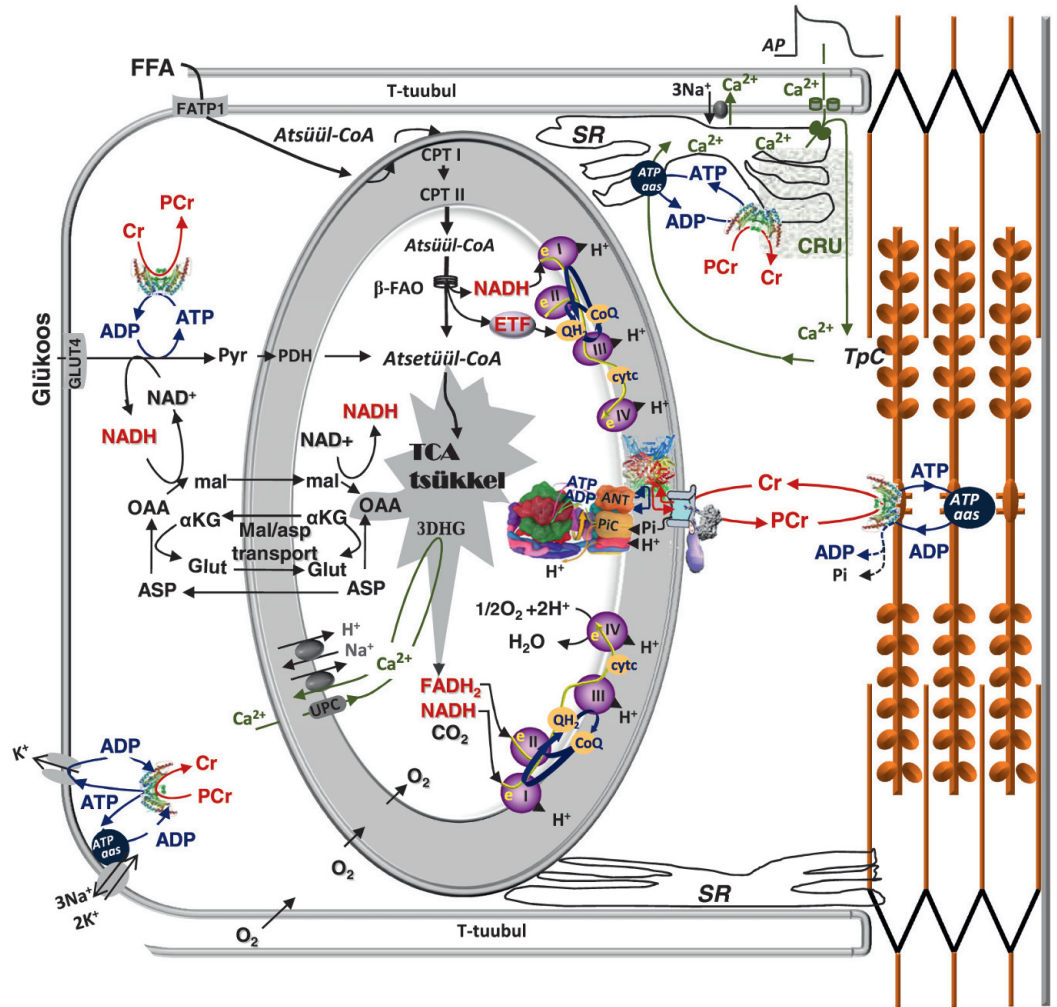
Bioenergeetilisest vaatepunktist on südamelihase oksüdatiivse lihase parimaks mudeliks, sest tema energiavajadus on pidev ja varieerub väga suures ulatuses. Juba eelmise sajandi alguses näidati, et südame töökoormuse kasvuga suureneb lineaarselt ka hapniku tarbimise kiirus (Franki-Starlingi seadus) (1). Ometi oli jäänud viimase ajani selgusetuks, kuidas reguleeritakse energia tarbimisest sõltuvalt mitokondrite hingamist, kui peamiste energiametaboliitide, ADP, ATP ja fosfokreatiini (PCr) tase püsib suures osas muutumatuna ning seda isegi pea 20 kordse hapnikutarbimise kiiruse suurenemise korral (nn metaboolse homöostaasi paradoks) (2).

Oksüdatiivsete skeletilihaste ja eriti südamelihaste rakkudele on iseloomulik rangelt korrapärane rakusisene ülesehitus. Paralleelselt joondunud müofibrillikimpude vahele on korrapärase muustrina paigutunud mitokondrid, mis asuvad kohakuti sarkomeeri A-vöödiga ning on nii struktuurset kui ka funktsionaalselt seotud aktomüosiini ning sarkoplasmaatilise *reticulum*'iga (3). Koostöös partneritega teistest teadusrühmadest on uuringutulemused viinud järelduseni, et südamelihase energeetilisest metabolismi võib vaadelda mudelis, kus iga sarkomeer on varustatud energiaga oma mitokondri(te) poolt ning mis moodustab lisaks kontraktsiooniaparaadile funktsionaalseid ning struktuurseid kontakte teiste ATPd tarbivate süsteemidega (vt joonis 1). Selline rangelt korrapärane energiametabolismi ülesehitus on kontseptuaalselt tuntud rakusisese energeetilisest üksusena (EÜ) (*Intracellular Energetic Unit*, ICEU) (4–6). Need üksused tagavad südamelihase vajadusest lähtuva ATP-tootmise regulatsiooni ning efektiivse energiaülekanne mitokondrite ja ATPaaside ning teiste kompartmentide vahel energiaülekanne võrgustike kaudu (7). Oma varasemates töödes oleme näidanud, et mitokondri välismembraani poriinkanalil

