

ПРИНЦИПЫ КОНТРОЛЯ ЗА ФОРМИРОВАНИЕМ СТРУКТУР, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

©2009 г.

В. Н. ЛУЗИКОВ*

*Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Формирование белковых комплексов и суперкомплексов внутренней митохондриальной мембраны. III. Контроль состава энзиматических комплексов внутренней митохондриальной мембраны. IV. Общие принципы контроля за формированием структур, осуществляющих дыхательные функции митохондрий. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Топогенез митохондриальных белков является частью биогенеза митохондрий – клеточных органелл, обеспечивающих энергетические потребности клетки и выполняющих ряд ее метаболических функций [1]. В последние годы митохондриям приписывают важную роль в осуществлении запрограммированной смерти клетки (апоптоза) [2].

Топогенез митохондриальных белков включает в себя их синтез в цитоплазме и митохондриях, их транспорт через наружную и внутреннюю мембраны, распределение их между митохондриальными компартментами (сортинг) и образование белковых комплексов разного назначения. Посредством этих комплексов осуществляются транспортные функции, перенос электрона через дыхательную цепь, создание трансмембранного электрохимического потенциала, окислительное фосфорилирование ADP в АТФ и т.д. [3].

В настоящем обзоре сделана попытка подчеркнуть две основные мысли. Во-первых, то, что митохондрия устроена (компаратмен-

* Редакционная коллегия выражает глубокую благодарность академику А.А.Богданову за редактирование представленного обзора.

Адрес для корреспонденции: bogdanov@genebee.msu.su

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 00-15-97942, 02-04-48204, 05-04-48049).

тализована) единственно возможным способом, позволяющим ей выполнять главные функции. Во-вторых, для выполнения этих функций требуется специальный контроль за формированием деталей митохондриальных структур и органеллы в целом. Благодаря этим двум свойствам митохондрия обладает способностью поддерживать трансмембранный потенциал на внутренней мембране. Такими уникальными свойствами в клетке обладает только митохондрия.

Основную массу митохондриальных белков составляют растворимые белки матрикса и некоторые белки внутренней мембраны митохондрии, синтезирующиеся в цитоплазме. Транспорт этих белков через митохондриальные мембраны в подавляющем большинстве случаев требует положительно заряженных N-концевых аминокислотных последовательностей, которые имеют свойства амфифильных спиралей. Они играют роль уникальных адресующих сигналов. Отщепление этих последовательностей реализуется под действием специфических процессирующих пептидаз.

Транспорт митохондриальных белков из цитоплазмы во внутренний интерьер (матрикс) митохондрии должен осуществляться при сохранении мембранного потенциала. При этом большая группа белков внутренней мембраны импортируется из цитоплазмы с неотделяющимися последовательностями $\Delta\psi$ -зависимым способом, что достигается специфическим расположением тяжей положительно заряженных аминокислотных остатков.

Транспорт белков митохондриального интерьера обслуживается системой пор (белковых транслоконов) внутренней и наружной мембран митохондрии, а также набором вспомогательных транспортных белков.

Выше указывалось, что создание трансмембранного электрохимического потенциала на внутренней митохондриальной мембране и окислительное фосфорилирование ADP в АТФ обеспечиваются компонентами дыхательной цепи, включающими энзиматические комплексы I–IV, и наличием H^+ -АТФазы. Согласно современным данным, из этих комплексов формируются суперкомплексы. В состав дыхательных комплексов может входить до пятидесяти субъединиц. Вся же дыхательная цепь высших эукариот включает в себя около 90 субъединиц [4]. Сам факт наличия такого количества субъединиц делает необходимым жесткий отбор не только неправильно собранных белков, но и неправильно встроенных (включенных) субъединиц, что получило в литературе название «контроля качества белков». Этот контроль реализуется в митохондриях с помощью многочисленных протеиназ, различающихся по своим функциям и локализации.

«Контроль качества белков» касается только индивидуальных белков, но не относится к более сложным белковым образованиям, например, суперкомплексам, каждый из которых обладает собственной энзиматической активностью. В этом случае критерием качества белков является их способность реализовывать интегральную функцию дыхательной цепи. При этом обеспечивается стабильность системы в целом.

Если дыхательный аппарат митохондрии не функционирует или функционирует неверно, то митохондрия подвергается деградации вследствие реализации нескольких различных механизмов разрушения, как то: переваривание отдельных комплексов или микро- и макроавтофагия под действием вакуолярных протеиназ.

Основная цель этой статьи состоит в том, чтобы показать реализацию «принципа отбора по функциональному критерию» и «принципа стабилизации функционированием», сформулированных автором и его сотрудниками более 25 лет назад [5]. Многочисленные данные последних лет подтверждают эти принципы, и здесь они обсуждаются для того, чтобы обозначить возможную линию дальнейших исследований.

II. ФОРМИРОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ И СУПЕРКОМПЛЕКСОВ ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Основную массу белков внутренней митохондриальной мембраны составляют компоненты системы трансформации энергии, включающей дыхательную цепь, H^+ -АТФазу и сопряженные с ней переносчики адениновых нуклеотидов (ААС) и неорганического фосфата. Как указывалось выше, дыхательная цепь состоит из четырех белковых комплексов, катализирующих парциальные реакции переноса электронов (комплексы I, II, III, IV). Вместе с H^+ -АТФазой (комплексом V) они занимают до 40% поверхности внутренней митохондриальной мембраны (печень крысы) [6]. Особенностью системы трансформации энергии является то, что только она включает белки, синтезированные как на цитоплазматических, так и на митохондриальных рибосомах. У млекопитающих комплексы I–V включают до 76 полипептидов. Комплекс I содержит семь продуктов митохондриальных и 38 продуктов ядерных генов; комплекс II включает только четыре продукта ядерных генов; комплекс III представлен одним продуктом, кодируемым в митохондриальном геноме, и десятью – в ядерном геноме; три белка комплекса IV кодируются в митохондриях и 10 белков – в ядре; наконец, в комплексе V находятся два продукта

митохондриального генома и 14 продуктов ядерного генома [7]. В дрожжах *S. cerevisiae* дыхательная цепь и H^+ -АТРаза содержат 34–36 полипептидов (белков), что объясняется отсутствием у них комплекса I и несколько меньшим числом белков, синтезируемых в цитоплазме: у комплекса III 8 белков вместо 10, у комплекса IV 6–8 белков вместо 10 и у комплекса V 8 белков вместо 11 [8]. Ниже будут рассмотрены некоторые аспекты формирования белковых комплексов внутренней митохондриальной мембраны. Особое внимание будет уделено комплексу IV (цитохром *c*-оксидазе), поскольку этот комплекс играет ключевую роль в общей регуляции продуцирования энергии в клетках эукариот [9].

БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ВНУТРЕННЕЙ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ
*Состав, структура и принципы формирования
цитохром c-оксидазы*

Митохондриальная цитохром *c*-оксидаза содержит четыре активных металл-содержащих центра (гем *a*, гем a_3 , Cu_A и Cu_B), погруженных в мультисубъединичный белковый матрикс. В случае дрожжей *S. cerevisiae* последний включает три большие субъединицы (субъединицы I, II и III), синтезируемые в митохондриях, и шесть малых субъединиц (субъединицы IV, Va или Vb, VI, VII, VIIa и VIII), кодируемых ядерными генами *COX4*, *COX5a* или *COX5b*, *COX6*, *COX7*, *COX8* и *COX9*, соответственно. Субъединица I (*COXI*) связывает гем *a* и гем a_3 , а также реакционный центр Cu_B , в то время как субъединица II включает Cu_A -центр и участвует в связывании цитохрома *c*. Субъединица III участвует в протонной проводимости цитохром *c*-оксидазы. Таким образом, три митохондриальные субъединицы фермента несут все каталитические центры фермента, что подтверждается данными рентгеноструктурного анализа при разрешении 2,8Å, полученными для цитохром *c*-оксидазы быка. Из этих же данных, в частности, следует, что фермент содержит по одной копии всех 13 субъединиц [10]. Ранее было показано, что цитохром *c*-оксидаза из *Paracoccus denitrificans* содержит два остатка гема и два Cu -центра при наличии всего двух субъединиц, гомологичных субъединицам I и II фермента из дрожжей [11].

Тем не менее делеции в *COX4*, *COX5a* и *COX6*, *COX7* и *COX9* приводят к полной утрате клеточного дыхания, цитохромов *a* и a_3 и цитохром *c*-оксидазной активности [8]. Согласно современным представлениям, соответствующие субъединицы, кодируемые в ядре, служат для того, чтобы стабилизировать специфические митохондриальные

субъединицы в холоферменте или способствовать формированию каталитического центра холофермента. Среди кодируемых в ядре субъединиц цитохром *c*-оксидазы лишь субъединица VIII не является незаменимой, *Null* мутант по этой субъединице сохраняет до 80% активности фермента дикого типа. Считается, что субъединица VIII играет регуляторную роль при функционировании фермента, влияя на перенос электронов между ним и цитохромом *c* [8].

В случае цитохром *c*-оксидазы сердца быка, этот белок включает 13 субъединиц, из которых три большие субъединицы (I, II, III) с молекулярными массами 51,4, 22,7 и 26,7 кДа, соответственно, синтезируются в митохондриях. Эти субъединицы образуют компактное «ядро», состоящее из 12 трансмембранных спиралей субъединицы I, двух трансмембранных спиралей субъединицы II и семи спиралей субъединицы III. Субъединицы IV–VI с молекулярными массами 0,6–14,7 кДа, синтезируемые в цитоплазме, располагаются по периферии «ядра», оставляя свободную зону для контакта со второй молекулой фермента с образованием димера. Из всех кодируемых в ядре субъединиц цитохром *c*-оксидазы только три не имеют трансмембранных доменов, экспонируясь либо в сторону матрикса, либо в сторону межмембранного пространства. Общее расположение цитоплазматически синтезируемых субъединиц фермента таково, что они группируют во внутренней мембране каталитические субъединицы I, II, III и стабилизируют всю конструкцию в целом [11].

