ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

КНОРРЕ
ДМИТРИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ
и др.

ФББ МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ. СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ НА VK.COM/TEACHINMSU.

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ, ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ, НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ VK.COM/TEACHINMSU.

БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТКУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
СОЛОВЬЕВУ АННУ АНДРЕЕВНУ

Оглавление

Лекция 1. 7
Структура митохондрии. 7
Функции митохондрий. 7
Краткая история изучения митохондрий. 9
Теория симбиогенеза 9
Основная функция митохондрий – дыхание. 10
Хемиосмотическая теория Митчелла 12
Митохондриальные мембраны 13
Проницаемость биомембран 13
Транспортные системы мембран 15
Холестерол в мембранах 16
Кардиолипин в мембранах 16
Энергетическая роль митохондрий 17
Митохондрии в цифрах 18
Роль митохондрий в патологиях 18
Количественное распределение белков митохондрии 18
Лекция 2. 20
Количественная оценка митохондрий 20
Гетерогенность митохондрий 22
Деление митохондрий 23
Заключение 27
Открытые вопросы в изучении динамики митохондрий: 28
Лекция 3 31
Белки процессов слияния 31
Последовательность событий при слиянии наружных мембран митохондрий 32
Слияние наружных мембран 32
Слияние внутренних мембран 33
Факторы, влияющие на процесс слияния 35
Итого 35
Открытые вопросы изучения 36
Кристы митохондрий 36

Модели формирования крист 38
Функции митохондриальной динамики 39
Лекция 4 41
Транспорт митохондрий 41
Итого 45
Открытые вопросы исследований 45
Контроль качества митохондрий. Протеостаз митохондрий 46
Митофагия и контроль качества митохондрий 48
Итого 50
Лекция 5 51
Гетероплазмия 51
Уровни проявления фенотипа мтДНК 52
Способы изучения гетероплазмии 53
Двойное моно-родительское наследование мтДНК 56
Эгоистичная мтДНК 58
Итого 59
Интрогрессия 60
Трансмиссивные раки 60
Лекция 6 61
Цитоплазматические гибриды 61
«Проклятие матерей» 63
Эволюция мтДНК 63
Псевдогены 64
Почему некоторые гены остались в мтДНК? 65
Редукция митохондрий 66
Ретроградная сигнализация. 68
Другие пути сигналинга митохондрий 71
Лекция 7 72
История изучения аутофагии 72
Макроаутофагия 74
Микроаутофагия 77
Шаперон-зависимая аутофагия 78

Избирательная деградация митохондрий ... 79
PINK-PARKIN зависимая (классическая) аутофагия ... 80
NIX-зависимый механизм аутофагии ... 81
Лекция 8 ... 84
Нормальная концентрация кальция ... 84
Ca2+ как внутриклеточный мессенджер ... 84
Митохондрии и кальций ... 85
Митохондриальный кальциевый унипортер (MCU) ... 87
Свободнорадикальная теория старения ... 88
Источники свободных радикалов ... 89
Мишени свободных радикалов ... 90
Системы защиты от АФК ... 91
Итого ... 93
Лекция 9 ... 94
История изучения апоптоза ... 94
О классификации клеточных смертей ... 96
Механизмы апоптоза ... 97
Активация каспаз ... 98
Внутренний сигнальный путь активации апоптоза ... 98
Регуляция выхода про-апоптотических белков из митохондрии ... 100
Как связаны MOMP и дробление митохондрий? ... 105
Лекция 10 ... 108
История изучения врожденного иммунитета ... 108
Основные особенности врожденного иммунитета ... 108
Активные формы кислорода ... 110
Митохондриальные DAMP (damage associated molecular patterns) ... 111
Участие митохондрий в сигнальных путях врожденного иммунитета ... 111
Роль митохондрий в активации макрофагов ... 114
Инфламмасомы ... 116
Роль кардиолипина в активации инфламмасом ... 117
Роль митохондриальной ДНК в активации инфламмасом ... 117
Роль митохондрий в активации нейтрофилов ... 118

Митохондриально-направленные антиоксиданты 118
Противовоспалительное действие SkQ 120
Патологии, связанные с избыточным воспалением 121

Лекция 1.

Структура митохондрии.

Существуют различные формы митохондрий: нитчатые или, наоборот, раздробленные. Все митохондрии имеют две мембраны, внутренняя мембрана «сморщена» и образует складки – кристы. Внутри митохондрии находится матрикс.