(VDAC) on selektiivne läbilaskvus suure energiasaldusega metaboliitide suhtes: ATP ja ADP jaoks on läbitavus piiratud, samas kui fosfokreatiini (PCr) liikumisele takistust ei ole (8). PCr, mis toodetakse membraanidevahelises ruumis ATPst mitokondriaalse kreatiinkinaasi (MtCK) poolt, suunatakse läbi VDAC kanali tsütoplasmasse ja mööda kreatiinkinaasi ülekande võrgustikku energia tarbimise sihtpunktidesse, kus seda kasutavad ATP taastootmiseks teised kreatiinkinaasi (CK) isovormid (vt joonis 1). Mitokondriaalne PCr tootmine tagab energeetilisest kommunikatsiooni spetsiifilisuse ning efektiivsuse, kuna sel viisil välditakse suuri kõikumisi tsütosooli ADP/ATP tasemetes ning energia transportitakse ilma kadudeta tema tarbimise kohtadesse. Mitokondriaalse kreatiinkinaasi reaktsioonis tekkiv ADP suunatakse läbi adeniinnukleotiidi translokaasi kanali (ANT) tagasi mitokondri maatriksisse ATP süntaasile, mis tänu selle süsteemi sidestusele lubab toota ATPd mitokondris oluliselt efektiivsemalt ja võimaldab võimendada mitokondrisse saabuvat bioloogilist signaali. Selle mudeli abil saab seletada mitokondri hapniku tarbimise kiiruse muutust vastavalt südamelihase töö muutumisele.

Selleks et paremini mõista raku struktuuri mõju ja tsütoskeleti komponentide funktsionaalset rolli südamelihase bioenergeetilisest regulatsioonis, otsustasime järgmise etapina uurida energiaülekanne regulatsiooni kujunemist ontogeneetilises arengus postnataalsest südamerakust täiskasvanud kardiomüotsüüdini.

Südame metabolism teeb ontogeneesi käigus läbi olulisi muutusi, mis on tihedalt seotud hapniku ja substraatide kättesaadavusega (9–11). Embrüonaalses staadiumis sõltuvad südamerakud põhiliselt anaeroobsest glükolüüsist, lootefaasis toimub aeroobse metabolismi kiire areng, samas jääb laktaat kuni sünnini nende rakkude põhiliseks energiaallikaks (12). Täiskasvanud kardiomüotsüütides on energiatarve peaaegu täielikult rahuldatud oksüdatiivse fosforüülimisega mitokondrites ning põhilise energiaallikana kasutatakse siis eelistatult rasvhappeid. Seega toimuvad energeetilisest vaatepunktist lähtudes sünni järel suured muutused, mis on viimastel aastakümnetel võitnud paljude uurimisrühmade tähelepanu. Siiski ei ole meile teadaolevalt tehtud süstemaatilist



Joonis 1. Rakusisene energeetiline üksus (EÜ) täiskasvanud südamerakus. Tänu funktsionaalsetele vastasmõjudele tsütoskeletiga on mitokondrid ja sarkoplasmaatiline *reticulum* (SR) fikseeritud täiskasvanud südamerakus müofibrillide suhtes kahe Z-liini ja vastavalt ka kahe T-tuubuli vahele. Kaltsium, mis vabastatakse EÜs SRist mitokondri ja sarkomeeride lähedusse, aktiveerib kontraktsiooni ja mitokondriaalsed dehüdrogenaasid. Mitokondrid, SR ja müofibrillide Mg-ATPaasid ning ATP-tundlikud süsteemid sarkolemmil on omavahel ühendatud kreatiinkinaasi (CK) metaboolse ülekandevõrgustiku kaudu. Valgulised tegurid, millest üks on tubuliini heterodimeer, reguleerivad mitokondri välismembraanis asuva pingest sõltuva porii kanalit (VDAC) selektiivset läbitavust. Kardiomiotsüütides kasutatakse fosforüülühma transpordiks EÜs eelistatult kiiremini difundeeruvat kreatiini (Cr) - fosfokreatiini (PCr) ülekannet. Joonisel: α KG – α -ketoglutaar; 3DHG – dehüdrogenaasid; atsetüül-CoA – atsetüülkoensüüm A; ADP – adeniindifosfaat; ANT – adeniinnukleotiidi translokaas; ATP – adeniintrifosfaat; AP – aktsioonipotentsiaal; asp – aspartaat; CPT I – karnitiini-palmitiini tranferaas I; CPT II – karnitiini-palmitiini tranferaas II; CRU – kaltsiumi vabanemise üksus; cytc – tsütokroom c; ETF – elektronide ülekande flavoproteiin; FATP1 – plasmamembraani proteiinid; FFA – vabad rasvhapped; GLUT4 – glükoos; glut – glutamaat; GLUT-4 – glükoosi transportija 4; Mal – malaat; OAA – oksaalatsetaat; PDH – püruvaadi dehüdrogenaaside kompleks; PIC – fosfaadi kandja; Pyr – püruvaat; RC – hingamisahel; TpC – troponiin C; TKT – trikarboksüülhapete tsükkel; UPC – uniporterkanal; β -FAO – rasvhapete β -oksüdatsioon. Joonis on kohandatud allika 29 vastava joonise alusel.

analüüsi sellest, kuidas tekib südamelihaste kõrgelt organiseeritud rakusisene struktuur kardiomiotsüütide postnataalse arengu käigus ning kuidas muutub südame energeetika rakusisesel energeetilisel üksusel põhinevaks unitaarselt organiseeritud energiametabolismiks.

Mitokondrite korrapärase paigutuse kujunemise, nende funktsionaalse küpse-

mise ning seda potentsiaalselt mõjutavate tsütoskeleti valkude (13, 14) rakusisesel paigutuse muutuste uurimine südamerakkude arengu käigus võimaldab selgitada nende valkude rolli mitokondrite hingamise regulatsioonis ning seeläbi täpsustada struktuuri ja funktsiooni osatähtsust täiskasvanud südame lihaskude bioenergeetikas. Lisaks sellele on erinevad patolo-

gilised seisundid (nt südame isheemiatõbi, kasvavad ja neurodegeneratiivsed haigused) tihti seotud energiametabolismi (15, 16) ja rakusisese struktuuri muutustega (17). Seega võib teadmine, kuidas rakusisene keerukas struktuur arengu käigus tekib, avada uusi perspektiive nende haiguste ravistrateegiate kujundamisel.

Töö eesmärgiks oli uurida katseloomadel südame mitokondriaalse hingamise regulatsiooni mehhanismide väljakujunemist südame sünnijärgses arengus ning selle seost mitokondrite ja tubuliini β II ja α IV isovormide rakusisese paigutusega.

