

АДЕНИННУКЛЕОТИДТРАНСЛОКАЗА В МИТОХОНДРИЯХ БУРОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ: СОДЕРЖАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Ирина Геннадьевна ШАБАЛИНА^{1, 2}, Татьяна Владимировна КРАМАРОВА²,
Людмила Ивановна КРАМАРОВА^{2, 3}, Барбара КЭННОН², Ян НИДИРГАРД²

¹НИИ биохимии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

²Веннер-Грен Институт, Аррениус Лаборатории F3, Стокгольмский университет
SE-106 91 Стокгольм, Швеция

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
142290, г. Пущино, ул. Институтская, 3

Содержание адениннуклеотидтранслоказы (АНТ) в митохондриях бурой жировой ткани (БЖТ) было определено и сопоставлено с содержанием F1Fo-АТФ-синтетазы. На выделенных митохондриях бурого жира были изучены окислительное фосфорилирование и разобщение, индуцированное жирными кислотами. Специфичный ингибитор АНТ, карбоксиатрактант (КА), был использован для определения степени вовлечения АНТ в процессы. Данные, полученные на митохондриях БЖТ, сравнивали с данными, полученными на печени, функционирование в которой АНТ было изучено ранее. Изменения в содержании АНТ в БЖТ обсуждаются нами в связи с изменением уровня апоптоза в этой ткани. Использование мышей, нокаутных по белку-разобщителю (UCP1), позволило определить адаптивные изменения в функционировании АНТ и пролить свет на вопросы его регуляции.

Ключевые слова: митохондрии бурой жировой ткани, адениннуклеотидтранслоказа, белок-разобщитель (UCP1), F1Fo-АТФ-синтетаза, окислительное фосфорилирование, разобщение жирными кислотами, апоптоз.

Общеизвестно, что митохондрии — это энергетические станции клетки, продуцирующие высокоэнергетическое вещество АТФ. Адениннуклеотидтранслоказа (АНТ) осуществляет перенос АДФ и АТФ через внутреннюю мембрану митохондрий и вместе с другими компонентами фосфорилирующей системы митохондрий (F1Fo-АТФ-синтетаза и переносчиком фосфата) обеспечивает продукцию АТФ [1–3]. Кроме участия в окислительном фосфорилировании, АНТ может участвовать в митохондриальном разобщении (увеличении протонной проводимости внутренней мембраны, приводящем к рассеиванию мембранного потенциала и увеличению поглощения кислорода) [4–7]. В частности, было показано, что АНТ может способствовать процессу разобщения в митохондриях печени, сердца и скелетной мускулатуры грызунов и птиц в условиях воздействия холода [1, 8, 9]. И, наконец, как компонент неспецифической поры митохондрий АНТ может принимать участие в апоптозе [1, 2].

Среди митохондрий всех тканей организма митохондрии бурой жировой ткани (БЖТ) уникальны по своей специализации и направлены не на продукцию АТФ, а на выработку тепла [10]. Специализация обеспечивается высокой активностью белка-разобщителя (UCP1) и очень низким содержанием F1Fo-АТФ-синтетазы [3, 11]. У мышей, нокаутных по UCP1, значительно нарушена теплопродукция [10, 12], хотя при определенных условиях альтернативные источники тепла могут быть активированы [13], в том числе и предположительно через АНТ [7]. БЖТ также интересна своей способностью легко регулировать уровень апоптоза при адаптации животных к различным температурам окружающей среды и в зависимости от потребности в теплопродукции [14]. Недавно функциональная БЖТ была неожиданно обнаружена у взрослых людей (ранее считалось, что БЖТ есть только у новорожденных) [15], и изучение механизмов функционирования этой ткани в настоящее время особенно актуально.