Функции митохондрий.

Долгое время считалось, что у митохондрии только одна функция – дыхание и синтез АТФ. Эта функция была открыла раньше всех и всесторонне изучена, и когда интерес к митохондриям начал уже падать, выяснилось, примерно в 80е годы прошлого века, что митохондрии принимают, можно сказать, центральную роль в программируемой гибели клеток – апоптозе.

Митохондрии участвуют в обмене железа и необходимы, чтобы собирать железосодержащие белки, в первую очередь с Fe-S кластерами и гемами. Ряд биохимических реакций, необходимых для жизни, требует окисления или восстановления. В зависимости от редокс потенциала пары субстрат-продукт – в той же области должен быть редокс-потенциал активного центра фермента, иначе фермент намертво окислится или восстановится. Поэтому для белков нужны группы, которые будут принимать или отдавать электроны и иметь определенный окислительно-восстановительный потенциал. И, так как аминокислоты, за исключением некоторых (вроде цистеина и тирозина), не имеют способности обратимо окисляться, необходимы группы, способные к редокс реакциям – и в первую очередь это металлы, т.к. они могут переходит в разные состояния окисленности и восстановленности. Например: медь, железо, кобальт, марганец. Поэтому железо является удобным элементом, чтобы создавать фермент, который будет принимать или отдавать электроны в заданном диапазоне окислительно-восстановительных потенциалов. В зависимости от количества атомов металла и их белкового окружения можно изменять этот окислительно-восстановительный потенциал в довольно большом диапазоне.

И такие белки нужны в первую очередь в самих митохондриях для дыхания, но не только. Например, в печени есть цитохром р450, который занимается детоксикацией неспецифической органики. Можно представить ситуацию, в которой человек выпил какой-нибудь органический растворитель, но у нас в организме нет фермента, который умеет узнавать молекулы органического растворителя и их расщеплять. Но есть цитохром р450, который умеет взаимодействовать с различными молекулами и окислять их до тех пор, пока они не станут гидрофильными. Чем больше электронов появляется в молекуле, тем больше в итоге там будет кислородов и полярных групп, которые рано или поздно приведут к тому, что вещество станет водорастворимым, и, как только оно стало водорастворимым, оно может быть выведено из организма с мочой. При этом не важно, какое это было конкретно вещество, важно, что оно было достаточно жирным. На самом деле, эта функция жизненно важная. Например, у каких-нибудь пекарских дрожжей может потеряться митохондриальная ДНК, и это ведет к

тому, что митохондрии теряют дыхательную цепь, частично закодированную в митохондриальной ДНК. Хотя такие дрожжи продолжают жить, т.к. дрожжи, в отличие от нас с вами, могут не дышать, а использовать брожение, они не могут полностью потерять митохондрии, т.к. это приведет к потере способности собирать жизненно необходимые железные кластеры.

Митохондрии задействованы в регуляции кальция, синтезе NO – важного мессенджера, выполняющего сигнализацию разных событий, а также в метаболизме, в первую очередь жирных кислот.

И есть функция, которая долгое время считалась побочным продуктом дыхания и неизбежным злом, от которого никак не избавиться, и которое приводит к старению и различным патологиям. Со временем, конечно, стало выясняться, что генерация активных форм кислорода митохондриями точно и тонко контролируется, и, видимо, это необходимый для ряда важных функций процесс; в первую очередь - для апоптоза, т.к. генерация большого количества активных форм кислорода – признак патологических процессов и дисрегуляции в клетке, ведь в норме митохондрии не производят АФК, и даже немного поглощают их из клетки, а значит - пора запускать процесс клеточной смерти, и на этом завязан ряд каскадов.

Иллюстрация – обзор функций митохондрии. На картинке обозначены: синтез железо-серных кластеров, цикл трикарбоновых кислот, дыхание и синтез АТФ; стоит обратить внимание, что АТФ-синтаза в митохондриях устроена в виде димера, который изогнут, и димеры этого белка, наряду с некоторыми другими, формируют изгибы крист, и если вызвать их мутацию, то кристы становятся неструктурированными или вовсе пропадают. Также обозначены некоторые белки, участвующие в создании кривизны мембраны, белки апоптоза, задействованные в контроле качества, контроле деградации и митофагии фагосомами митохондрий, белки переносчики.