MATERJALID JA MEETODID

Katsetes kasutati Wistari liini rotte. Loomi kasvatati püsival temperatuuril (22 °C) vastavalt 12 : 12 tunni valguse ja pimeduse režiimil ning standardsel toidul *ad libitum*. Loomkatsetes toimusid Põllumajandusministeriumi loomkatsete eetikakomitee tingimustest lähtudes ja ministeriumi väljastatud loa alusel.

Kardiomiotsüüdid isoleeriti roti südame perfusioonil kollagenaasi lahusega, kohandades selleks varem väljatöötatud metoodikat (18). Vatsakeste rakud eraldati lahusesse Mitomed (19) pehmel töötlusel pipetiga ja pesti sama lahusega.

Lihaskiudude eraldamiseks kasutati A. Kuznetsovi ja V. Saksa välja töötatud skineeritud kiudude meetodit (20). Pärast südame eemaldamist võeti vasaku vatsakese endokardiaalsest osast lihaskiud (5–10 mg märgkaalus), seejärel eraldati kiud ettevaatlikult üksteisest teravate pintsettide abil, jättes kiudude vahele alles minimaalse kontakti. Permeabiliseerimiseks töödeldi kiude saponiini 50 μ g/ml lahusega 30 minuti jooksul. Katsete tegemiseni hoiti bioloogilist materjali 4 °C juures.

Permeabiliseeritud kardiomiotsüütide ja skineeritud kiudude hapnikutarbimine registreeriti suure lahutusvõimega oksügraafil (Oroboros Instruments, Austria). Kardiomiotsüüdid permeabiliseeriti oksügraafi küvetis saponiini (20 μ g/ml) abil. Reaktsioonikeskkonnana kasutati lahust Mitomed.

Enne katsete alustamist kontrolliti eraldatud rakkude ja kiudude kvaliteeti tsütokroom c (cyt c) ja karboksüatraktüloosiidi (CAT) testiga (vt selle kohta ka joonis 4B). Intaktse mitokondri välismembraani korral maksimaalse hingamiskiiruse tingimustes

lisatud cyt c hapnikutarbimise kiirust täiendavalt ei suurenda. Juhul kui hingamiskiirus kasvab, viitab see mitokondri välismembraani kahjustusele, mille tõttu osa cyt c on väljunud tsütosooli ja eksogeenselt lisatud cyt c kompenseerib puudujäägi. Karboksüatraktüloosiid blokeerib ANT kanali ja katkestab ADP-ATP vahetuse. Juhul kui mitokondri sisemembraan on terve, langeb hapniku tarbimise kiirus CAT lisamisel algtasemele (V_0).

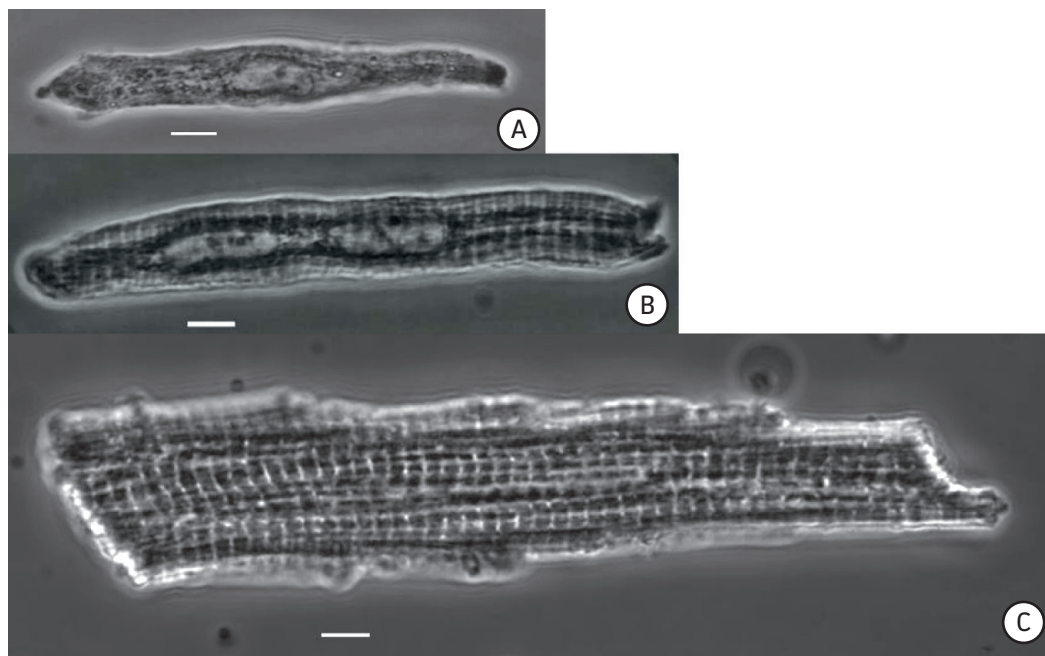
Katsed tehti nii eraldatud rakkude kui ka lihaskiududega. Lihaskiudude uuringueelses töötlusel ei kasutatud kollagenaasi, samuti säilisid rakkude omavahelised kontaktid. Samad tulemused mõlema preparaadi puhul näitavad, et rakkude eraldamise tingimused ei mõjutanud tsütoskeleti rakkude funktsionaalset vastasmõju mitokondriga.

Mitokondrite ja skineeritud kiudude visualiseerimiseks kasutati konfokaalmikroskoobe Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss) ja FluoView FV10i-W (Olympus). Visualiseerimiseks kasutatud antikehad olid *rabbit anti-tubulin α IV* (NB110-57609, Novus Biologicals), *mouse anti-tubulin β II* primaarne antikeha (Abcam, ab92857). Polükloonaarse *rabbit anti-VDAC* primaarse antikeha eest täname dr C. Brennerit (Université Paris-Sud, Pariis, Prantsusmaa). Sekundaarsed antikehad olid *DyLight 488 goat anti-rabbit IgG* (Abcam, ab96899) ja *DyLight 549 goat anti-mouse IgG* (Abcam, ab96880). Katsetes kasutatud reagentid on pärit firmadelt Sigma-Aldrich, Roche ja Fluka.