Шабалина И.Г. — к.б.н., старш.н.с. лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий НИИ биохимии СО РАМН и ведущ.н.с. Веннер-Грен Института,
e-mail: Irina.shabalina@wgi.su.se

Крамарова Т.В. — к.б.н., н.с. Веннер-Грен Института, e-mail: Tatiana.kramarova@ki.se

Крамарова Л.И. — к.б.н., старш.н.с. Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
e-mail: lkramarova@rambler.ru

Кэннон Б. — проф. физиологии, директор Веннер-Грен Института, e-mail: Barbara.cannon@wgi.su.se

Нидиргард Я. — проф. физиологии, Аррениус Лаборатории F3, Веннер-Грен Институт,
e-mail: jan@metabol.su.se

Содержание, функция и регуляция АНТ в митохондриях БЖТ малоизучены [7], хотя последние представляют собой уникальный объект изучения, так как все разнообразные потенциальные функции АНТ (окислительное фосфорилирование, разобщение и апоптоз) в БЖТ могут быть значительно модифицированы по сравнению с другими тканями. Целью нашей работы явилось исследование: 1) содержания F1Fo-АТФ-синтетазы и АНТ в бурых жировых митохондриях, 2) участия АНТ в разобщении, индуцированном жирными кислотами у мышей, нокаутных по UCP1 и 3) корреляции содержания АНТ и уровня апоптоза.

Материал и методы

В работе использовались UCP1-нокаутные мыши, UCP1(–/–) (потомки мышей, описанных ранее в работе [12], были подвергнуты обратному скрещиванию с линией мышей C57Bl/6 в течение 10 генераций и после скрещивания поддерживались как линии UCP1(–/–), и UCP1(+/-) (дикий тип, ДТ). Воду и пищу (R70 Standard Diet, Lactamin) давали в достаточном количестве. Животные содержались при температуре 24 °С и при фотопериоде, заключающемся в чередовании 12 часов света и 12 часов темноты. Для экспериментов использовались самцы мышей в возрасте 8–12 недель. Эксперименты были одобрены специальным комитетом по этике содержания и уходу за животными («Animal Ethics Committee of the North Stockholm region»).

Митохондрии из БЖТ и печени выделяли методом дифференциального центрифугирования, как было описано в статье [11]. Для выделения митохондрий использовали раствор, содержащий 250 мМ сахарозы, 20 мМ K⁺-TES, 1 мМ ЭДТА и 0,3 % (вес/объем) свободного от жирных кислот бычьего сывороточного альбумина (БСА). Осадок, полученный после центрифугирования, ресуспендировали в первоначальном буфере без альбумина. Конечную суспензию митохондрий хранили на льду и использовали в эксперименте по измерению потребления кислорода не более 4 часов. Концентрацию белка в митохондриях измеряли с использованием флуорескамина [11].

Скорость потребления кислорода регистрировали при помощи кислородного электрода Кларка («Yellow Springs Instrument Co.»), в закрытой камере, при температуре 37 °С [11]. Митохондрии в конечной концентрации 0,5 мг белка/мл добавляли к 1,1 мл инкубационной среды (125 мМ сахарозы, 20 мМ K⁺-TES (pH 7,2), 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 0,1 % свободного от жирных кислот БСА, 4 мМ фосфата калия) при непрерывном перемешивании. В качестве субстрата использовали 5 мМ пировата и 3 мМ малата. В качестве разобщителей применяли спиртовые (50%-ные) растворы фирменных («Sigma Chemical Co», США) препаратов натриевой соли олеиновой кислоты и FCCP (carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone).

Конечная концентрация спирта менее 0,1 % не оказывала влияния на изучаемые параметры. 1 мМ ГДФ (натриевая соль) использовался для ингибирования UCP1 [11]. 1 мкМ карбоксиатрактант («Calbiochem-Novobiochem Co»), прежде чем быть использованным в эксперименте по разобщению, был проверен на способность полного ингибирования окислительного фосфорилирования в митохондриях печени. Активность фосфорилирования определялась как максимальная скорость потребления кислорода митохондриями после добавления 250 мкМ АДФ минус скорость дыхания, нечувствительного к 3 мкг/мл олигомицину. Базальное дыхание измерялось в присутствии 3 мкг/мл олигомицина и 1 мМ ГДФ. Разобщение жирными кислотами определялось как скорость поглощения кислорода в присутствии 3 мкг/мл олигомицина, 1 мМ ГДФ и 70 мкМ олеата Na.