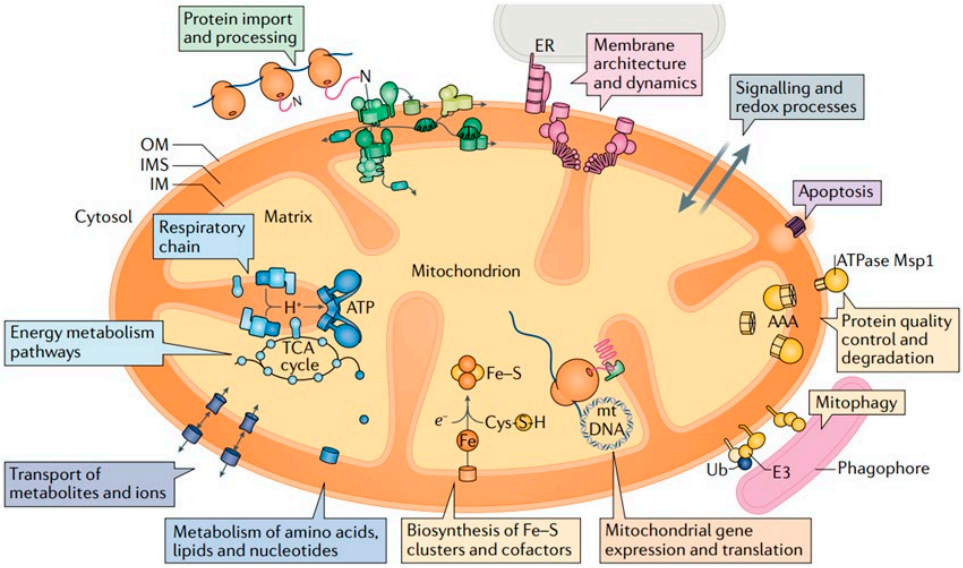


Рис. 1 Обзор функций митохондрии

Краткая история изучения митохондрий.

Как часто бывает в биологии, удивительные биологические события происходят после удивительных физических открытий. Физики придумывают новый прибор и начинают активно его применять в своих экспериментах, и через некоторое время этот прибор начинает использоваться и для биологических экспериментов. Так почему митохондрия стала активно изучаться именно в конце девятнадцатого века? Дело в том, что именно тогда довели до ума световой микроскоп, появилась клеточная теория, и, когда стали внимательно смотреть в клетку, то выяснили, что у везде есть ядро, а в 90м году немецкий ученый Рихард (Ричард) Альтман постулировал, что во всех эукариотических клетках присутствуют, как он их называл, «биобласты», или же митохондрии. И, хотя периодически появляются статьи про различные экзотические организмы, у которых митохондрий нет, обычно пристальное наблюдение показывает, что либо они у него есть, но потеряли свои функции (присутствуют различные образования митохондриальной природы), либо видны следы наличия митохондрий в геноме. Более того, Альтман выдвинул гипотезу, что митохондрии – это автономные формы жизни внутри эукариотической клетки. Он видел, как митохондрии делятся, как они сливаются, и не замечал больших отличий от бактерий.