Andmete töölemiseks kasutati programmi SigmaPlot, tulemused on esitatud kujul keskmine \pm keskvärtuse standardviga. Statistilistel analüüsidel kasutati Studenti t-testi ja statistilise olulise nivooks võeti $p < 0,05$.

TULEMUSED

Uurimistöö esimese tulemuse põhjal saab väita, et roti südamerakud on esimesel sünnijärgsel päeval süstikulaadse kujuga (vt joonis 2A), mitte ümarad, nagu on mõnes töös väidetud (21). Nendest rakkudest konfokaalmikroskoobi abil tehtud piltidel on selgelt näha, kuidas vastsündinud rotil kardiomiotsüüdile iseloomulik ühetuumne rakk (vt joonis 2A) asendub kahetuumsega (vt joonis 2B) (mis on valdav täiskasvanud roti südamerakkudes), samal ajal kasvavad raku mõõtmed kolm kuni neli korda (vt joonis 2).



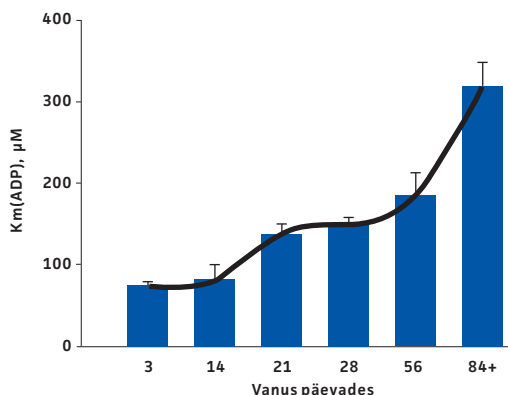
Joonis 2. Muutused roti kardiomiotsüütide väliskujus arengu käigus.

Joonisel on näha rakkude sarnane kuju alates esimestest sünnijärgsetest päevadest, samas kui raku üldmootmed kasvavad.

Joonis 2A. 1. sünnijärgne päev: rakk on otstest ümarama kujuga, ühetuumne ja pisut kitsama ehitusega. **Joonis 2B.** 10. sünnijärgne päev: rakus on kaks tuuma, tsütoplasmas on tekkimas organellide korrapärane struktuur.

Joonis 2C. 56. sünnijärgne päev: raku siseehitus on kristallilaadne ja organellide paigutus fikseeritud ning see on eelduseks energiaühikute kujunemisele.

Rakke vaadeldi mikroskoobis Fluoview FV10i-W (Olympus) 60kordse suurendusega. Skaalajoonele vastab 5 µm.

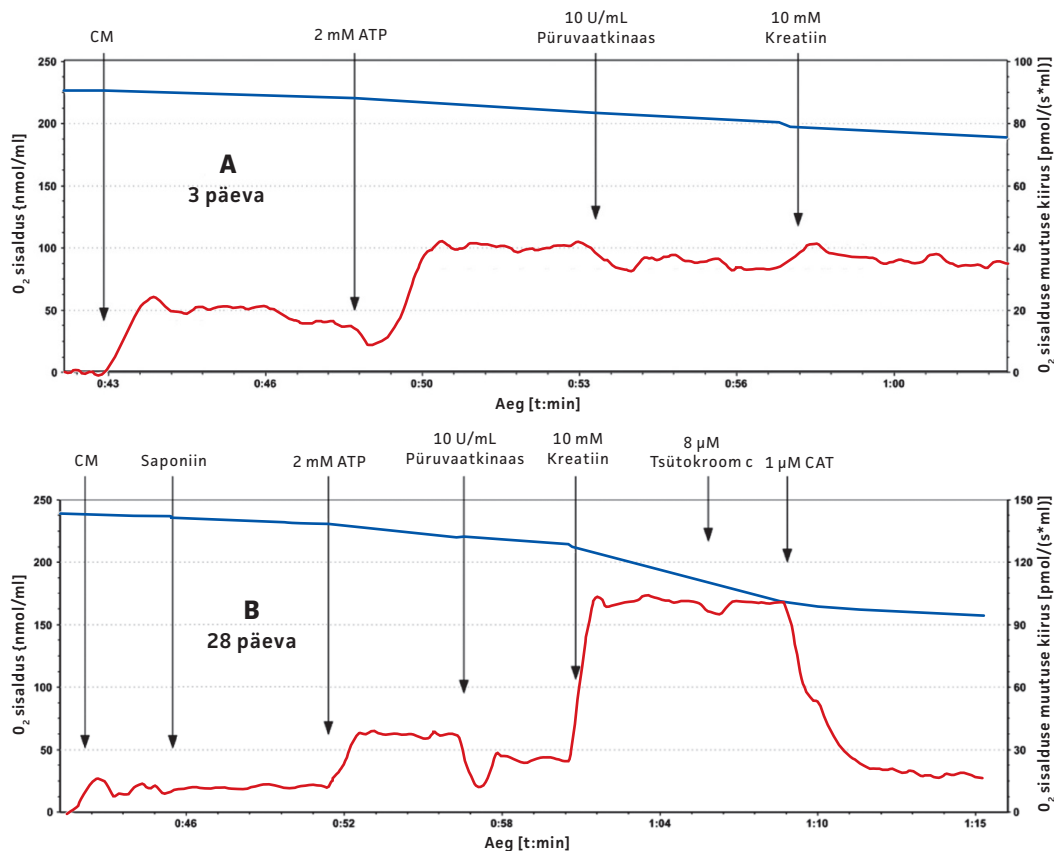


Joonis 3. Muutused mitokondri välismembraani läbitavuses väljastpoolt lisatud ADP jaoks Km(ADP) alusel.

Km(ADP) väärtused arvatati, lähtudes kardiomiotsüütide hapnikutarbimise kiirusest vastavatel ADP kontsentratsioonidel Michaelise-Menteni võrrandi järgi. Km väärtuse kasv näitab, et ADP jaoks tekib difusioonitakistus, mis tuleneb struktureerituse kõrgema astme moodustumisest südameraku postnataalse arengu käigus. Tulemustest nähtub, et kaks ajavahemikku, kus toimub kardiomiotsüütides Km hüppeline kasv, on 21. sünnijärgsel päeval (mitokondrite korrapärase paigutuse teke) ja pärast 56. päeva (aktiveerub ka kreatiinkinaasne energiaülekanne võrgustik).