Аликвоты свежeweделенных суспензий митохондрий, к которым были добавлены ингибиторы протеаз («Complete Mini, Roche») хранили при –80 °С. Белок в образцах после их размораживания определяли по методу Лоури. Образцы митохондрий разделяли с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS) и переносили на мембрану PVDF. На каждую дорожку SDS-полиакриламидного геля наносили белки митохондрий разных животных (15 мкг белка на дорожку). В качестве первичных антител использовали поликлональные антитела против АНТ («Santa Cruz Biotech», sc-9299; разведение 1:500). Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, были антикозьи в разведении 1:2000 («DAKO»). Эти же мембраны после удаления связанных первичных антител АНТ горячим раствором мочевины и SDS инкубировали с первичными моноклональными антителами против субъединицы F1Fo-АТФ-синтетазы («Molecular Probes»), в разведении 1:2000 и затем с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (антимышинные, разведение 1:2000, «Cell Signalling»). Иммунные комплексы детектировали методом хемилюминесценции. Количественную обработку проводили с использованием программного обеспечения «Image Gauge v. 3.45» («FujiFilm», Япония). Среднее содержание белка в митохондриях печени было взято за 100 %, и содержание белка на каждой дорожке иммуноблота было выражено в процентах относительно этого. Подобный иммуноблот-анализ был проведен несколько раз, и в статистический анализ были включены данные со всех блотов (*n* означает число индивидуальных выделений митохондрий).

Уровень апоптоза в гомогенатах БЖТ оценивали по уровню цитоплазматических фрагментов ДНК, связанных с гистонами и определяемых методом иммуноферментного анализа («Cell Death Detection ELISA^{plus}», «Roche Mannheim», Германия). Измерение оптической плотности проводи-

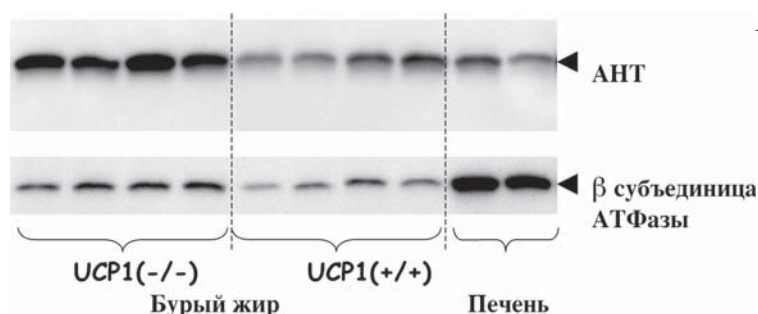


Рис. 1. Иммуноблот-анализ митохондрий, выделенных из бурой жировой ткани мышей дикого типа ($UCP1^{+/+}$) и мышей, нокаутных по $UCP1$ ($UCP1^{-/-}$), и из печени мышей дикого типа. Количественная оценка иммуноблота была произведена, как описано в «Материале и методах», и совокупные данные с нескольких иммуноблот-анализов представлены в таблице.

ли при 405 нм на спектрофотометре «Labsystems Multiscan Plus». В качестве контроля использовали коммерческий субстратный раствор.

Для сравнения двух групп использовали t -критерий Стьюдента. Данные выражены как величина средней \pm стандартная ошибка средней.

Результаты и обсуждение

Присутствие митохондриальных белков АНТ и F1Fo-АТФ-синтетазы и их количество было проанализировано методом иммуноблоттинга (рис. 1). Как и ожидалось, содержание F1Fo-АТФ-синтетазы в митохондриях БЖТ ниже, чем в митохондриях печени более чем в 5 раз (рис. 1, табл.), что соответствует ранее полученным нами данным [3]. Однако количество АНТ в митохондриях как БЖТ, так и печени было одинаково (рис. 1, табл.). Таким образом, пониженное содержание F1Fo-АТФ-синтетазы не влечет за собой соответствующего уменьшения уровня АНТ. Также было обнаружено, что содержание АНТ в митохондриях БЖТ у мышей, нокаутных по $UCP1$, в два раза выше по сравнению с мышами дикого типа (рис. 1, табл.), что, возможно, предполагает более высокие уровни фосфорилирования или разобщения, опосредованного АНТ в этих митохондриях.