Сборка цитохром *c*-оксидазы осуществляется во внутренней мембране митохондрий и требует участия двух групп вспомогательных белков. Одна из них обеспечивает синтез гема *a* (белки, кодируемые генами *COX10*, *COX15* и *UAH1*), а также включение $Cu_{A,B}$ в молекулу фермента (белки, кодируемые генами *SCO1*, *COX11*, *COX17* и *COX23*). Вторая – необходима для сборки холофермента из субъединиц (кодируют гены *PET100*, *PET117*, *PET191*, *COX14*, *COX16* и др.) [12]. Белки второй группы, импортирующиеся из цитоплазмы в митохондрии, не входят в состав холофермента цитохром *c*-оксидазы, но последний не формируется в случае мутаций хотя бы в одном из них. Их конкретные функции известны далеко не во всех случаях. Интересные данные были сравнительно недавно получены для Pet100 [12]. Этот белок с молекулярной массой около 13 кДа относится к интегральным белкам внутренней мембраны дрожжевых митохондрий. Анализ митохондрий, солюбилизованных тритоном X-100, при центрифугировании в градиенте плотности с последующей иммунопреципитацией белковых фракций антисывороткой против Pet100 показал, что последний избирательно связывает субъединицы

VIIa, VII и VIII цитохром *c*-оксидазы, образуя с ними общий комплекс (комплекс А), что может быть подтверждено опытами по перекрестной иммунопреципитации. При этом фракция, содержащая цитохром *c*-оксидазную активность и полный набор субъединиц холофермента, не была ассоциирована с Pet100.

По-видимому, комплекс А, состоящий из субъединиц VII, VIIa и VIII, при наличии Pet100, является «затравкой» для дальнейших стадий сборки холофермента в мембране. *Pet100 null* мутант не содержит холофермента цитохром *c*-оксидазы, хотя в нем обнаруживались его субъединицы в полном комплекте (I, II, III, IV, V, Va, VI, VII, VIIa и VIII), пусть и в несколько редуцированных количествах. В этом случае в сахарозном градиенте тритонового лизата митохондрий выявляются два прочно связанных комплекса, включающих субъединицы VII, VIIa и VIII (комплекс А1 без Pet100) и субъединицы V и VI (комплекс В).

Тот факт, что в отсутствие Pet100 не формируется холофермент цитохром *c*-оксидазы, свидетельствует о том, что он служит обеспечению определенного порядка взаимодействия между субъединицами (или группами субъединиц), и нарушение этого порядка является причиной нарушения сборки, включая стадии присоединения остатков гема и формирования центров $Cu_{A,B}$. Таким образом, хотя Pet100 не принимает участия на ранних стадиях формирования холофермента, включая стадии транскрипции, трансляции, адресования в митохондрии и сортинга в митохондриях, он играет роль шаперона, обеспечивающего правильную сборку определенных участков (или стадий) цитохром *c*-оксидазы. Без этого вспомогательного белка не образуется активный центр фермента [12].

*Формирование комплекса bc_1
(комплекса III дыхательной цепи митохондрий)*

Комплекс III включает три каталитические субъединицы, а именно, цитохром *b* (кодируемый в митохондрии), цитохром c_1 и FeS белок Риске (два последних белка кодируются в ядре и импортируются в митохондрии, включаясь во внутреннюю митохондриальную мембрану). Кроме того, в состав комплекса III входят несколько субъединиц, не несущих каталитические, а выполняющих структурные функции. В случае дрожжей *S. cerevisiae* этими субъединицами являются Core1, Core2, Qcr6p, Qcr7p, Qcr8p, Qcr9p и Qcr10p [13]. Сборка комплекса III осуществляется через ряд промежуточных состояний. Согласно принятой модели, сначала образуется комплекс цитохрома *b* с Qcr7p и Qcr8p, который затем связывается с Core1 и Core2. Другой субкомплекс включает цитохром c_1 , Qcr6p и Qcr9p. Формирование

каждого из этих субкомплексов сообщает им устойчивость к протеолизу в сравнении с индивидуальными субъединицами. Субкомплексы цитохрома *b* и цитохрома c_1 объединяются далее в прекомплекс bc_1 с белком FeS Риске, и, возможно, с субъединицей Qcr10p. Сборка полного комплекса bc_1 требует участия специфического белка Vcs1p, который является 45,6 кДа интегральным белком внутренней митохондриальной мембраны, но непосредственно не входит в состав комплекса цитохромов bc_1 [14]. Тем не менее делеция по гену *Vcs1* приводит к формированию дефектного нефункционального комплекса bc_1 (комплекса III). С этой точки зрения, Vcs1p следует рассматривать как «сборочный шаперон». Особенностью его действия является сопряженный гидролиз АТР. По этим критериям Vcs1p является членом семейства ААА белков, принимающих участие в различных процессах ассоциации и диссоциации белков.

*Формирование NADH:коэнзим Q-оксидоредуктазы
(комплекс I дыхательной цепи митохондрий)*

Комплекс I сердца быка содержит 45 субъединиц, из которых большинство кодируется ядром, а остальные (7) – митохондриальным геномом. В таком случае при наличии одной копии каждой субъединицы молекулярная масса комплекса I должна составить 980 кДа (900 кДа, по данным метода гель-фильтрации). Комплекс I имеет доменную структуру и легко диссоциирует под действием неионных детергентов. При этом с использованием хроматографической колонки Mono-Q отчетливо разделяются три домена, один из которых периферийный, направленный в митохондриальный матрикс, а два других, большой и малый, локализованы в теле внутренней мембраны. Периферийный домен содержит около 22 субъединиц, а мембранные домены – 8 и 13 субъединиц. По данным электронной микроскопии, комплекс I имеет L-образную форму, где периферический и два мембранных домена располагаются под прямым углом, причем периферический домен выступает в матрикс примерно на 150 Å [15, 16]. Отметим, что белки, синтезированные в митохондриях (ND1-ND6 и ND4L), обладают высокой гидрофобностью и входят исключительно в состав малого и большого мембранных доменов.

В соответствии с доменной структурой комплекса I, его формирование реализуется из указанных выше блоков, каждый из которых может существовать независимо друг от друга. Это можно проиллюстрировать исчезновением отдельных блоков в результате избирательных мутаций в их белках, при сохранности других блоков (см., например, [17]). Имеются данные, что взаимодействие

между блоками может контролироваться специальными белками-шаперонами. В частности, мембранный домен образуется двумя интермедиатами – меньшим 200 кДа и большим 350 кДа. Последний ассоциирован с вспомогательными белками 30 и 84 кДа, которые не являются составляющими частями зрелого комплекса I. В мутантах с разрушенными генами одного или двух этих белков аккумулируются периферический блок и малый мембранный блок, но не образуется при этом большой интермедиат. Таким образом, вспомогательные белки 30 и 84 кДа рециклируют, обеспечивая формирование полного мембранного блока и выполняя тем самым функцию ассоциирующих шаперонов.

Формирование митохондриальной H⁺-АТФазы

Митохондриальная H⁺-АТФаза (F₀F₁-АТФаза), синтезирующая основную часть АТФ эукариотической клетки, включает ассоциированный с мембраной каталитический центр F₁ (субъединицы $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$) и мембранный сектор F₀ (субъединицы Atp6p, Atp8p и Atp9p, называемые также a, b и c, соответственно) [18–21]. Согласно упрощенной модели, на первой стадии сборки комплекса образуется кольцо в плоскости мембраны, содержащее 10–12 гомоолигомерных субъединиц из Atp9p [22]. Предварительно собранный сектор F₁ присоединяется к кольцу Atp9p, затем связывает две субъединицы Atp8p и Atp4p и, возможно, другие компоненты статорного сектора. Наконец, этот промежуточный комплекс связывает Atp6p. Показано, что продукты ядерных генов АТР10, АТР11 и АТР12, не являясь компонентами F₀F₁-АТФазы, влияют на ее формирование. Мутация Atp10p (atp10 null), ассоциированного с внутренней мембраной митохондрии, приводит к дефекту в F₀ вследствие дестабилизации субъединицы Atp6p. В то же время мутации в Atp11p (atp11 null) и Atp12p (atp12 null)-белков, локализованных в матриксе, препятствуют олигомеризации субъединиц сектора F₁ [22, 23]. Следует заметить, что в настоящее время известны 16 белков F₀F₁-АТФазы, кодируемых в ядре, и что картина регуляции этого комплекса (комплекса V) может оказаться более сложной.

Приведенные примеры показывают, что сборка мультисубъединичных комплексов внутренней митохондриальной мембраны подчиняется определенным правилам. Во-первых, сборка требует четкого порядка взаимодействия субъединиц и, во-вторых, участия вспомогательных белков, не являющихся их непосредственными компонентами и играющих какую-то вспомогательную роль в этом процессе. Обращает на себя внимание тот факт, что вспомогательные

белки не универсальны по своим свойствам и могут быть весьма многочисленны, как это, в частности, имеет место при формировании комплекса IV (см. выше). Таким образом, в настоящее время известны только самые общие принципы формирования дыхательных комплексов внутренней митохондриальной мембраны.

Следовало бы упомянуть, что идея управляемой сборки мульти-субъединичных комплексов с участием неких «шаблонов», прообразом которых могли бы служить белки-шапероны, упоминавшиеся выше, высказывалась еще в 1965 г. Грином и Хехтером [24].

СУПЕРКОМПЛЕКСЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ И H⁺-АТРаза МИТОХОНДРИЙ

Существует ряд доказательств того, что дыхательные комплексы, H⁺-АТРаза и ряд функционально связанных с ней белков формируют во внутренней митохондриальной мембране еще более сложные структуры, или суперкомплексы [4]. Предполагается, в частности, что их наличие может способствовать более быстрой диффузии субстратов или реализации туннельного эффекта в ферментативной реакции.

Суперкомплексы дыхательной цепи

Универсальный способ идентификации суперкомплексов во фракции внутренних митохондриальных мембран состоит в их солубилизации детергентами с последующими вариантами электрофореза в полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях: BN-PAGE, 2D BN-PAGE, а также сопряженным с ними SDS-PAGE [25,26]. Такой подход позволяет не только выявить размеры фрагментов внутренней мембраны, но и их состав (при наличии подходящего метода идентификации индивидуальных белков, например, иммуноблоттинга и N-концевого секвенирования).

При исследовании комплекса bc_1 (комплекса III) и цитохром c -оксидазы (комплекса IV) в дигитониновых лизатах дрожжей *S. cerevisiae* обнаруживаются суперкомплексы состава III_2IV_1 (500 кДа) и III_2IV_2 (750 кДа). В зависимости от условий роста дрожжей относительное содержание этих комплексов может достигать до 30 и 90%, соответственно, а содержание свободного комплекса IV в форме димера – до <10%. Это позволяет предполагать, что агрегатное состояние комплексов III и IV имеет динамический характер и отражает разные стадии формирования функционально значимых структур.

Имеются данные, согласно которым субъединицы комплексов III и IV подвергнутся ко-иммунопреципитации из солубилизованных

дигитонином митохондриальных мембран, что указывает на физическое взаимодействие этих комплексов в мембране. К такому же выводу приводят результаты сравнительного анализа эффектов дигитонина и додецилмальтозида (DDM) на парциальные активности комплексов III и IV в митохондриальной мембране (коэнзим Q: цитохром *c*-редуктазной и цитохром *c*-оксидазной, соответственно) и их интегральную (коэнзим Q-оксидазную) активность.

Использование BN-PAGE позволило выявить в дигитониновых лизатах митохондриальных мембран, помимо комплексов III₂IV₁ и III₂IV₂ (см. выше), частицы с молекулярной массой 1500 и 1750 кДа, включающие комплексы I, III и IV. Более того, с помощью техники двумерного BN-PAGE (2D BN-PAGE) и SDS-PAGE удалось установить стехиометрию комплексов I, III и IV и показать, что они могут непосредственно взаимодействовать друг с другом, образуя суперкомплексы состава I₁III₂IV₂₋₄. На основании этих и других экспериментов была предложена гипотеза, согласно которой дыхательные суперкомплексы образуют сеть во внутренней митохондриальной мембране. Эта сеть построена из отдельных «респирасом» [25]. Согласно данным электронной микроскопии, полученным методом негативного контрастирования, препараты комплекса I₁III₂IV₁ выглядят как частицы треугольной формы с длинной стороной 30–33 нм [27]. В основе этих частиц, по-видимому, лежит комплекс I в виде L-образной конструкции, где он сопряжен с комплексами III и IV (общая молекулярная масса 1400 кДа). В принципе допускается образование в мембране крупных супрамолекулярных структур, построенных из респирасом [28].

Уникальным свойством дыхательной цепи (реконструированной из изолированных дыхательных комплексов или субмитохондриальных частиц), открытым около 40 лет тому назад [29], является ее способность принимать форму, устойчивую к действию трипсина/химотрипсина и фосфолипазы A₂ в условиях ее функционирования, т.е. окисления NADH или янтарной кислоты кислородом. Этим свойством обладает полная дыхательная цепь, но не ее отдельные фрагменты. С другой стороны, функционирование отдельных участков не дает защитного эффекта по отношению к указанным выше деструктурирующим агентам. Изучение «слабых мест» дыхательной цепи по отношению к фосфолипазе A₂ показало, что ими являются участки на уровне коэнзима Q, между цитохромами *b* и *c*₁, а также на уровне цитохрома *c*. Эти уязвимые места, по-видимому, экранируются при окислении соответствующих субстратов кислородом. Описанные модельные эксперименты достаточно наглядны, однако нет уверенности в

том, что они могут иметь отношение к реальным физиологическим условиям.

Суперкомплекс, включающий H^+ -АТФазу, переносчик адениновых нуклеотидов (ANC) и переносчик неорганического фосфата (PIC)

Суперкомплекс указанного состава был получен из высокоочищенного препарата внутренних мембран митохондрий крысы путем последовательной фрагментации с целью обогащения его фрагментов компонентами АТФ-синтетазы и последующей обработки фрагментов всевозможными детергентами. С этой целью исследовалось 80 детергентов, из которых только четыре оказались пригодными для решения поставленной задачи [30]. Результирующий препарат в форме пузырьков, по данным SDS-PAGE, содержал только 17 полипептидов, из которых 15 компонентов, за исключением регуляторных факторов F_1 и V , принадлежали F_0F_1 -АТФазе (АТФ-синтетазе или H^+ -АТФазе), и по одному – ANC(AAC) и PIC. При центрифугировании через 25% сахарозу этот препарат проявлял себя как единая белковая фракция при взаимодействии с антителами против β -субъединицы F_1 -АТФазы. Таким образом, есть основания рассматривать этот препарат как специализированную область, как субфракцию внутренней мембраны, где образуется комплекс АТФ-синтетаза-ANC-PIC, получивший название «АТФ-синтасома» [31].

Установлено, что АТФ-синтасома имеет стехиометрию АТФ-синтетаза/ANC/PIC – 1 : 1 : 1. По данным электронной микроскопии 23 Å разрешения негативно окрашенных препаратов этого суперкомплекса, в нем отчетливо выделяются три структурных элемента: классическая «головка», которая составляет основную массу F_0 , центральная ножка и базовое основание. Существенно, что оно имеет эллипсоидную форму, включает два домена, один из которых, больший, связан с центральной ножкой [31]. При этом ANC и PIC располагаются асимметрично базовой ножки АТФ-синтетазы. В заключение заметим, что в этом разделе речь идет о суперкомплексе, включающем в общем >30 субъединиц и имеющем молекулярную массу ~0,7 миллионов дальтон.

III. КОНТРОЛЬ СОСТАВА ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ ВНУТРЕННЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ

Дыхательные комплексы и компоненты АТР-синтасомы включают в себя белки, закодированные как в ядерном, так и в митохондриальном геноме, при этом митохондрии содержат ферментативную и регуляторную систему, отвечающую за репликацию митохондриальной ДНК и экспрессию закодированной в ней информации, отличную от ядерной [32]. Сразу после открытия митохондриальной ДНК возник вопрос, каким же образом «общаются» между собой разобщенные в клеточном пространстве ядерный и митохондриальный геномы. В частности, было непонятно, как устанавливается постоянный белковый состав комплексов дыхательной цепи (например, цитохром *c*-оксидазы), одни из субъединиц которых экспрессируются в цитоплазме, а другие – в митохондриях. Несмотря на многочисленные усилия исследователей, долгое время ответ на этот и подобные вопросы получить не удавалось. Однако в последние годы наметились пути решения этой сложной проблемы (для ссылок см [33]).

Оказалось, что координация экспрессии ядерного и митохондриального геномов является обоюдной. Было установлено, что транскрипция генов многих белков дыхательной цепи, закодированных в ядре млекопитающих, прямо или косвенно регулируется факторами NRF-1 и NRF-2 [34]. В свою очередь, эти факторы находятся под контролем белков – коактиваторов семейства PGC-1 [35]. Активность белков PGC-1 модулируется самыми разнообразными внешними и внутриклеточными сигналами [36]. В частности, они реагируют на повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, происходящее при ингибировании дыхательной активности митохондрий. Активируемая PGC-1 α через фактор NRF-1 транскрипция генов, кодирующих белки дыхательной цепи, приводит к увеличению их количества во внутренней мембране митохондрий [36].

Наряду с ионами Ca^{2+} существует множество факторов, которые могут влиять на соотношение субъединиц в энзиматических комплексах внутренней митохондриальной мембраны. В принципе, фонды этих белков могут зависеть не только от индукции их генов, но и от специфики процессинга соответствующих транскриптов, формирования мРНК, их стабилизации и трансляции в цитоплазме и митохондриях и т.д. В этом случае речь идет о многостадийных каталитических процессах, продукты которых (например, мРНК) могут иметь неопределенное время полужизни. Следующий момент – транспорт белковых предшественников в митохондрии и их

адресование в различные субкомпарменты последних, ключевые стадии которого требуют координированного участия транслоказ и шаперонов [3, 37, 38]. Заключительные стадии формирования дыхательных комплексов контролируются набором протеиназ, локализующихся во всех митохондриальных компарментах.

**МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ:
ЛОКАЛИЗАЦИЯ В МИТОХОНДРИЯХ, СВОЙСТВА,
РОЛЬ В ТОПОГЕНЕЗЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ**

К настоящему времени детально изучены свойства и функции трех митохондриальных протеиназ дрожжей *S. cerevisiae*: PIM1, *m*-AAA (Yta10/Yta12p) и *i*-AAA (Yme1p) (рис. 1). Эти протеиназы играют решающую роль в формировании митохондриальных белков, удалении дефектных белков, а также белков, лишенных своих партнеров в белковых комплексах. Более того, по крайней мере, один из этих ферментов, *i*-AAA, входит в общую систему регуляции митохондриального морфогенеза [39].