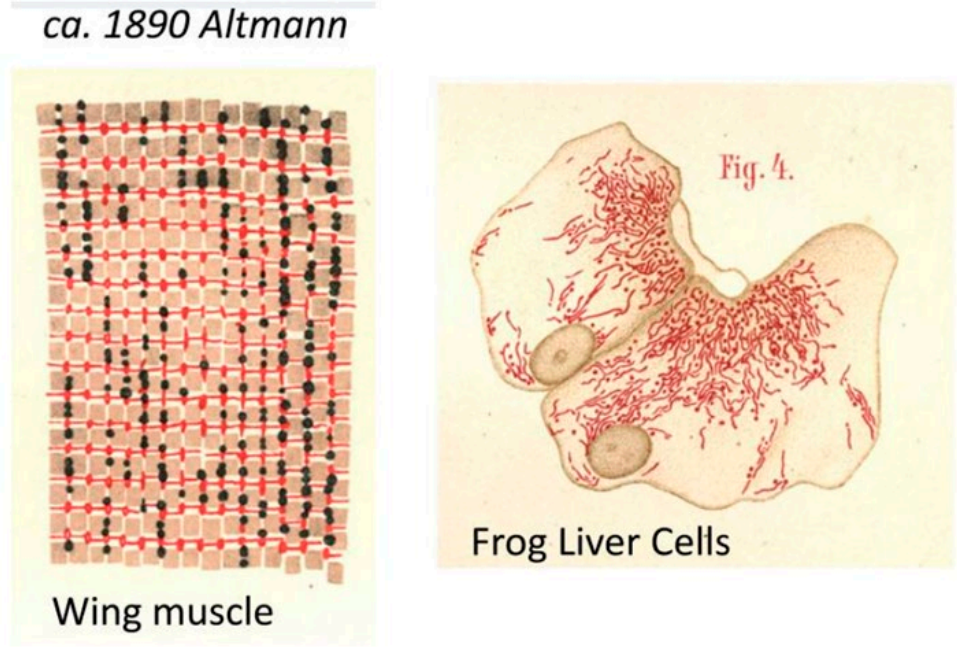


Рис. 2 Формы митохондрий в клетках

Теория симбиогенеза

Картинка, иллюстрирующая название митохондрии – «ниточка-шарик» (рис. 2). Мы видим клетку печени лягушки (справа), она набита ниточками, между которыми есть шарики – это митохондрии. Слева изображена мышца, в которой структуры более структурированы и уложены плотнее. Гипотеза Рихарда Альтмана соответствует общепринятой сейчас теории симбиогенеза. Наши клетки получили митохондрии в ходе удивительного события, когда некий одноклеточный предок, напоминавший

скорее архею, чем бактерию, съел альфа-протеобактерию (ныне существующие альфа-протеобактерии по большей части – это внутриклеточные паразиты, вызывающие у людей тяжелые заболевания, такие как эпидемический тиф, пятнистая лихорадка скалистых гор, эрлихиоз, болезнь кошачьих царапин, бруцеллез; при этом бактерия неограниченно делится в клетке, так что возможно, что предковую альфа-протеобактерию не съели, а она сама пыталась использовала эукариотическую клетку).

Почему они смогли сосуществовать вместе? Протеобактерия имеет преимущество – умение дышать, создавать на одну молекулу глюкозы 38 АТФ вместо 2 АТФ. В итоге взаимодействие протеобактерии и эукариотической клетки оказалось выгодным для обоих, так как протеобактерия получила среду обитания, где контролируется pH, и всегда присутствуют питательные вещества, а клетка получила дополнительные 36 АТФ – несомненное эволюционное преимущество.

Евгений Кунин, биолог и информатик, выдвинул гипотезу, согласно которой мы обязаны митохондриям существованием многоклеточной жизни. Уделим этой теме некоторое внимание. Существуя внутри эукариотической клетки, протеобактерии, тем не менее, могут время от времени лопаться, и тогда их ДНК попадает в цитоплазму эукариотической клетки. В геноме многих бактерий есть прыгающие элементы, и эти элементы могли вставляться в произвольное места генома клетки-хозяина. И чтобы с этим бороться, клетки придумали сплайсинг, который позволил им просто вырезать ненужные куски вставившихся генетических элементов и сшивать оставшиеся. Это также объясняет процесс переноса митохондриальных генов в ядро. В итоге появившаяся способность эукариотической клетки поддерживать сильно расширившийся геном, а так же дополнительные молекулы АТФ, позволили этому симбиотическому организму успешно конкурировать с другими прокариотами.

Основная функция митохондрий – дыхание.

В чем смысл дыхания на уровне биохимии? Есть органические соединения, назовем их дыхательные субстраты, и их можно окислить, получив при этом энергию, и эту энергию использовать на синтез молекул АТФ из АДФ и фосфата. Но происходит это не напрямую, а поэтапно. Первый этап заключается в окислении дыхательных субстратов до углекислого газ и воды, а электроны с них забираются специальной молекулой-переносчиком – НАДН (никотинамидадениндинуклеотид). НАДН – это динуклеотид, у которого вместо канонических оснований есть никотинамид. У никотинамида, который является двухэлектронным переносчиком, есть положение, присоединяющее и отсоединяющее протон (пара НАДН - НАД+). Далее восстановленный НАДН отдает электроны кислороду вместе с протонами, при этом образуется вода. Этот этап был исследован биохимиками довольно давно с помощью отработанных подходов: клетки делили на фракции, исследовали работу ферментов, и довольно быстро изучили так называемый цикл трикарбоновых кислот, он же цикл Кребса.