Функциональную активность митохондрий определяли по скорости поглощения кислорода (рис. 2). Митохондрии из БЖТ мышей дикого типа реагируют на добавку субстрата дыхания очень высоким увеличением скорости поглощения

кислорода, которое ингибируется ГДФ (рис. 2, Б), известным ингибитором $UCP1$ [11]. Такая активность митохондрий БЖТ отражает функционирование $UCP1$ [10–12] и не наблюдается в митохондриях БЖТ мышей, нокаутных по $UCP1$ (рис. 2, В). $UCP1$ экспрессируется исключительно в БЖТ [10], поэтому митохондрии печени поглощают кислород с низкой скоростью в присутствии субстрата (подобно нокаутным по $UCP1$), но значительно активируются в присутствии АДФ и ингибируются в присутствии олигомицина (рис. 2, А), отражая активность фосфорилирующей системы митохондрий (табл.). В отличие от митохондрий печени, митохондрии БЖТ мышей дикого типа реагируют на добавку АДФ небольшим увеличением скорости поглощения кислорода (рис. 2, Б), что согласуется с полученными нами ранее данными [3]. Однако несмотря на значительное увеличение содержания АНТ и некоторое повышение содержания F1Fo-АТФ-синтетазы (рис. 1), митохондрии БЖТ мышей, нокаутных по $UCP1$, активируются в присутствии АДФ в недостаточно высокой степени (рис. 2, В, табл.). Если сравнить данные, полученные при исследовании дыхания (рис. 2, табл.) и результаты, показывающие экспрессию белка АНТ (рис. 1), становится очевидным, что между ними нет простой корреляции. Таким образом, вопрос о функциональном значении избыточного содержания АНТ, не задействованного в окислительном фосфорилировании в митохондриях БЖТ, остается открытым.

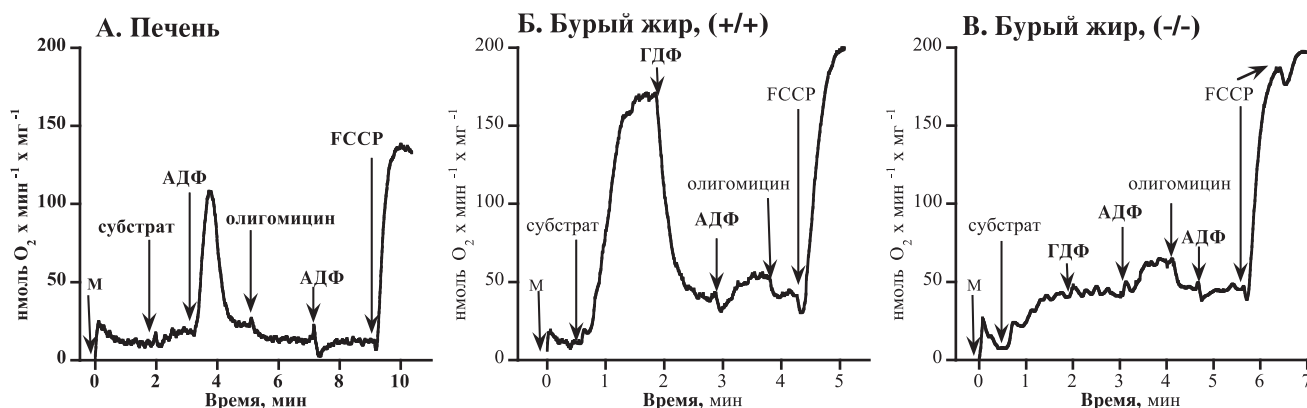


Рис. 2. Кривые поглощения кислорода митохондриями печени (А) и митохондриями, выделенными из бурой жировой ткани мышей дикого типа (+/+), (Б) и мышей, нокаутных по $UCP1$ (-/-) (В).