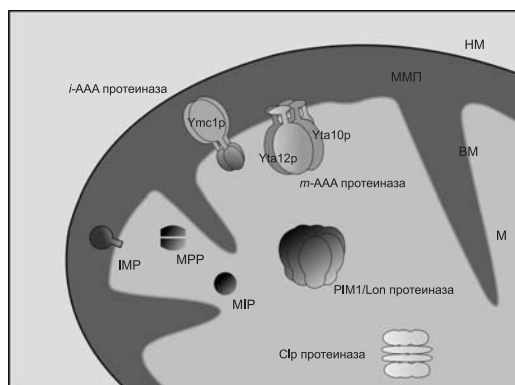


Рис. 1. Протеолитическая система митохондрии (адаптировано из [39]).

АТФ-зависимые протеиназы: PIM1/Lon протеиназа, находящаяся в матриксе; *i*-AAA и *m*-AAA протеиназы, погруженные во внутреннюю мембрану с каталитическими сайтами, обращенными в межмембранное пространство и матрикс соответственно; интерполигомерная Clp протеиназа включает пептидазу и АТФазную субъединицу, идентифицированную в органеллах высших эукариот, но не в дрожжах *S. cerevisiae*;

АТФ-независимые пептидазы: матриксная процессирующая пептидаза (MPP), внутримембранная пептидаза (IMP) и митохондриальная промежуточная пептидаза (MIP);

НМ – наружная мембрана; ММП – межмембранное пространство; ВМ – внутренняя мембрана; М – матрикс.

Следует также отметить, что в митохондриях существуют специфические протеиназы (например, MoP112, Oma1), выполняющие избирательные регуляторные функции в жизнедеятельности дрожжевых клеток. Для реализации своих функций они в свою очередь сами требуют участия особых факторов, таких как белковые ABC транспортеры Mdl1 и прохибитины Phb1p и Phb2p. Белковый транспортер Mdl1 поддерживает экспорт полипептидов с массой в пределах ~ 2100–600 Да при участии протеиназ *m*-AAA или *i*-AAA в зависимости от того, какая из протеиназ находится в компартменте [40]. Прохибитины Phb1p и Phb2p прикреплены к внутренней митохондриальной мембране N-концевым участком, а C-концевой участок экспонирован в межмембранное пространство. Функция их состоит в регулировании протеиназной активности *m*-AAA [41]. Можно ожидать, что по мере того, как будут накапливаться новые данные, протеолитический аппарат митохондрий, осуществляющий контроль качества белков, окажется еще более сложным.

Молекулярная организация и компартиментализация митохондриальных протеиназ

Лоп-подобная сериновая протеиназа PIM1 локализуется в митохондриальном матриксе и в очищенной форме представляет собой комплекс с молекулярной массой ~800 кДа с гептамерной стехиометрией [39]. Субъединицы фермента (Pim1p) синтезируются в цитоплазме в виде предшественника, содержащего 1133 аминокислотных остатка. В присутствии АТР происходит олигомеризация PIM1, причем этот процесс ингибируется негидролизуемыми аналогами нуклеотидов.

Протеиназа m-AAA состоит из двух белков: Yta10p/Afg3p и Yta12p/Rca1p (в дальнейшем комплекс YTA10–12), которые по первичной структуре идентичны на 53%. Yta10p (761 остаток) и Yta12p (825 остатков) кодируются в ядре и адресуются в митохондрии посредством NH₂-концевых препоследовательностей. Оба белка «заякореваются» во внутренней митохондриальной мембране двумя гидрофобными сегментами в NH₂-концевой трети белка, которые разделяются гидрофильной петлей размером ~10 кДа. NH₂-концевые части Yta10p и Yta12p, так же как их массивные COOH-концевые домены (~ 520 остатков), несущие АТР- и металлсвязывающие сайты, экспонируются в матриксе.

Yta10p и Yta12p образуют ~1000-кДа комплекс во внутренней митохондриальной мембране. Целостность комплекса требует присутствия нуклеотидов, но не гидролиза АТР (рис. 2А) [42].

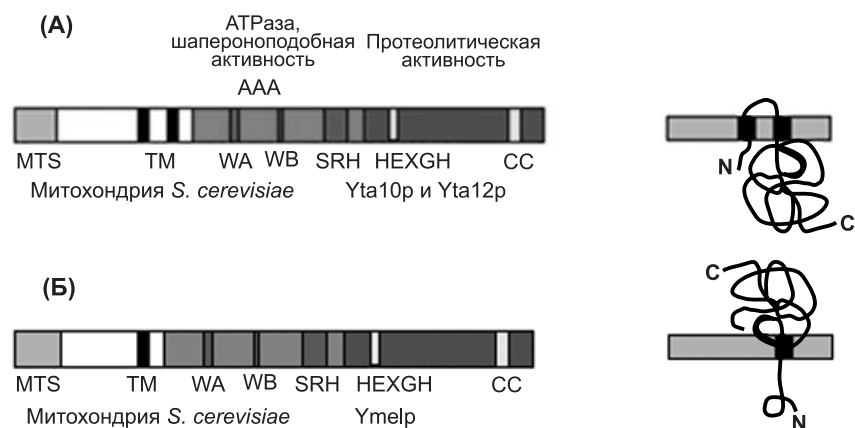


Рис. 2. Доменная структура AAA-протеиназных субъединиц (адаптировано из [42]).

А. Протеиназы *m*-AAA, Б. Протеиназы *i*-AAA.

TM – трансмембранный сегмент; AAA – АТРазный домен; CC – домен свернутой спирали (coiled-coil); MTS – митохондриальный адресующий сигнал; HEXGH – металл-связывающий сайт; WA и WB - Walker мотивы А и В; SRH – второй участок гомологии.

Протеиназа *i*-AAA кодируется геном *YME1* (*YTA11*) и содержит в качестве субъединицы полипептид Yme1, включающий 747 остатков и на 32% гомологичный Yta10p и Yta12p (рис 2Б) [42]. Yme1p содержит N-концевой митохондриальный адресующий сигнал. В отличие от Yta10p и Yta12p, Yme1p пересекает внутреннюю митохондриальную мембрану только один раз, в то время как 55-кДа каталитический домен экспонирован в межмембранное пространство. Этот домен содержит Zn-связывающий участок HEXXH, характерный для металлопротеиназ. По-видимому, Yme1p не является единственным компонентом протеиназы *i*-AAA, представляющей собой высокомолекулярный комплекс ~1000 кДа. Стабильность этого комплекса не зависит от наличия нуклеотидов и мутаций в АТФ-связывающем мотиве Yme1p.

Протеиназа *Oma1* (*overlapping activity with m-AAA*) – АТФ-независимая протеиназа не несет отделяемой N-концевой последовательности и не подвергается протеолитическому процессингу при импорте из цитоплазмы. Протеиназа *Oma1* представляет собой белок внутренней мембраны с предполагаемой гомо-гексамерной структурой. Активный центр белка содержит мотив HEXXH, соответствующий протеиназам S2P [43].

Протеиназа Мор112 – металлопептидаза с молекулярной массой 112 кДа, содержащая мотив НХХЕН. Она предположительно имеет участок с амфифильной спиралью, посредством которого адресуется в митохондрию $\Delta\psi$ -зависимым способом. Для данной протеиназы характерно то, что адресующий участок не является отделяемым. Импорт Мор112 из цитоплазмы осуществляется в межмембранное пространство [44].

Мишени для АТФ-зависимых митохондриальных протеиназ

Основными мишенями для АТФ-зависимых митохондриальных протеиназ являются незавершенные полипептидные цепи и белки, не входящие в состав белковых ансамблей. В ранних работах *in vitro* и *in vivo* был оценен только суммарный вклад АТФ-зависимого протеолиза продуктов митохондриальной трансляции при условии нарушенной цитоплазматической трансляции [45–47]. К настоящему времени установлена связь между указанными выше протеиназами и их конкретными мишенями в митохондриях.

Так, в соответствии с локализацией Р1М1 в матриксе ее действию подвергаются преимущественно белки, экспонированные в митохондриальный матрикс, например, свободные субъединицы α -, β - и γ -F₁-АТФазы, β -субъединица матриксной процессирующей пептидазы (Mas1p или МРР, см. выше) и несколько митохондриальных рибосомальных белков [48]. Комплекс *m*-ААА с протеиназным центром, обращенным в митохондриальный матрикс, осуществляет деградацию интегральных белков внутренней мембраны: субъединиц I и III цитохром *c*-оксидазы (комплекса IV), цитохрома *b* (комплекса III), а также субъединиц 6, 8 и 9 АТФазы во внутренней мембране [49]. Критерием принадлежности того или иного белка к субстратам Р1М1 и *m*-ААА является, вероятно, его общее конформационное состояние, а не его конкретная природа [50].

Что касается комплекса *i*-ААА с ориентацией протеиназного центра в межмембранное пространство, то в качестве его субстрата была идентифицирована субъединица II комплекса IV [51], значительная часть которой, по данным рентгеноструктурного анализа [10], также экспонирована в межмембранное пространство.

В отличие от трех предыдущих протеиназ, которые являются не только протеолитическими ферментами, но и выполняют в митохондриях всевозможные АТФ-зависимые регуляторные функции (см. выше), протеиназа Oma1 обладает, по всей видимости, только протеолитической активностью. Она является интегральным белком внутренней митохондриальной мембраны. Ее активный центр распола-

гается в трансмембранном домене в непосредственной близости от матрикса. Субстратом (субстратами) этой протеиназы являются политопные мембранные белки, в частности, Oxa1, который принимает участие во взаимодействии рибосомы с растущей полипептидной цепью и ее включении во внутреннюю митохондриальную мембрану [43].