Uuringust ilmnes, et mitokondrite afiinsus ADP suhtes väheneb sünni järel kiiresti ning sellele osutab näilise Michaelise-Menteni konstandi (Km) väärtuse suurenemine (vt joonis 3). Vahetult pärast sündi (katseloomade vanus 3 päeva) on Km ADP suhtes 75,0 ± 4,5 µM; 21 päeva vanuselt on Km väärtus suurenenud 138,4 ± 11,7 µM ja 84päevaseks on Km saavutanud väärtuse 317 ± 29,5 µM, mis on lähedane täiskasvanud organismi kardiomiotsüütide samale näitajale. Katseloomade kehamassi kasv korreleerub hästi Km kasvu dünaamikaga: pärast 20. päeva kiireneb kehamassi suurenemine järsult (20. päeval 45 g; 40. päeval 150 g), saavutades täiskasvanud loomale tüüpilise suuruse (300–400 g) 60 päeva vanuses.

Katsete käigus mõõdeti ka hingamishela kõigi komplekside aktiivsust, millest nähtub, et nii esimese kui ka teise kompleksi aktiivsus suureneb oluliselt alates 14. päevast. Seejuures on huvitav asjaolu, et esimestel sünnijärgsetel päevadel (1. ja 3. päev) on teise hingamishela kompleksi



Joonis 4. Hapnikutarbimise kiiruse mõõtmised kreatiinkinaasi-fosfokreatiini süsteemi olulisuse määramiseks energiaülekanne regulatsioonis.

Joonis 4A. 3päevased kardiomüotsüüdid. Kreatiini (Cr) lisamisel raku hingamise aktivatsioon puudub.

Joonis 4B. 28päevased rakud, milles Cr lisamisel hapnikutarbimise kiirus kasvab kolm korda. Joonisel tähistab CM kardiomüotsüüte.

Hingamine aktiveeriti ATP juuresolekul, järgnevalt lisatud püruvaatkinaas (PK) vähendab hapnikutarbimist. Hingamiskiiruse langust põhjustab ATPaasil tekkinud ADP regenereerimine PK-fosfoenoolpüruvaadi süsteemi poolt. Seega on oksügraafiliselt ATP tootmisest näha ainult see osa, mis kasutab substraadina mitokondris ringlevat ATPd ja ADPd. Järgnev kreatiini (Cr) lisamine peaks aktiveerima kreatiinkinaasi süsteemi ja näitama sellest tulenevat hingamisaktiivsuse suurenemist. Tsütokroom c (cyt c) lisamisel hapnikutarbimise kiirus ei kasvanud ning see näitab mitokondri välismembraani intaktsust. Karboksüatraktülosiidi (CAT) lisamisel, mis sulgeb adeniinnukleotiidi translokaasi kanali (ANT) ja katkestab ADP-ATP vahetuse, hapniku tarbimine langeb baastasemele ning see näitab mitokondri sisemembraani intaktsust.

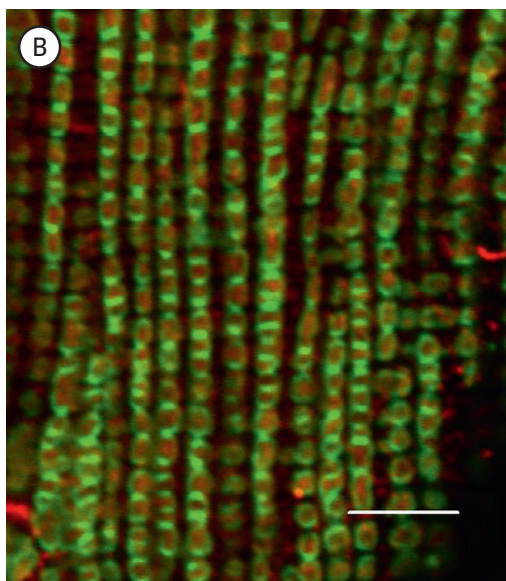
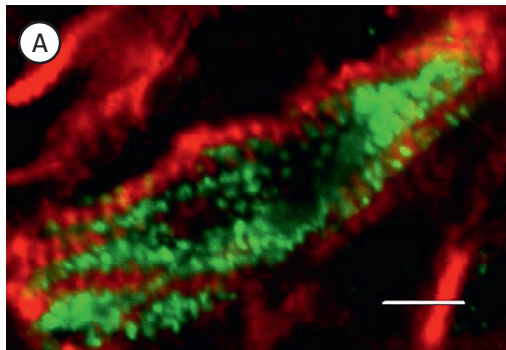
aktiivsus märkimisväärselt suurem kui esimesel kompleksil (kompleks II ja kompleks I suhe on 1,4–1,2). Seejärel suureneb esimese kompleksi suhteline aktiivsus kiiresti ning alates 10. päevast on teise ja esimese kompleksi suhe stabiilselt 0,9 piires.

Mitokondriaalse CK olemasolu kardiomüotsüütide postnataalse arengu jooksul uuriti *Western blot*'i analüüsiga ning MtCK funktsionaalse rolli jälgimiseks energiaülekande moodeti südamerakkude hapnikutarbimist eksogeenselt lisatud tsütosoolset ADPd tarbiva ensüümsüsteemi (PK-PEP süsteem) juuresolekul. Katse toimus tingimustes, kus kardiomüotsüüte sisaldavasse mõõtelahusesse, milles on ka

MgATP, püruvaatkinaas (PK) ja fosfoenoolpüruvaat (PEP), lisatakse kreatiini (Cr), et aktiveerida kreatiinkinaasi süsteem. Nendel tingimustel see osa ADPst, mis asub väljaspool mitokondrit tsütosoolis, regenereeritakse pidevalt PK-PEP süsteemi poolt ATPks. Oksügraafiliselt on näha ainult see osa ATP tootmisest, mis toimub mitokondri sees ringleva ADP ja ATP baasil. Juhul kui MtCK on aktiivne ja toimub otsene ülekande MtCK ja ANT kanali vahel, kasvab oksüdatiivse fosforüülimise kiirus Cr lisamisel ADP ja ATP ringlust võimendava mõju tõttu täiskasvanud südamerakkudes mitmekordseks (22), nagu on näha ka joonisel 4B. Kolmepäevaste rottide südamerakkudes Cr

lisamine hingamiskiirusele mõju ei avalda (vt joonis 4A).