Мы предположили существование количественной зависимости разобщения, опосредованного АНТ, от содержания АНТ в митохондриях БЖТ, как это ранее было показано для других тканей [4, 9]. Вопрос об уровне разобщения, опосредованном АНТ, особенно важен для мышей, нокаутных по UCP1, потому что этот механизм может поддерживать производство тепла у данных животных, согласно обсуждаемой ранее гипотезе [7–9]. В частности, это было показано на митохондриях печени сусликов, находившихся в состоянии зимней спячки и во время кратковременных пробуждений [16].

Для анализа данного эффекта, опосредованного АНТ в митохондриях бурого жира, и сравнения с митохондриями печени, мы исследовали действие специфического ингибитора АНТ, карбоксиатрактилата (КА), используя подходы, описанные ранее [1, 4, 7]. Сначала мы исследовали эффект КА на базальное дыхание митохондрий печени (не стимулированное никакими добавками предполагаемых активаторов АНТ). Как и ожидалось, КА его не ингибировал (табл.), и это находится в соответствии с косвенными данными, полученными в более ранних экспериментах [4]. Очень необычно то, что мы обнаружили четкий эффект КА на базальное дыхание митохондрий бурого жира мышей ДТ и UCP1-нокаутных мышей (табл.). Скорости базального дыхания (в присутствии ГДФ) не различались в этих двух типах митохондрий бурого жира, а КА-чувствительная часть была несколько меньше в митохондриях UCP1-нокаутных мышей по сравнению с митохондриями мышей ДТ (табл.). Природа базальной утечки протонов в митохондриях не вполне понятна; фосфолипидный состав митохондриальных мембран, а также специфические белки (включая АНТ) обсуждаются в работах [6, 7, 17]. Можно также предположить присутствие эндогенного стимулятора АНТ в выделенных митохондриях БЖТ (или его отсутствие в митохондриях печени). Известно, что для участия в разобщении АНТ может быть модифицирована активаторами разной природы: длинноцепочечными ацил-КоА [1, 5], апобелком липопотеинов [18], перекисями липидов [19] и жирными кислотами [4, 7–9]. Настоящий эксперимент проводился в присутствии больших концентраций обезжиренного БСА, и на основе проведенных нами ранее измерений [11] большинство вышеперечисленных веществ могут быть исключены из числа потенциальных эндогенных активаторов. Таким образом, природу высокого базального дыхания, чувствительного к КА, в митохондриях БЖТ еще предстоит выяснить.

В качестве экзогенных потенциальных активаторов мы выбрали жирные кислоты, разобщение которыми на митохондриях, выделенных из БЖТ нокаутных по UCP1 мышей, было нами продемонстрировано ранее [7–11]. Природа и возможная функция этого разобщения неизвестна, но

возможность участия АНТ обсуждалась [7]. В нашей контрольной системе (митохондрии печени) КА значительно снижал дыхание, стимулированное олеатом (табл.), что совпадало с рядом более ранних наблюдений [4, 7, 16]. Как видно из таблицы, около 50 % общего ответа на жирные кислоты в этих митохондриях опосредовалось АНТ. Мы также идентифицировали компонент разобщения, опосредованного АНТ и индуцированного жирными кислотами в митохондриях бурого жира из мышей ДТ (содержащих UCP1) и из мышей, нокаутных по UCP1 (табл.). И этот компонент в митохондриях мышей, нокаутных по UCP1, не увеличивался, как мы предполагали, а был меньше, чем в митохондриях БЖТ мышей ДТ, и даже меньше, чем в митохондриях печени (табл.). Таким образом, мы не получили доказательств того, что в отсутствие нормального UCP1-зависимого термогенеза разобщение, индуцированное жирными кислотами и опосредованное АНТ, увеличивается в качестве компенсаторного процесса, то есть этот процесс не имеет термогенного потенциала в митохондриях бурого жира, несмотря на увеличение общего белка АНТ.