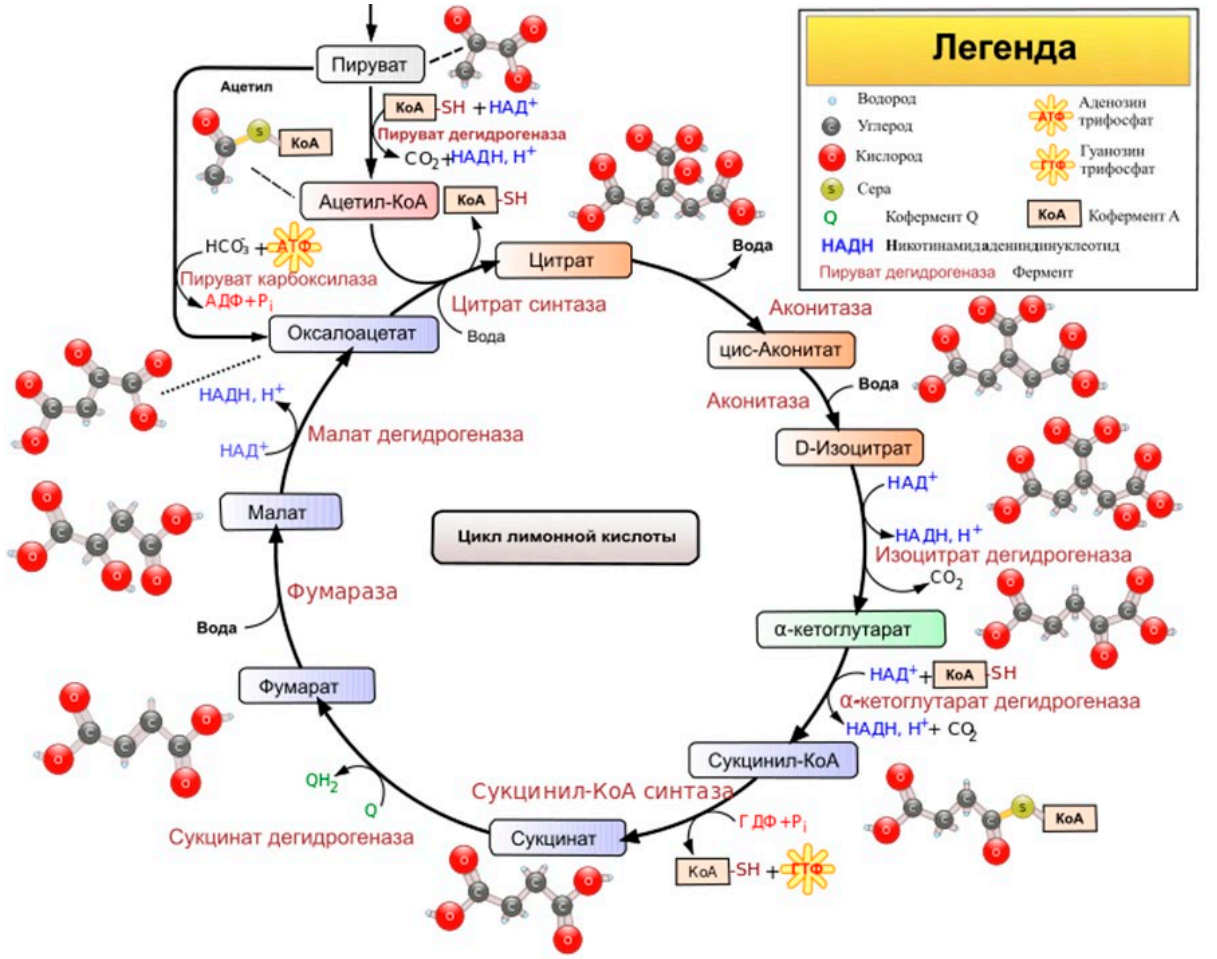


Рис. 3 Цикл Кребса

Каким образом энергия окисления субстратов и НАДН используется для синтеза АТФ? За решение этого вопроса была присуждена Нобелевская премия. И для того, чтобы разобраться в нем, сначала пришлось понять тонкую структуру митохондрий, что стало возможным только после изобретения электронного микроскопа. Оказалось, что у митохондрий есть две мембраны и складки – кристы. Было показано, что кристы несут те самые белки дыхательной цепи.