Ряд белков, являющихся преимущественно продуктами митохондриальной трансляции, подвергаются выбраковке под действием *i*-AAA, в результате которой отщепляются крупные фрагменты белков, направляющиеся в межмембранное пространство, где протеиназа Mor112 превращает их в набор олигопептидов.

Малоизученными остаются механизмы деградации белков в межмембранном пространстве. Единственным примером здесь является изо-1-цитохром *c*, который составляет ~95% общей массы изо-цитохромов в растущих аэробно дерепрессированных клетках. В условиях частичного анаэробнозиса или глюкозной репрессии изо-1-цитохром *c* быстро деградирует под действием протеасом. Действительно, уменьшение деградации аро-изо-1-цитохрома *c* наблюдается в мутантных формах *pre2-2* и *pre1-1*, а также в мутантах *ubc1*, *ubc4* и *ubc5* убиквитин-конъюгирующих ферментов. Эти и другие данные указывают на возможность деградации митохондриальных белков в цитоплазме [52].

Регуляция протеолиза митохондриальных белков

Белки, импортированные в митохондриальный матрикс, подвергаются сворачиванию или включению в белковые комплексы. Если эти процессы реализуются с ошибками, то указанные белки подвергаются действию Lon-подобной PIM1 протеиназы, содержание которой должно соответствовать объему ошибок, который определяется функциональным состоянием митохондрии в клетке. На модельных системах показано, что дефектные белки агрегируют и накапливаются в матриксе [53,54] при дефиците митохондриального шаперона mt-Hsp70 (Ssc1p, аналога DnaK у *E. coli*). Он ассоциирован с кошапероном Mdj1p (аналогом DnaJ у *E. coli*), необходимым mt-Hsp70 для стимуляции АТФ-азной активности, и с белком Mge1p (аналогом GrpE у *E. coli*) для осуществления на нем нуклеотидного обмена. Эта система шаперонов либо обеспечивает превращение импортируемого в митохондрию белка в нативную форму (свернутую), либо делает его доступным для деградации под действием протеиназы PIM1. Сказанное иллюстрируется схемой (рис. 3) [55]. В митохондриях существует система шаперонов Hsp78 и Msc1, принадлежащая семейству Clp/Hsp100, которая принимает участие в деградации

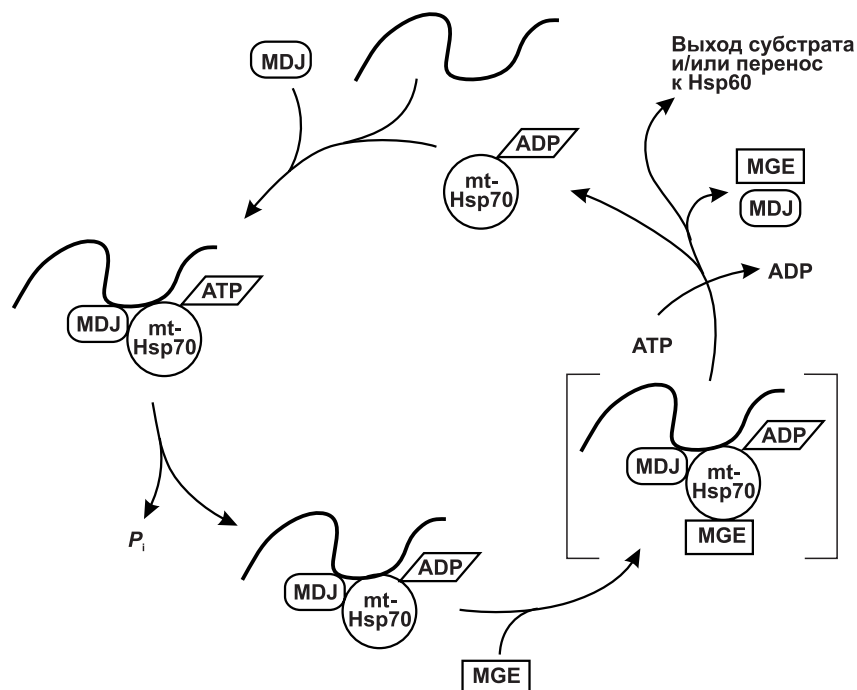


Рис. 3. Гипотетическая модель регулируемого нуклеотидом связывания развернутых белков с mt-Hsp70 и их диссоциации при участии ко-шаперонов MDJ и MGE (адаптировано из [55]).

mt-Hsp70-ATP и MDJ взаимодействуют с вновь импортированным развернутым полипептидом с образованием комплекса MDJ-mt-Hsp70-ATP. Связывание субстрата способствует гидролизу ATP, что переводит mt-Hsp70 в форму с высоким сродством к субстрату, mt-Hsp70-ADP. Диссоциация субстрата происходит вследствие взаимодействия MGE с комплексом. Функция MGE может состоять в замене ADP в комплексе с mt-Hsp70 на ATP. Обмен/освобождение ADP из комплекса с mt-Hsp70 приводит к диссоциации комплекса, высвобождению субстрата с возможностью его последующего связывания с Hsp60 для сворачивания.

белков [56]. Они гомологичны бактериальным белкам в составе активного комплекса ClpV и ClpX, первый из которых осуществляет протеолитическую функцию, а второй обеспечивает реактивацию агрегированных полипептидов. Аналогичная ситуация имеет место в митохондриях высших эукариот. Что касается дрожжевого Hsp78, то он не обладает протеолитической активностью, но проявляет при этом ATP-зависимую разворачивающую активность, по-видимому, подготавливающую субстрат к деградации под действием матричной

протеазы PIM1. Функция Msc1 остается до настоящего времени неясной, несмотря на принадлежность его к семейству шаперонов Clp/Hsp100 [57].

Белки внутренней митохондриальной мембраны. Как было показано, функции протеиназы PIM1 и шаперона mt-Hsp70 по контролю за «качеством» сворачивания белков разделены. Иная картина наблюдается для YTA10-12 (*m*-AAA) комплекса (рис. 2А), который совмещает свойства шаперонов и протеиназ, обладая, с одной стороны, NTP-азными мотивами WA и WB, а с другой – металлопротеиназным центром типа HEXXH [58]. В этом случае формирование стабильного комплекса из Yta10p и Yta12p требует наличия АТР или какого-либо из его негидролизующих аналогов (АТРγS, AMP-PNP, ADP или GTP). Протеолиз белков внутренней митохондриальной мембраны протекает при участии YTA10-12 только в присутствии АТР и характеризуется высокой скоростью, так что при деградации белков в митохондриях *in organello* удается наблюдать только его ассоциацию с низкомолекулярными промежуточными продуктами протеолиза.

Предполагается, что комплекс занимает некую полость внутренней мембраны, допуская деградацию мембранных белков в гидрофильных петлях. Согласно другой точке зрения, протеолиз комплексом YTA10-12 не ограничивается водорастворимыми петлями, а скорее вовлекает гидрофобные домены, выполняющие роль «мембранных якорей», которые также подлежат протеолизу [58].

Еще одна проблема, относящаяся к механизмам действия YTA10-12, это роль АТР в реакции протеолиза. В качестве рабочей гипотезы, во-первых, предполагалось, что гидролиз АТР необходим для иницирования комплекса YTA10-12, который мог бы несколько раз пройти циклы ассоциации и диссоциации в ходе процесса белкового протеолиза. Во-вторых, как это ранее было показано для некоторых шаперонов, каждый акт гидролиза АТР в YTA10-12 необходим для переноса субстрата от одной субъединицы к другой субъединице комплекса с тем, чтобы обеспечить его повторное связывание и расщепление. В-третьих, энергия гидролиза АТР может расходоваться при протеолизе субстрата для повышения его чувствительности к протеолитической атаке [58].

В отличие от YTA10-12, протеолитический центр которого экспонирован в матриксе, мембранный комплекс Yme1p (*i*-AAA) осуществляет протеолиз белков в межмембранном пространстве, в частности, удаляя несвязанную (свободную) субъединицу Cox2p цитохром *c*-оксидазы (см. выше). Особенностью структуры *i*-AAA и его расположения в мембране является наличие специального

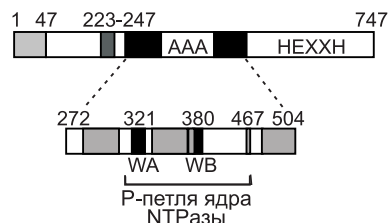


Рис. 4. Доменная структура шаперона Yme1:

1–47 митохондриальная адресующая последовательность;

223–247 – трансмембранный сегмент;

275–504 – AAA домен, содержащий Walker мотивы А и В (WA и WB) (типичные AAA области обозначены серым цветом);

504–747 – протеолитический домен с металл-связывающим сайтом HEXXH;

272–504 – область с функцией шаперона (адаптировано из [59]).

домена, играющего роль «сенсора» развёрнутой полипептидной цепи. Этот домен был выявлен введением делеций в ген молекулы белка и изучением их влияния на свойства Yme1p [59]. Как видно из рис. 4, участок с 272 по 504 аминокислотный остаток содержит NTP-азные мотивы Уолкера WA и WB и не содержит активный центр металлопротеиназы HEXXH, присущий комплексу Yme1p. Сенсорный домен находится вблизи от трансмембранного участка Yme1p (остатки 223–247) и обращен в межмембранное пространство (рис. 2Б и рис. 4). Синтез фрагмента Yme1p размером с 250-ого по 525-й остаток (и даже с 250-ого по 313-й остаток) в *E. coli* выявляет способность этого пептида осуществлять функции

шаперона, вызывая дезагрегацию модельных белков. Таким образом, протеолиз белков, встраивающихся во внутреннюю мембрану из межмембранного пространства в митохондрии, требует поддержания их в развернутом состоянии, которое, вероятнее всего, обеспечивается их взаимодействием с комплексом Yme1 и, возможно, с другими вспомогательными компонентами [60].