Так же, как и окислительное фосфорилирование (рис. 2), другие функции митохондрий (базальное дыхание и разобщение, стимулированное жирными кислотами), опосредованные АНТ (табл.), не соответствуют содержанию АНТ (рис. 1). Так как уровни АНТ в печени и митохондриях бурого жира мышей ДТ идентичны (рис. 1), то можно было ожидать, что в этих тканях функции, опосредованные АНТ, должны совпадать, однако они различаются (табл.). Более того, так как количество АНТ удвоено в митохондриях БЖТ мышей, нокаутных по UCP1, то функции, опосредованные АНТ, также должны быть удвоены, однако они стали даже меньше (табл.). Таким образом, вопрос о функциональной значимости повышенного уровня белка АНТ в митохондриях бурого жира из UCP1-нокаутных мышей по сравнению с БЖ из мышей ДТ (рис. 1) остается открытым и требует дальнейшего анализа. Механизмы контроля экспрессии гена *ant*, кодирующего информацию о белке АНТ, всесторонне не исследовались. Было показано, что в ткани сердца они могут контролироваться гормонами щитовидной железы [20]. Мы считаем наиболее вероятным, что экспрессия гена *ant* в БЖТ, как и митохондриогенез, находится под контролем адренергической системы [10]. Соответственно, увеличенный уровень экспрессии гена *ant*, обнаруженный у нокаутных по UCP1 мышей может быть результатом увеличенной адренергической стимуляции ткани, вытекающей из физиологической системы обратной связи, пытающейся активировать ткань, неактивную в плане термогенеза.

Ранее нами было показано, что увеличенная адренергическая стимуляция у мышей дикого типа, акклиматизированных к холоду, приводила

Таблица

Содержание белков и функции митохондрий, характеризующие состояние адениннуклеотидтранслоказы в бурой жировой ткани и печени

Параметры	Печень (n = 4)	Бурая жировая ткань	
		Дикий тип (n = 7)	UCP1-нокауты (n = 7)
Содержание F1Fo-АТФ-синтетазы в митохондриях, % от среднего содержания в печени	100,7 ± 2,4*	15,7 ± 1,4	23,9 ± 2,4*
Содержание АНТ в митохондриях, % от среднего содержания в печени	100,1 ± 4,4	98,0 ± 3,4	219,1 ± 10,4*
Активность фосфорилирования нмоль O ₂ × мин ⁻¹ × мг белка ⁻¹	97,2 ± 9,1*	17,1 ± 2,2	23,2 ± 6,0
Базальное дыхание, нмоль O ₂ × мин ⁻¹ × мг белка ⁻¹	16,6 ± 1,2*	44,6 ± 2,7	46,3 ± 4,5
Эффект карбоксиатрактилата (КА) на базальное дыхание, (базальное – базальное + КА), нмоль O ₂ × мин ⁻¹ × мг белка ⁻¹	0,1 ± 0,0*	12,3 ± 2,7	4,2 ± 1,5*
Разобщение стимулированное олеатом, нмоль O ₂ × мин ⁻¹ × мг белка ⁻¹	28,0 ± 2,2*	109,6 ± 13,6	39,4 ± 2,8*
Эффект карбоксиатрактилата на разобщение стимулированное олеатом (олеат – олеат + КА), нмоль O ₂ × мин ⁻¹ × мг белка ⁻¹	14,6 ± 1,4*	22,2 ± 3,0	10,6 ± 0,9*

Примечания: UCP1 не экспрессируется в печени, и разницы между параметрами ДТ и нокаутов не было выявлено, поэтому данные по UCP1-нокаутам и ДТ объединены для печени. Эффект карбоксиатрактилата выражен как вызванное им снижение скорости дыхания митохондрий в нестимулированном (базальном) состоянии (базальное + КА) или в стимулированном олеатом состоянии (олеат + КА). Число индивидуальных выделений митохондрий обозначено как n (для митохондрии печени использовалась печень из одной мыши, для митохондрий БЖТ – пул тканей из 4-5 мышей). * – статистически достоверное (P < 0,01) отличие от митохондрий БЖТ дикого типа.