Kasutades konfokaalmikroskoopia meetodit, uurisime mitokondrite ja nende paigutuse ning funktsiooni regulatsiooniga potentsiaalselt seotud tsütoskeleti valkude, täpsemalt tubuliini isovormide (13, 14, 23) rakusisest paigutust. Postnataalsetes rakkudes puudub mitokondritel veel täiskasvanud kardiomiotsüüdile iseloomulik



Joonis 5. Mitokondrite paigutus südamerakus. Mitokondrite visualiseerimiseks on kasutatud mitokondri välismembraani poriinkanali (VDAC) märgistamist antikehaga (joonisel roheline värvusega ala). Tubuliin β II (joonisel värvunud punaseks) märgistamiseks on kasutatud antitubuliin β II primaarset antikeha.

Joonis 5A. 3. sünnijärgne päev: mitokondrite paiknemine rakus on ebaregulaarne ja koondunud tuuma ümbrusesse. Tubuliin on enam jaotunud üle kogu raku ning on märgata esmase korrapärase mustriga algmeid. Skaalajoonele vastab 5 μ m.

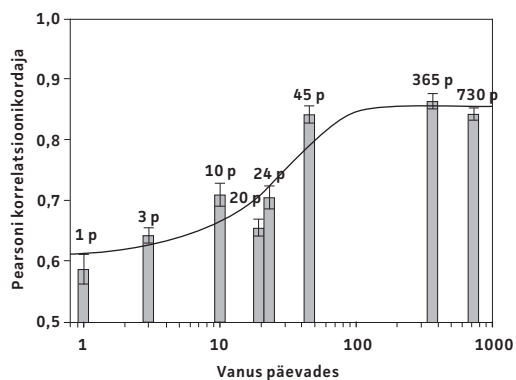
Joonis 5B. Vanus üle 84 päeva: mitokondrid asetsevad korrapärase ridadena müofibrillide vahel. Sarnane paigutus viitab võimalikele funktsionaalsetele vastasmõjudele tubuliini β II isovormi ja mitokondri vahel. Skaalajoonele vastab 10 μ m.

korrapärane asetus ning mitokondrid on paigutatud peamiselt ümber rakutuuma (vt joonis 5A). Samal ajal on müofibrillid ja nende koostisesse kuuluv α -aktiniin asetunud raku perifeeriasse, subsarkolemmaalsesse ruumi. Teisest nädalast alates on näha eraldiseisvate mitokondrite regulaarse paigutuse moodustumist. Täiskasvanud südamerakus on mitokondrid asetunud korrapärase ridadena sarkomeeri A-vöödi joonele (vt joonis 5B) ja nende paigutusmuster on sarnane tubuliin β II omaga.

Uurisime töös täiendavalt kahe, täiskasvanud südamerakkudes tõenäoliselt mitokondritega seotud valgud – tubuliin β II ja α IV – kolokalisatsiooni südamerakkude arengus. Leidsime, et nende valkude omavaheline asetus ning kaugus mitokondritest muutub oluliselt kardiomiotsüütide arengu käigus. Vahetult pärast sündi on tubuliini β II ja α IV isovormid jaotunud raku eri piirkondadesse: α IV paikneb tuuma ümbruses, samal ajal kui β II asub subsarkolemmaalses piirkonnas müofibrillide läheduses. Seevastu täiskasvanud südamerakkudes on mõlemad valgud jaotunud korrapäraselt rakusiseses ruumis ning näha on nende kolokalisatsiooni teke (vt joonis 6).

ARUTELU

Meie labori eelnevas töös südamelihase preparaateid näidati, et sünnijärgse arengu käigus suureneb mitokondrite maksimaalne hingamiskiirus samal ajal ADP



Joonis 6. Tubuliin β II ja α IV kolokalisatsiooni teke südamerakkudes.

Joonisel iseloomustab Pearsoni korrelatsioonikordaja immuunmärgistatud β II ja α IV tubuliini flouresentsi intensiivsuste korrelatsiooni. Joonisel on näha, et pärast 10. päeva toimub kolokalisatsiooni astme tõus, mis on eriti intensiivne pärast 24. päeva. Kahe kuu vanuses (56 päeva) on kattumine valdav. Kardiomiotsüütide vanus on esitatud logaritmilises skaalas.

näilise afiinsuse vähenemisega (Michaelise-Menteni konstant $K_m(\text{ADP})$ kasvab) (24). Sellest saab järeldada, et rakusisene difusioonitakistus ADP suhtes kasvab ning toimub üleminek reguleeritud rakuenergeetikale – väga struktureeritud täiskasvanud südamerakus on $K_m(\text{ADP})$ väärtuseks $360 \pm 51 \mu\text{M}$ (5, 22). Näilise Michaelise-Menteni konstandi väärtus vastsündinud roti südamerakkudes on võrreldes täiskasvanuga pea 5 korda väiksem, kuid ületab siiski oluliselt isoleeritud mitokondrites mõõdetut (K_m 10–20 μM) (22, 25). See näitab, et juba neonataalsetel südamerakkudel võivad esineda mitokondri välismembraanil ADP suhtes difusioonitakistused. Selle põhjuseks on selliste rakusiseste struktuuride olemasolu, mis mitokondri eraldamise käigus purunevad (nt sidemed tsütoskeleti ja mitokondrite vahel) ning seega kaob kontakt välismembraani VDAC ja temaga seostunud regulatiivsete valkude vahel. K_m suurem väärtus vastsündinute südamerakkudes näitab, et mitokondri välismembraani läbitavuse regulatsioon on teatud tasemel olemas kohe pärast sündi.

Ilmnes, et vastsündinud rottide südamerakkude hingamisahela teise kompleksi aktiivsus on suurem kui esimesel ning järgnevalt väheneb teise ja esimese kompleksi aktiivsuse suhe sünni järel kiiresti. Teise kompleksi suur aktiivsus on iseloomulik glükoolüütilistele rakkudele, näiteks HL-1 rakud (surematuks muudetud müokardi rakud) ja teised maliigsed rakud (26, 27). Samuti on näidatud, et I kompleksi aktiivsuse suurendamine vähendab tuumorite kasvukiirust ja metastaseerumist (28). Töö tulemustele tuginedes tuleb hingamisahela komplekside aktiivsust pidada oluliseks näitajaks, mida tasuks uurida ka vananemise käigus ning erinevate haiguslike seisundite korral, kuna teise kompleksi suurem aktiivsus on ilmselt esimene viide häiretele hingamisahelas.