Рис. 4 Ультраструктура митохондрии

Было показано, что внутри митохондрии, в матриксе, цикл трикарбоновых кислот дает сукцинат, НАДН и хинол. И есть белки мембранные дыхательной цепи, которые называются римскими номерами: комплекс I, комплекс II, комплекс III и комплекс IV. При этом стоит особо отметить, что в комплекс II одновременно является одним из ферментов цикла Кребса, при этом он превращает сукцинат в фумарат, передавая электрон с сукцината на хинон, восстанавливая его до хинола. Комплексы I и III окисляют НАДН, следующий переносчик – цитохром С – отдает электроны на комплекс IV, с последующей передачей их на кислород с образованием воды.

Хемиосмотическая теория Митчелла

И все же долгие годы биохимикам не удавалось установить, где же, собственно, происходит синтез АТФ, так как исследования шли в направлении поиска некой молекулы интермедиата, которая должна была получаться в ходе реакций переноса электрона и далее передавать энергию на синтез АТФ.

И тогда английский биохимик, Питер Митчелл, переписываясь с другим английским биохимиком по фамилии Вильямс, пришел к мысли, что дело может быть не в биохимическом сопряжении, а дело в сопряжении, которое он назвал хемиосмотическим. В ходе работы белком дыхательной цепи происходит выброс ионов водорода в межмембранное пространство митохондрии, и когда это происходит, на непроницаемой для ионов мембране, которая по сути представляет собой изолятор, образуется электрический потенциал (внутри от мембраны получается минус, снаружи плюс) – это и есть результат работы дыхательной цепи, ради которого клетка готова тратить НАДН. Движущая сила этого электрохимического потенциала тратится на синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата (рис. 5). В дальнейшем хемиосмотической теории Митчелла были получены многочисленные подтверждения, в т.ч. в институте им. Белозерского.

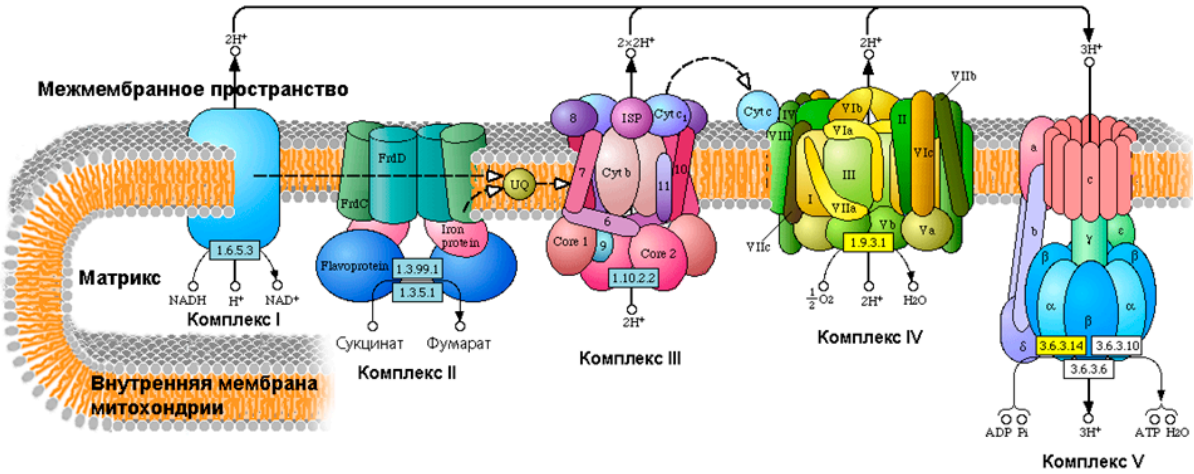


Рис. 5 Ферменты дыхательной цепи

Кратко про белки дыхательной цепи (рис. 5). Первый комплекс – НАДН-дегидрогеназа, окисляет НАДН, передает электроны на переносчик электрона –

убихинон. Он может присоединить два протона, два электрона и превратиться в хинол. Его жирный «хвост» позволяет ему находиться в мембране.