к уменьшению уровня апоптоза в бурой жировой ткани [14]. В предварительных экспериментах мы обнаружили, что по сравнению с мышами дикого типа у животных, нокаутных по UCP1 и акклиматизированных к холоду, значительно повышен уровень апоптоза в БЖТ (результаты не показаны). Когда данные по выраженности апоптоза были сопоставлены с данными по повышенному содержанию АНТ у этих мышей (рис. 1), было обнаружено хорошее соответствие. Этот факт открывает новые аспекты в механизмах как контроля апоптоза, так и пролиферации и роста БЖТ.

Таким образом, в настоящем исследовании показано следующее: 1) АНТ в митохондриях БЖТ находится в избыточном количестве, большем, чем это необходимо для окислительного фосфорилирования; 2) разобщение, опосредованное АНТ, не активируется в митохондриях у мышей с нарушенной теплопродукцией (нокаутных по UCP1),

что ставит гипотезу об АНТ как дополнительном источнике тепла под сомнение; 3) повышенное содержание АНТ в БЖТ, возможно, индуцирует высокий уровень апоптоза и служит регулятором массы и, как следствие, функции данной ткани.

Благодарности

Эта работа была финансирована советом Шведской академии наук и Европейской программой «Dlarfid», «Липиды как фактор риска в развитии организма».

Список литературы

1. Шабалина И.Г., Колпаков А.Р., Соловьев В.Н. и др. Роль переносчика адениннуклеотидов в регуляции энергизации и ионной проводимости митохондрий печени при воздействии холода на крыс // Биохимия. 1995. 60. (3). 432–440.

Shabalina I.G., Kolpakov A.R., Solovyov V.N. et al. Role of ATP/ADP-antiporter in regulation of

energization and ion permeability of liver mitochondria from cold-exposed rats // *Biochemistry (Moscow)*. 1995. 60. (3). 317–322.

2. Vyssokikh M.Yu., Brdiczka D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis // *Acta Biochim. Pol.* 2003. 50. (2). 389–404.

3. Kramarova T.V., Shabalina I.G., Andersson U. et al. Mitochondrial ATP synthase amount is governed by the c-Fo subunit P1 isoform: overexpression in brown adipose tissue increases F1Fo-ATPase content. // *FASEB J.* 2008. 22. 55–63.

4. Schönfeld P. Does the function of adenine nucleotide translocase in fatty acid uncoupling depend on the type of mitochondria? // *FEBS Lett.* 1990. 264. 246–248.

5. Шабалина И.Г., Панов А.В. Контроль энергизации митохондрий печени на уровне переносчика адениннуклеотидов в условиях низкой тоничности среды инкубации // *Биохимия*. 1991. 56. (3). 439–446.

Shabalina I.G., Panov A.V. Control of the energization of liver mitochondria at the level of the adenine nucleotide transporter under condition of low tonicity of the incubation medium // *Biochemistry (Moscow)*. 1991. 56. (3). 282–287.

6. Brand M.D., Pakay J.L., Oclloo A. et al. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. // *Biochem. J.* 2005. 392. 353–362.

7. Shabalina I.G., Kramarova T.V., Nedergaard J. et al. Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria implies that the adenine nucleotide translocator isoforms Ant1 and Ant2 may be responsible for basal and fatty acid-induced uncoupling, respectively. // *Biochem. J.* 2006. 399. (3). 405–414.

8. Simonyan R.A., Skulachev V.P. Thermoregulatory uncoupling in heart muscle mitochondria: involvement of the ATP/ADP antiporter and uncoupling protein. // *FEBS Lett.* 1998. 436. 81–84.

9. Talbot D.A., Duchamp C., Rey B. et al. Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. // *J. Physiol.* 2004. 558. 123–135.

10. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. // *Physiol. Rev.* 2004. 84. 277–359.

11. Shabalina I.G., Jacobsson A., Cannon B. et al. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids // *J. Biol. Chem.* 2004. 279. 38236–38248.

12. Enerbäck S., Jacobsson A., Simpson E.M. et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. // *Nature*. 1997. 387. 90–94.

13. Aydın J., Shabalina I.G., Place N. et al. Nonshivering thermogenesis protects against defective calcium handling in muscle // *FASEB J.* 2008. 22. 3919–3924.