Сравнивая WA и WB области комплекса YTA10-12 с 250–525-сегментом Yme1 (рис. 2А и Б), можно видеть, что первый также может играть роль шаперона, сворачивающего-разворачивающего вновь импортируемые в митохондрии белки. Это следует из эксперимента с двойным мутантом $\Delta yta10^{E559Q} \Delta yta12^{E614Q}$, лишенным протеиназных центров. Такой мутант способен формировать компоненты дыхательной цепи в отличие от аналогичного мутанта с целыми протеиназными центрами [61].

Какова дальнейшая судьба продуктов протеолиза различных митохондриальных протеиназ? Методом масс-спектрометрии установлено, что митохондрии выделяют АТР-зависимым и температурно-зависимым способом около пятидесяти пептидов, кодирующихся в митохондриях и ядре. Их источником являются АТР-зависимые протеиназы матрикса и внутренней мембраны. В дрожжах,

находящихся в логарифмической стадии роста, методом пульсовой метки показано, что эти пептиды возникают вследствие деградации ~10% предсуществующих и вновь импортируемых белков [62].

Как упоминалось выше, уровень синтеза закодированных в ядре субъединиц комплексов дыхательной цепи, и, следовательно, дыхательная способность клеток устанавливается факторами транскрипции. С другой стороны, уровень синтеза белков дыхательной цепи, закодированных в митохондриальном геноме, модулируется экспрессией определенных ядерных генов. Последние, так же как и гены, необходимые для биогенеза дыхательной цепи, формируют регулон. Этот регулон, в частности, стимулируется при дефиците протеиназы *i*-AAA (например, при мутации *Dumel*), так как возникает дефицит генерируемых митохондриями пептидов и усиление индукции ядерных генов с функциями, связанными с экспрессией митохондриальных генов. В этом может состоять новый сигнальный путь от ядра к митохондриям [63].

Из предыдущего изложения следует, что протеиназы играют важную роль в «контроле качества» белков во всех митохондриальных компартментах. В частности, клетки, содержащие протеолитически неактивные протеиназы, проявляют фенотипы, идентичные фенотипам соответствующих *null*-мутантных клеток. Все митохондриальные протеиназы синтезируются в цитоплазме, и этот процесс контролируется в ядре на уровне транскрипции. С другой стороны, протеиназы Р1М1 и УТА10-12 сами способствуют синтезу ряда белков дыхательной цепи (например, кодируемых *COX1* и *COB*, см. выше), обеспечивая стабильность их пре-мРНК и косвенно контролируя процесс сплайсинга (см. [39]).

Дефицит митохондриальных протеиназ может приводить к накоплению дефектных митохондриальных белков и их агрегации. Для предотвращения агрегации белков существует специфическая система шаперонов в митохондриях. Среди них универсальными являются *mt-Hsp70* (*Ssc1p*) и *Hsp78* (*hClcX* у человека). Из прочих можно упомянуть шаперонины *hsp60* и *hsp10* (*GroEL* и *GroES*), которые лишь с малой эффективностью способны стимулировать сворачивание синтезированных белков в клетках *E. coli* (*in vivo*) и дрожжах (*in vitro*) [64].

Если белок *Ssc1p*, функции которого связаны с транспортным белком *Tim44* и поддерживаются кошапероном *Mdj1p* и нуклеотидным обменником *Mge1p* (см. выше), универсален, то *Ssq1p* специализируется на импорте и сборке митохондриальных Fe/S кластеров (*Cyt.b₂* и *Cyt.bc₁*) при участии белка *Yfh1*. Этот кодируемый в ядре

митохондриальный белок вовлечен в гомеостаз железа. Ssq1p демонстрирует типичные свойства шаперона при связывании развернутого субстрата АТР-зависимым способом, но не связывается ни с Tim44, ни с Mdj1p. Можно было бы предположить, что нарушение баланса между Yfh1 и шапероном Ssq1p приводит к дефициту Yfh1, связанному с деградацией последнего [65,66].

Очевидно, что действующие в митохондриях шапероны и сопряженные с ними протеиназы далеко не исчерпываются теми, которые известны на данный момент. Протеиназы сами выполняют в ряде случаев функции шаперонов, что может быть проиллюстрировано на примере дрожжевой протеиназы *i*-AAA [59].

Для дрожжей известно, что делеция генов протеиназ *YTA10*(*AFG3*) или *YTA12*(*RCA1*) нарушает синтез дыхательных ферментов (по причинам, указанным выше), а мутация *PIM1*(*LON*) супрессирует ее, благодаря чему дрожжи способны расти на несбраживаемом субстрате, т.е. синтезировать компоненты дыхательной цепи и F_1F_0 -АТРазы [67]. Возможно, это частично связано с перекрытием функций Yta10p и Yta12p с функциями Pim1p по стабилизации и сплайсингу пре-мРНК для дыхательных ферментов (кодируемых *COXI*, *COB*, и других).

Известно, что, когда делеция *YTA10*(*AFG3*) приводит к нарушению роста дрожжей на дыхательных субстратах (*pet* фенотип), причиной этому является не инактивация протеиназы Yta10, а то, что она не участвует в формировании дыхательного ансамбля. Разрушение *YTA10*(*AFG3*) может супрессироваться с помощью политопного трансмембранного белка Oxa1, являющегося компонентом транслоказы, которая осуществляет экспорт ядерно- и митохондриально кодируемых белков из матрикса через внутреннюю мембрану (см. выше). Супрессия Oxa1 выразится в синтезе цитохрома *b*, цитохрома *aa₃* и других продуктов митохондриальной трансляции. Напротив, в случае *oxa1* мутации дрожжи лишаются этих дыхательных белков, равно как способности сборки F_1F_0 -АТРазы. Аналогичные эффекты обнаружены для мембранного белка Mba1, который принимает участие в сборке комплексов дыхательной цепи [68].

Таким образом, существуют сложные соотношения между «эффективной» концентрацией митохондриальных протеолитических ферментов, осуществляющих «контроль качества» импортируемых белков, с одной стороны, и уровнем синтеза этих ферментов, содержанием всевозможных шаперонов и различных факторов, влияющих на сортировку импортируемых белков.

IV. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КОНТРОЛЯ ЗА ФОРМИРОВАНИЕМ СТРУКТУР, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

Как следует из предыдущих разделов, существует два фундаментальных принципа контроля качества митохондриальных белков. Один из них позволяет элиминировать дефектные белки. Во втором случае разрушаются несвязанные (свободные) белки при нарушении стехиометрии белковых комплексов.

Это достигается с участием всевозможных протеиназ, шаперонов и различных факторов, адресующих белки в нужные компартменты. Возникает вопрос, каким образом контролируются структуры еще более высокого порядка, например, митохондрии? Какие дополнительные принципы реализуются, кроме уже упомянутого принципа контроля качества белков, действующего на надмолекулярном (субклеточном) уровне? Некоторые аспекты этой проблемы в отношении митохондрий будут освещены в этом разделе.

ВЛИЯНИЕ ВАКУОЛЯРНЫХ ПРОТЕИНАЗНЫХ ИНГИБИТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ И ДЫХАТЕЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДРОЖЖЕЙ

Более чем 25 лет тому назад было найдено, что дрожжи, выращенные на сбраживаемых и несбраживаемых субстратах в присутствии небольших количеств синтетических ингибиторов вакуолярных протеиназ А (*yscA*, *PEP4*) и В (*yscA*, *PRB1*), содержат на 20–30% больше цитохромов *c*, *c₁*, *b* и *aa₃*, при том, что уровень клеточного дыхания не изменяется [69].

Как показано на рис. 5, на начальной стадии роста клеток на галактозе имеет место увеличение содержания цитохромов в логарифмической фазе роста клеток и его снижение в стационарной фазе. Что касается удельного клеточного дыхания (сопряженного или несопряженного), то оно при этом растет незначительно. Введение протеиназных ингибиторов (фенилметилсульфонилфторида и пепстатина) в среду роста дрожжей в середине логарифмической фазы роста приводит к тому, что содержание цитохромов *b*, *c₁*, *c* и *aa₃* сохраняется практически неизменным. При этом уровень удельного клеточного дыхания не изменяется при всем последующем росте клеток. Изложенное наводит на мысль, что в условиях роста дрожжей на галактозе значительная часть цитохромов не принимает участия в клеточном дыхании.

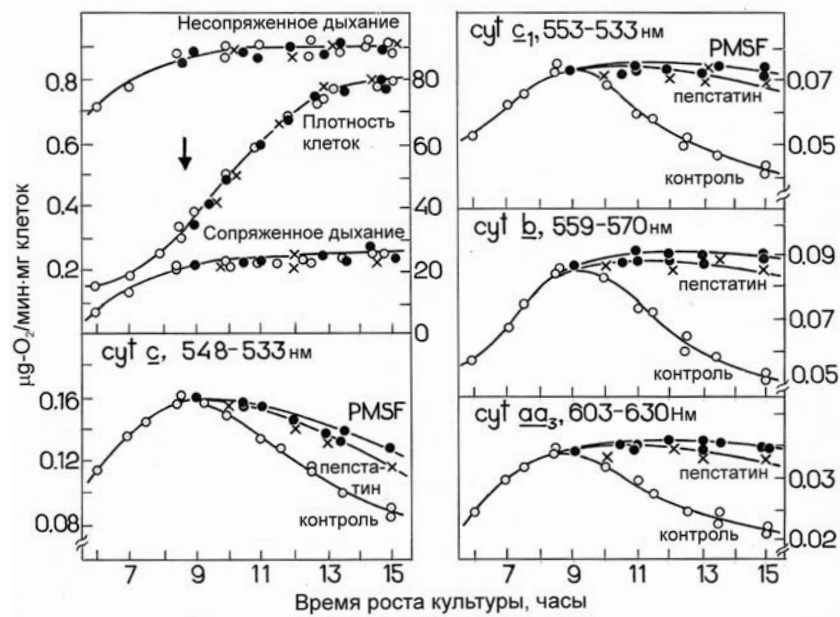


Рис. 5. Влияние ингибиторов протеиназ фенолметилсульфонилфторида (PMSF) и пепстатина на содержание цитохромов c , c_1 , b и aa_3 в клетках дрожжей *S. cerevisiae* при аэробном росте в среде, содержащей галактозу (адаптировано из [74]).