Точно так же комплекс II окисляет сукцинат до фумарата, электроны так же отдает на убихинон. Третий комплекс умеет присоединять в мембране хинол, забирать электроны и перемещать протоны в межмембранное пространство. Полученные электроны он передает на небольшой белок цитохром С, находящийся на внутренней мембране со стороны межмембранного пространства. Все белки, которые называются цитохромами, содержат гемы. Цитохром С отдает электроны четвертому комплексу, который, в свою очередь, передает их на кислород, присоединяя 4 протона на одну молекулу O2, получая две молекулы воды. Комплекс IV – удивительный фермент, т.к. он должен по одному забирать электрон за электроном, до тех пор, пока не накопится 4 электрона, и затем разом передать их вместе с 4 протонами. Итого, в перекачке протонов участвуют комплексы I (работает фактически как ионный насос), комплекс III (переносит протоны с хинола) и комплекс IV. АТФ-синтаза, или же комплекс V, синтезирует АТФ за счет использования протонного градиента.

Митохондриальные мембраны.

Любая биологическая мембрана – это липидный бислой. Липид – это молекула, у которой есть жирные хвосты и полярная головка. Головки направленны в водную фазу, а хвосты обращены друг к другу и формируют пленку. Эта пленка непроницаема для многих веществ, поэтому формирует барьер. Все мембранные белки довольно гидрофобны, поэтому их выделение затруднено: происходит их слипание и выпадение в осадок, так что для выделения мембранных белков используются детергенты, увеличивающие их растворимость в воде. Мембраны способны самособираться, и формируются спонтанно в водной среде. Клеточные биологические мембраны всегда ассиметричны, т.е. имеют разный липидный состав с одной и другой стороны. Полезно представлять мембрану в виде двумерного озера. Липиды довольно подвижны ввиду слабых гидрофобных взаимодействий, но гидрофильные головы удерживают их в одной плоскости. Так, в отличие от, например, бензиновой пленки, где молекулы движутся в 3d, в липидной пленке молекулы движутся в 2d. Подвижность молекул липидов составляет около 1 мкм в минуту. Вязкость примерно в 100 раз больше воды. Отношение белок/липид по весу в мембранах может довольно широко варьироваться. Во внутренней мембране митохондрии оно составляет 1/4 - 4/1.

Проницаемость биомембран.

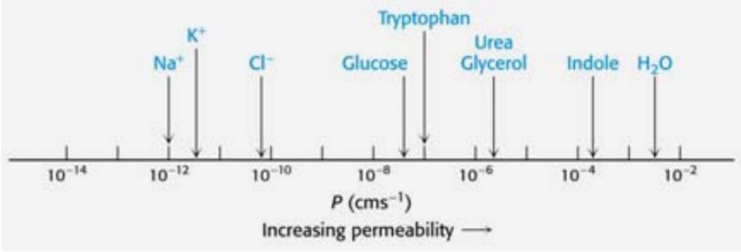


Рис. 6 Шкала проницаемости мембраны для молекул

Проницаемость мембран сильно варьируется для разных веществ (рис. 6). Мембрана достаточно хорошо проницаема для воды, для мочевины и глицерина она на несколько порядков ниже, еще меньше для таких молекул как глюкоза, ионов хлора, одновалентных катионов, и самая низкая проницаемость у двухвалентных катионов.

Почему ионы плохо проходят через мембрану? На самом деле, в растворе ионы гидратированы и окружены двумя слоями связанных молекул воды – плотно и неплотно связанных. И эта гидратная оболочка значительно увеличивает размер ионов и не позволяет им свободно проходить через мембрану. Молекулы с большим количеством ОН групп, такие как глюкоза, также сильно гидратированы. Хорошо через мембрану проходят небольшие незаряженные молекулы, например вода, кислород, ацетон (и многие другие органические растворители).

Подводя итог, можно сказать, что газы походят свободно, этанол, метанол, низкомолекулярные спирты, кетоны тоже проходят хорошо, вода чуть хуже, мочевина уже с трудом, а такие молекулы как глюкоза, ионы, аминокислоты, АТФ проходят совсем плохо.

Чем более гидрофобно соединение, тем легче ему проникать в липидную мембрану, и тем быстрее оно будет через нее проходить. Но также надо помнить, что они будут сильнее накапливаться в мембране. Так, например, коэффициент распределения мембрана/вода для мочевины составляет 0,0002, для диэтилмочевины – 0,01. Для прохождения через мембрану полярность более важна, чем размер.