Vaadeldes kreatiinkinaasi süsteemi, näitavad meie tulemused, et kuigi MtCK esineb vähesel määral juba postnataalsetes kardiomyotsüütides, avaldub funktsionaalselt esmane kreatiini ja seega kreatiinkinaasi ülekandevõrgustiku mõju alles pärast 14. päeva. Lõplikult areneb kreatiinkinaasi süsteem välja esimese kahe elukuu jooksul. Umbes 14 päeva jooksul pärast sündi kujuneb välja ka mitokondrite korrapärane paigutus ning hingamise kineetikas

kaasneb sellega $K_m(\text{ADP})$ väärtuse hüppeline kasv (vt joonis 3). Seega võib järeldada, et mitokondrite rakusisesel paigutumisel on võtmetähtsus mitokondrite hingamise afiinsuse ja efektiivse regulatsiooni arengus.

Meie ja teiste laborite eelnevates uurin-gutest on selgunud, et tsütoskeleti koostisesse kuuluv heterodimeerne tubuliin on vastasmõjus mitokondri välismembraani VDACga ja reguleerib selle läbitavust adeniinnukleotiididele (13, 15, 23). Täiskasvanud südamerakus on näha mitokondrite kristallilaadne paigutus: nad asuvad korrapäraselt tubuliin βII läheduses (vt joonis 5B). Töös vaadeldud tubuliini βII ja αIV isovormide paigutuse muutus südamerakkude arengus korreleerub funktsionaalsete muutustega energeetilises metabolismis. Nimetatud tsütoskeleti valkude omavaheline koosinemine ning asetus mitokondrite lähedusse kujuneb täielikult välja alles teiseks elukuuks ning sellega kaasneb mitokondriaalse hapnikutarbimise kineetika ning kreatiinkinaasi energiaülekanne süsteemi lõplik väljakujunemine. Eksperimentide tulemustest võib järeldada, et uuritud tubuliini isovormid osalevad mitokondri paigutuse ja funktsionaalse küpsuse väljakujunemisel.

Töö tulemustest nähtub, et lõplikult väljakujunemata südamerakkudes on energeetiline metabolism ja ülekanne energia-tarbimise kohtadesse ebaefektiivsem ning puudub ka mitokondri sisemuses toimuv ATP ja ADP ringluse võimendav mõju, mida saab oksügraafiliselt hinnata Cr aktivatsiooni tekkena (vt joonis 4). Samas on töös näidatud tsütoskeleti koostisesse kuuluvate valkude olulist rolli täiskasvanud rakule omase EÜ kujunemisel. Saadud tulemused näitavad, et EÜ formeerumise ning struktuuri ja funktsiooni seoste teisenemine on oluline tegur korrektselt toimiva energeetilise metabolismi kujunemisel ning selle häired mängivad tähtsat rolli vananemisel ja teatud südamehaiguste patogeneesis. Südamelihase puudulik reageerimine suurematele koormustele, mis iseloomustab paljusid patoloogilisi seisundeid, ei pruugi tuleneda otseselt puudustest mitokondri töös, vaid mitokondri ja tsütoskeleti valkude vahelise funktsionaalse vastasmõju muutustest.

JÄRELDUSED

Töö tulemused näitavad, et täiskasvanud südamerakule omane korrapärane mito-

kondrite paigutus kujuneb välja keskmiselt 14 päeva jooksul. Samas väheneb mitokondri välismembraani läbitavus eksogeensele ADP-le ning endogeense ADP kättesaadavus PK ja PEP suhtes järk-järgult veel kuni teise elukuuni. Seega on mitokondri VDAC läbitavuse regulatsiooni teke pikaajaline protsess, mis ei ole määratud ainult mitokondrite rakusisese paigutuse väljakujunemise. Uuringu tulemustest võib järeldada, et struktuuri ja funktsiooni vaheliste vastasmõjude olemasolu mitokondrite ja tsütoskeleti komponentides on eelduseks täiskasvanud kardiomiotsüütide energia- ja metabolismi väljakujunemiseks.

TÄNUAVALDUS

Artikliga seotud tööd tehti Eesti Teadusfondi (grant nr 7823) ning Haridus- ja Teadusministeeriumi (grant nr SF0180114Bs08) toetusel.

VÕIMALIKU HUVIKONFLIKTI DEKLARATSIOON

Autorid kinnitavad, et neil puudub huvikonflikt seoses uuringu tegemisega.

SUMMARY

Bioenergetic aspects of postnatal development of cardiac cells: formation of structure-function relationship

Tiia Anmann¹, Minna Varikmaa¹, Kersti Tepp¹, Natalja Timohhina¹, Igor Shevchuk¹, Vladimir Chekulayev¹, Valdur Saks^{1,2} and Tuuli Käämbre^{1,3}

Background and aim. Adult cardiac muscle cells predominantly use mitochondrial oxidative phosphorylation for production of ATP and utilize fatty acids as their main source of reducing power. Mitochondria in cardiac cells are positioned within intermyofibrillar space at the level of A-band in a crystal-like pattern and together with actomyosin system, sarcoplasmic reticulum, cytoskeletal proteins and ion pumps are integrated into structural-functional complex, the Intracellular Energetic Unit (ICEU), which regulates energy production and transport through phosphotransfer network. In perinatal cardiomyocytes regular arrangement of mitochondria is missing, ICEU has not been established and the bioenergetic metabolism and energy transfer regulation are different.

The aim of our study was to investigate the timeline of formation of regular mitochondrial arrangement, functional interactions with cytoskeletal proteins and regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria, characteristic of adult cardiomyocyte. These data could give valuable information about the causes of pathological processes related the deficiencies in the structure-function relationship of cardiac cell bioenergetics.