Верхняя левая панель – рост культуры и клеточное дыхание, стимулированное и не стимулированное разобщителем.

При росте дрожжей на глюкозе удельное клеточное дыхание возрастает параллельно с монотонным увеличением содержания цитохромов в экспоненциальной фазе роста дрожжей (рис. 6). Введение ингибиторов протеиназ в среду роста в начале процесса приводит к прогрессивному накоплению цитохромов b , c_p c и aa_3 . В то же самое время ингибиторы не вызывают изменений дыхательной активности клеток. Можно предполагать, что в указанных условиях «избыточные» цитохромы деградируют настолько быстро, что могут быть обнаружены только в присутствии ингибиторов протеиназ.

Эксперименты с общей митохондриальной фракцией дрожжевых клеток дали информацию о природе «избыточных» цитохромов. Оказалось, что ингибиторы протеиназ, вероятно, стимулируют накопление или сохранение некоторого количества индивидуальных ферментативных комплексов дыхательной цепи, которые, несмотря на наличие потенциальной активности, по какой-то причине не вносят своего

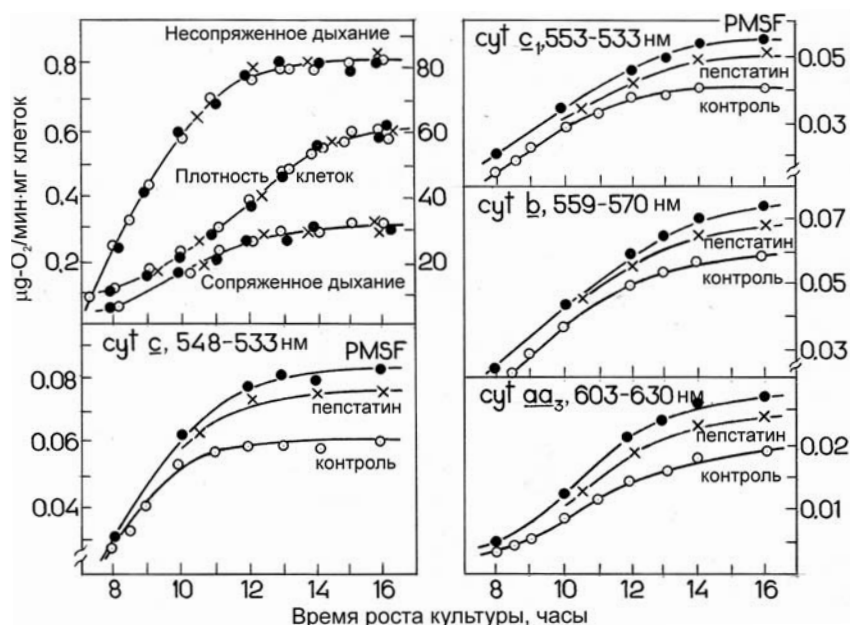


Рис. 6. Влияние ингибиторов протеиназ фенолметилсульфонилфторида (PMSF) и пепстатина на содержание цитохромов c , c_1 , b и aa_3 в клетках дрожжей *S. cerevisiae* при аэробном росте в среде, содержащей глюкозу (адаптировано из [69]).

Верхняя левая панель – рост культуры и клеточное дыхание, стимулированное и не стимулированное разобщителем.

вклада в клеточное дыхание и подвергаются деградации. Судя по значениям (величинам) парциальных максимальных ферментативных активностей, количество «избыточных» комплексов коррелирует с количеством «избыточных» цитохромов. Таким образом, можно предположить, что «избыточные» цитохромы являются компонентами нефункционирующих дыхательных комплексов.

Природа этого явления до настоящего времени остается неясной. Можно предположить, что причиной является неравномерное распределение дыхательных комплексов во внутренней мембране митохондрии, иными словами, нарушается стехиометрия суперкомплексов, о которых речь шла выше. Возможно, также имеет место нарушение формирования дыхательных цепей вследствие изменения структуры мембраны. Тем более, что некоторыми авторами допускается образование в мембране крупных надмолекулярных структур или даже цепей дыхательных комплексов [28]. Ряд данных указывает, что

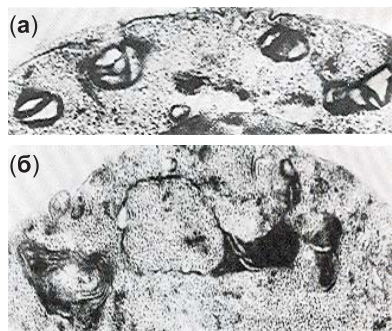


Рис. 7. Электронные микрофотографии различных митохондриальных структур дрожжей *S. cerevisiae*, выращенных аэробно (собственные данные).

(а). Структуры в молодых клетках, напоминающие промитохондрию, $\times 150\,000$.

(б). Увеличенная митохондрия неправильной формы («митохондрия монстр») в молодых клетках дрожжей, $\times 150\,000$.

образование дефектных митохондриальных структур характерно для «молодых» клеток, находящихся в предэкспоненциальной фазе роста на глюкозе [70]. На рис. 7 приведены примеры различных вариантов дефектных митохондрий («монстры»), которые характеризуются либо редуцированным матриксом, либо наличием внутренних мембранных структур неизвестного происхождения и т. д.

Различные варианты дефектных взаимодействий мембранных белков и их комплексов, а также локальных изменений в структуре мембран были подробно проанализированы в [71] и представлены на рис. 8.

Выше упоминалось, что элиминация дефектных митохондриальных структур осуществляется, вероятно, при участии вакуолярных протеиназ А и В. Это может осуществляться в ходе хорошо изученных в случае митохондрии процессов макроавтофагии [72]. Что касается примеров микроавтофагии, то ее можно продемонстрировать только в модельном эксперименте. Вначале имеет место набухание митохондрии. Набухшая митохондрия хорошо видна на электронной микрофотографии (рис. 9) [70]. Дальнейшее набухание митохондрий приводит к разрыву внутренней и внешней мембран и частичному высвобождению содержимого межмембранного пространства и крист. После этого митохондрия переходит в так называемую конденсированную форму. Весь этот процесс представлен на рис. 10 [73].

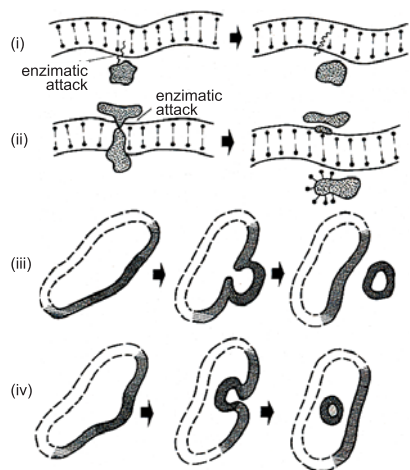


Рис. 8. Возможные механизмы удаления дефектных компонентов мембраны (адаптировано из [70]).

(i) компоненты удаляются прямым лизисом; (ii) отделение компонентов с разрывом прикрепленного белка; (iii) набухание части мембраны с образованием везикулы и последующим выделением компонентов в окружающую среду; (iv) инвагинация части мембраны с образованием внутриклеточной везикулы.

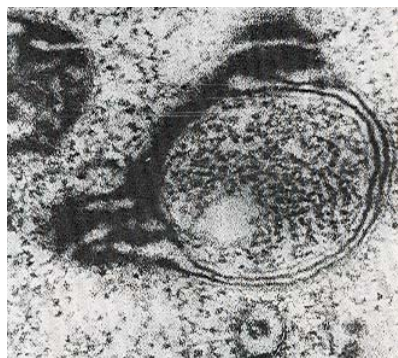


Рис. 9. Электронная микрофотография разбухшей митохондрии дрожжей *S. cerevisiae*, выращенных аэробно, $\times 44\,000$ (собственные данные).

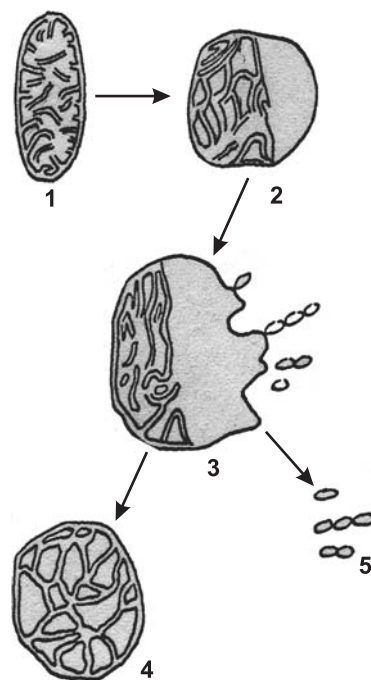


Рис. 10. Модель процесса митохондриальной микроавтофагии (адаптировано из [70]).