14. Lindquist J.M., Rehnmark S. Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival // *J. Biol. Chem.* 1998. 273. (46). 30147–30156.

15. Nedergaard J., Bengtsson T., Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult human // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. 293. E444–E452.

16. Brustovetsky N.N., Amerkanov Z.G., Yegorova M.E. et al. Carboxyatractyloside-sensitive uncoupling in liver mitochondria from ground squirrels during hibernation and arousal // *FEBS Lett.* 1990. 272. 190–192.

17. Oclloo A., Shabalina I.G., Nedergaard J. et al. Cold-induced alterations of phospholipid fatty acyl composition in brown adipose tissue mitochondria are independent of uncoupling protein-1 // *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 2007. 293. R1086–R1093.

18. Панин Л.Е., Шалбуева Н.И., Колпаков А.Р. и др. Участие переносчика адениновых нуклеотидов в механизме снижения трансмембранного потенциала митохондрий печени крысы под влиянием аполипопротеина С // *Биологические мембраны*. 2001. 18. (5). 400–405.

Panin L.E., Shalbuева N.I., Kolpakov A.R. et al. Involvement of adenine nucleotide carrier in the mechanism of the apolipoprotein C induced decrease of membrane potential in rat liver mitochondria // *Membr. Cell. Biol.* 2001. 14. (6). 783–789.

19. Khailova L.S., Prikhodko E.A., Dedukhova V.I. et al. Participation of ATP/ADP antiporter in oleate- and oleate hydroperoxide-induced uncoupling suppressed by GDP and carboxyatractyloside // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. 1757. (9–10). 1324–1329.

20. Dummier K., Muller S., Seitz H.J. Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues // *Biochem. J.* 1996. 317. 913–918.

ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCASE IN BROWN ADIPOSE TISSUE: CONTENT AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE

Irina Gennadievna SHABALINA^{1, 2}, Tatiana Vladimirovna KRAMAROVA², Ludmila Ivanovna KRAMAROVA^{2, 3}, Barbara CANNON², Jan NEDERGAARD²

¹*Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov st., 2*

²*The Wenner-Gren Institute, The Arrhenius Laboratories F3, Stockholm University
SE-10691 Stockholm, Sweden*

³*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS
142290, Pushchino, Institutskaya st., 3*

In mitochondria from brown adipose tissue (BAT), content of adenine nucleotide translocase (ANT) has been examined and compared with content of F1Fo-ATP synthase. Oxidative phosphorylation and uncoupling induced by fatty acids were studied in isolated brown-fat mitochondria. Specific inhibitor of ANT, carboxyatractylate (CAtr) was used for identification of ANT-mediated part of processes. Data obtained in BAT were compared with the results obtained in liver as tissue where ANT function has earlier been investigated. Changes in content of ANT in BAT have also been discussed in connection with the changes in the level of apoptosis in this tissue. The use of uncoupling protein 1 (UCP1) knockout mice helped us to elucidate possible adaptive changes in ANT function and to understand the problem of its regulation.

Key words: brown adipose tissue mitochondria, adenine nucleotide translocase, uncoupling protein 1 (UCP1), FoF1-ATP-synthase, oxidative phosphorylation, fatty acids-induced uncoupling, apoptosis.

Shabalina I.G. — candidate of biological sciences, senior researcher at laboratory of molecular mechanism of intercellular interaction, Scientific Research Institute of Biochemistry of SB RAMS and project leader at the Wenner-Gren Institute, e-mail: Irina.shabalina@wgi.su.se

Kramarova T.V. — candidate of biological sciences, postdoctoral scientist, Institute of the Wenner-Gren Institute, e-mail: Tatiana.kramarova@ki.se

Kramarova L.I. — candidate of biological sciences, senior researcher, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, e-mail: lkramarova@rambler.ru

Cannon B. — professor of physiology, head of the Wenner-Gren Institute, e-mail: Barbara.cannon@wgi.su.se

Nedergaard J. — professor of physiology, the Arrhenius Laboratories F3, Wenner-Gren Institute, e-mail: jan@metabol.su.se