Methods. Cardiomyocytes were isolated after perfusion of the rat heart with collagenase. Isolated cells were kept on ice during further experiments. Skinned cardiac fibers were isolated according to the method developed by V. Saks and A. Kuznetsov. Bundles of fibers were isolated from endocardial surface of left ventricle. By using sharp-ended needles muscle fibers were separated, leaving only small areas of contact. Fibers were permeabilized with 50 µg/ml saponin for 30 min and then washed to remove metabolites.

The images of the cells and fibers were acquired with Zeiss LSM 510 and Olympus FluoView FV10i-W confocal microscopes, using antibodies from Abcam. The VDAC antibody was a generous gift from Dr. C. Brenner. The rates of oxygen uptake in different conditions were determined with high-resolution respirometer Oxygraph-2K.

Results. Results of this study show that during first postnatal weeks, significant changes in regulation of energy transfer in cardiac cells are taking place. Remodeling of subcellular organization of mitochondria occurs in liaison with shift in cellular metabolism. While localization of mitochondria becomes progressively more organized within cellular interior Michaelis-Menten constant $K_m(\text{ADP})$ for mitochondrial respiration increases from $75,0 \pm 4,5 \mu\text{M}$ (3-day old rat cardiomyocytes) to $317 \pm 29,5 \mu\text{M}$ (84-day old rat cardiomyocytes). This reflects the increased diffusion restrictions for ADP and is a manifestation of higher regulation of energy transfer. Also, activation of mitochondrial creatine kinase - phosphotransfer system was concurrently seen with emergence of tubulin $\alpha 4$ and $\beta 2$ colocalization and formation of regular localization pattern reminiscent to that of mitochondria. Similar to timeline of

¹ Laboratory of Bioenergetics, National Institute of Chemical Physics and Biophysics, Tallinn, Estonia;

² Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, Joseph Fourier University, Grenoble, France;

³ Tallinn University, Institute of Mathematics and Natural Sciences, Tallinn, Estonia

Keywords: mitochondria, bioenergetics, cardiomyocyte, development

Correspondence to: Kersti Tepp
kersti.tepp@kbfi.ee

creatine/phosphotransfer activation the maturation of cellular cytoarchitecture of tubulin α 4 and β 2 tubulin isoforms residing in vicinity of the mitochondria, suggests that both α 4 and β 2 tubulin could participate in regulation of VDAC permeability for adenine nucleotides. Additionally progressive covering of α 4 and β 2 tubulin by mitochondria indicates that these tubulin isoforms could act as directional cues for targeting mitochondria to their specific location.

Conclusions. The results of the study indicate that dynamic changes in the structure of cardiomyocytes during postnatal development are followed by the functional changes. Existence of functional interactions between mitochondria and the components of cytoskeleton in cardiac cells are necessary prerequisites for highly organized metabolic networks, like in adult cardiomyocytes.

KIRJANDUS/REFERENCES

- Williamson JR, Ford C, Illingworth J, et al. Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux. *Circ Res* 1976;38:139-51.
- Balaban RS. Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:832-41.
- Raturi A, Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:213-24.
- Seppet EK, Kaambre T, Sikk P, et al. Functional complexes of mitochondria with Ca,MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:379-95.
- Saks V, Kay L, Sikk P, et al. Intracellular energetic units in muscle cells. *Biophys J* 2001;80:583a.
- Saks V. Molecular system bioenergetics: energy for life. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.
- Dzeja PP, Terzic A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 2003;206:2039-47.
- Timohhina N, Guzun R, Tepp K, et al. Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41:259-75.
- Piquereau J, Novotova M, Fortin D, et al. Postnatal development of mouse heart: formation of energetic microdomains. *J Physiol* 2010;588:2443-54.
- Porter GA, Jr., Hom J, Hoffman D, et al. Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. *Prog Pediatr Cardiol* 2011;31:75-81.
- Fischer A, Ten Hove M, Sebag-Montefiore L, et al. Changes in creatine transporter function during cardiac maturation in the rat. *BMC Dev Biol* 2010;10:70.
- Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56:130-40.
- Monge C, Beraud N, Kuznetsov AV, et al. Regulation of respiration in brain mitochondria and synaptosomes: restrictions of ADP diffusion in situ, roles of tubulin, and mitochondrial creatine kinase. *Mol Cell Biochem* 2008;318:147-65.
- Karu-Varikmaa M, Metsis M, Guzun R, et al. Investigation of interactions between mitochondrial creatine kinase and ATP/ADP channel. *FEBS Journal* 2011;278:374-5.
- Pedersen PL. Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 2008;40:123-6.
- Dzeja PP, Hoyer K, Tian R, et al. Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency. *J Physiol* 2011;589:5193-211.
- Webster DR. Microtubules in cardiac toxicity and disease. *Cardiovasc Toxicol* 2002;2:75-89.
- Saks VA, Belikova YO, Kuznetsov AV. In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* 1991;1074:302-11.
- Gnaiger E. Oxygen solubility in experimental media. *OROBOROS Bioenergetics Newsletter MiPNet* 63, Innsbruck, Austria 2001.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, et al. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-76.
- Rothen-Rutishauser BM, Ehler E, Perriard E, et al. Different behaviour of the non-sarcomeric cytoskeleton in neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:19-31.
- Guzun R, Timohhina N, Tepp K, et al. Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells in situ. Importance of system level properties. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:1089-105.
- Rostovtseva TK, Sheldon KL, Hassanzadeh E, et al. Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18746-51.
- Tiivel T, Kadaya L, Kuznetsov A, et al. Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo. *Mol Cell Biochem* 2000;208:119-28.
- Jacobus WE, Saks VA. Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 1982;219:167-78.
- Puurand M, Peet N, Piirsoo A, et al. Deficiency of the complex I of the mitochondrial respiratory chain but improved adenylate control over succinate-dependent respiration are human gastric cancer-specific phenomena. *Mol Cell Biochem* 2012;370:69-78.
- Guzun R, Karu-Varikmaa M, Gonzalez-Granillo M, et al. Mitochondria-cytoskeleton interaction: distribution of beta-tubulins in cardiomyocytes and HL-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807:458-69.
- Santidrian AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, et al. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest* 2013;123:1068-81.
- Saks V, Kuznetsov AV, Gonzalez-Granillo M, et al. Intracellular Energetic Units regulate metabolism in cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:419-36.