1 – нормальная митохондрия;
 2 – начальная стадия набухания;
 3 – набухшая митохондрия на стадии отрывающихся «пузырьков»;
 4 – деформированная митохондрия;
 5 – свободные «пузырьки», плавающие в цитозоле.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из материалов настоящего обзора следуют два вывода. Во-первых, при формировании дыхательной цепи митохондрий происходит избыточный синтез цитохромов и «лишних» частей дыхательных комплексов, которые, обладая каталитической активностью, тем не менее не вносят вклада в дыхательную активность митохондрий. Избыточные компоненты дыхательной цепи элиминируются с участием вакуолей, о чем свидетельствуют описанные выше эффекты протеиназных ингибиторов. Это явление было названо ранее «принципом отбора по функциональному критерию» [74].

Во-вторых, при любом способе нарушения окислительного фосфорилирования происходят деструктивные изменения «зрелых» митохондрий, выражающиеся, в частности, в набухании митохондрий, уменьшении числа крист, частичном переваривании митохондрий клетками под действием вакуолей (принцип стабилизации функционированием) [74].

Очевидно, эти принципы имеют умозрительный характер и требуют дополнительных экспериментальных исследований. С другой стороны, эти принципы сформулированы для того, чтобы обозначить генеральную линию дальнейших исследований. Нужно подчеркнуть, что фактически все работы до сих пор выполнялись в направлении выявления механизмов «контроля качества» индивидуальных белков и их комплексов и не затрагивали принципов формирования клеточных органелл или их субклеточных компартментов в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Стельмащук Е.В., Васильева А.К., Архангельская А.А., Хряпенкова Т.Г. (2007) Биохимия, **72**, 1371–1384.
2. Suen, D.G., Norris, K.L., Youle, R.J. (2008) Genes Dev., **22**, 1577–1590.
3. Neupert, W., Herrmann, J.M. (2007) Annu. Rev. Biochem., **76**, 723–749.
4. Boekema, E.J., Braun, H.-P. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 1–4.
5. Лузиков В.Н. Регуляция формирования митохондрий. 1980. М: Наука, 383 с.
6. Shwerzmann, K., Cruz-Orive, L.M., Eggman, R., Sanger, A., Weibel, E.R. (1986) J. Cell Biol., **102**, 97–103.
7. Wallace, D.C. (2005) Ann. Rev. Genet., **39**, 359–407.
8. Poyton, R.O., McEwen, J.E. (1996) Annu. Rev. Biochem., **65**, 563–607.
9. Fontanesi, F., Soto, I.C., Barrientos, A. (2008) IUBMB Life, **60**, 557–568.
10. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1996) Science, **272**, 1136–1144.

11. *Capaldi, R.A., Malatesta, F., Darley-Usmar, V.M.* (1983) *Biochim. Biophys. Acta.*, **726**, 135–148.
12. *Church, C., Goehring, B., Forsha, D., Wazny, P., Poyton, R.O.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1854–1863.
13. *Zara, V., Palmisano, I., Conte, L., Trumppower, B.L.* (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1209–1218.
14. *Cruciat, C.-M., Hell, K., Folsch, H., Neupert, W., Stuart, R.A.* (1999) *EMBO J.*, **18**, 5226–5233.
15. *Sazanov, L.A., Peak-Chew, S.Y., Fearnley, I.M., Walker, J.E.* (2000) *Biochemistry*, **39**, 7229–7235.
16. *Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д.* (2003) *Успехи биол. химии*, **43**, 19–58.
17. *Duarte, M., Sousa, R., Videira, A.* (1995) *Genetics*, **139**, 1211–1221.
18. *Boyer, P.D.* (1997) *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717–749.
19. *Weber, J.* (2007) *Trends. Biochem. Sci.*, **32**, 53–56.
20. *Lau, W.C., Baker, L.A., Rubinstein, J.L.* (2008) *J. Mol. Biol.*, **382**, 1256–1264.
21. *Devenish, R.J., Prescott, M., Rodgers, A.J.* (2008) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **267**, 1–58.
22. *Tzagoloff, A., Barrientos, A., Neupert, W., Herrmann, J.M.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 19775–19780.
23. *Wang, Z.G., White, P.S., Ackerman, S.H.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 30773–30778.
24. *Green, D.E., Hechter, O.* (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **53**, 318–325.
25. *Schägger, H., Pfeiffer, K.* (2000) *EMBO J.*, **19**, 1777–1783.
26. *Cruciat, C.-M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., Stuart, R.A.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 18093–18098.
27. *Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., Vonck, J.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 15370–15375.
28. *Schägger, H.* (2001) *IUBMB Life*, **52**, 119–128.
29. *Luzikov, V.N.* (1973) *Subcell. Biochem.*, **2**, 1–31.
30. *Ko, Y.H., Delannoy, M., Hüllihen, J., Chiu, W., Pedersen, P.L.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12305–12309.
31. *Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S.J., Chiu, W., Pedersen, P.L.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 31761–31768.
32. *Shutt, T.E., Gray, M.W.* (2006) *Trends Gen.*, **22**, 90–95.
33. *Ryan, M.T., Hoogenraad, N.J.* (2007) *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 701–722.
34. *Scarpulla, R.C.* (2008) *Physiol. Rev.*, **88**, 611–638.
35. *Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, G., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M.* (1999) *Cell*, **98**, 115–124.
36. *Arny, Z., Wagner, B.K., Ma, Y., Chinsomboon, J., Laznik, D., Spiegelman, B.M.* (2008) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **105**, 4721–4725.
37. *Kutik, S., Guirad, B., Meyer, H., Wiedemann, N., Pfanner, N.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **179**, 585–591.
38. *Neupert, W.* (1997) *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 863–917.
39. *Van Dyck, L., Langer, T.* (1999) *Cell Mol. Life Sci.*, **56**, 825–842.
40. *Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J., Langer, T.* (2001) *Science*, **291**, 2135–2138.
41. *Steglich, G., Neupert, W., Langer, T.* (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3435–3442.
42. *Langer, T.* (2000) *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 247–251.
43. *Käser, M., Kambacheld, M., Kisters-Woike, B., Langer, T.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 46414–46423.

44. Kambacheld, M., Augustin, S., Tatsuta, T., Muller, S., Langer, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 20132–20139.
45. Wheeldon, L.W., Dianoux, A.C., Bof, M., Vignais, P.V. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **46**, 189–199.
46. Kalnov, S.L., Novikova, L.A., Zubatov, A.S., Luzikov, V.N. (1979) *Biochem. J.*, **182**, 195–202.
47. Kalnov, S.L., Novikova, L.A., Zubatov, A.S., Luzikov, V.N. (1979) *FEBS Lett.*, **101**, 355–358.
48. Suzuki, C.K., Rep, M., van Dijl, J.M., Suda, K., Grivell, L.A., Schatz, G. (1997) *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 118–123.
49. Guélin, E., Rep, M., Grivell, L.A. (1996) *FEBS Lett.*, **381**, 42–46.
50. Savel'ev, A.S., Novikova, L.A., Kovaleva, I.E., Luzikov, V.N., Neupert, W., Langer, T. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 20596–20602.
51. Weber, E.R., Hanekamp, T., Thorsness, P.E. (1996) *Mol. Biol. Cell.*, **7**, 307–317.
52. Pearce, D.A., Sherman, F. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 31829–31836.
53. Wagner, I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer, T., Neupert, W. (1994) *EMBO J.*, **13**, 5135–5145.
54. Kovaleva, I.E., Novikova, L.A., Nazarov, P.A., Grivennikov, S.I., Luzikov, V.N. (2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**, 222–229.
55. Stuart, R.A., Cyr, D.M., Craig, E.A., Neupert, W. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 87–92.
56. Rottgers, K., Zufall, N., Guiard, B., Voos, W. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 45829–45837.
57. von Janovsky, B., Major, T., Knapp, K., Koos, W. (2006) *J. Mol. Biol.*, **31**, 799–807.
58. Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., Langer, T. (1996) *Cell*, **85**, 875–885.
59. Leonhard, K., Sriegler, A., Neupert, W., Langer, T. (1999) *Nature*, **398**, 348–351.
60. Graef, M., Seewald, G., Langer, T. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 2476–2485.
61. Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W., Langer, T. (1998) *EMBO J.*, **17**, 4837–4847.
62. Augustin, S., Nolden, M., Muller, S., Hardt, O., Arnold, I., Langer, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 2691–2699.
63. Arnold, I., Wagner-Ecker, M., Ansoerge, W., Langer, T. (2006) *Gene*, **367**, 74–88.
64. Dubaquié, Y., Looser, R., Fufschilling, U., Jenö, P., Rospert, S. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5868–5876.
65. Voisine, C., Schilke, B., Ohlson, M., Beinert, H., Marszalek, J., Craig, E.A. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3677–3684.
66. Schmidt, S., Strub, A., Rottgers, K., Zufall, N., Voos, W. (2001) *J. Mol. Biol.*, **313**, 13–26.
67. Rep, M., van Dijl, J.M., Suda, K., Schatz, G., Grivell, L.A., Suzuki, C.K. (1996) *Science*, **274**, 103–106.
68. Rep, M., Nooy, J., Guélin, E., Grivell, L.A. (1996) *Curr. Genet.*, **30**, 206–211.
69. Galkin, A.V., Tsoi, T.V., Luzikov, V.N. (1980) *Biochem. J.*, **190**, 145–156.
70. Luzikov, V.N., Zubatov, A.S., Rainina, E.I. (1973) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **5**, 129–149.
71. Parry, G. (1978) *Subcell. Biochem.*, **5**, 261–325.
72. Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., Ohsumi, Y. (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 903–913.
73. Ziegler, D.M., Linnane, A.W., Green, D.E., Dass, C.M., Ris, H. (1958) *Biochim. Biophys. Acta.*, **28**, 524–538.
74. Luzikov, V.N. *Mitochondrial Biogenesis and Breakdown*, (1985) Plenum Publ. Corp. 362 pp.