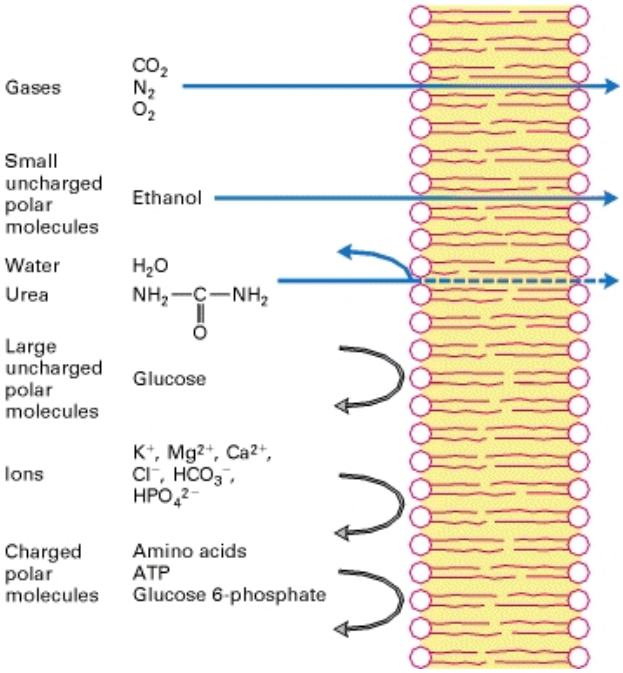


Рис. 7 Проницаемость бислоя мембраны для некоторых веществ

Транспортные системы мембран

Возникает вопрос, как происходит **обмен между митохондрией и клеткой**?

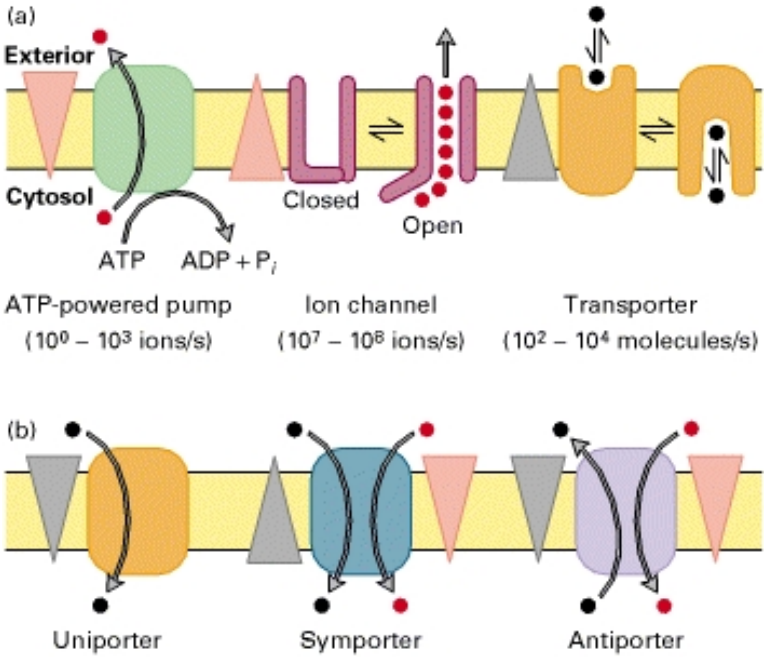


Рис. 8 Транспортные белки мембраны

Транспорт происходит с помощью транспортных белков (рис. 8). Они делятся на каналы, насосы и обменники (переносчики). Канал является гидрофобным белков, который образует отверстие в мембране, достаточно гидрофильное для пропускания ионов, теряющих гидратную оболочку, обычно бывает открытое и закрытое состояние.

Благодаря тому, что в месте, в котором ионы проходят через белок, создается специальная структура, моделирующая гидратную оболочку иона, можно создать ион-селективные каналы.

Например, если белок устроен так, что пропускает натрий, то калий проходить через него не будет, и наоборот, если канал больше и пропускает калий, то для натрия не создаются условия потери гидратной оболочки, так что проходить он также не будет. За время, пока канал открыт, могут проходить десятки и сотни ионов в секунду.

Однако в митохондрии в норме большинство каналов закрыто для сохранения мембранного потенциала, и работают они только в исключительных случаях.

Переносчик – это белок, который не создает отверстие в мембране, а присоединяет молекулу с одной стороны мембраны, изменяет конфигурацию и выпускает ее с другой стороны. Из-за необходимости изменения конформации переносчики работает гораздо медленнее. К переносчикам относятся обменники, и они делятся на несколько типов: унипортеры (работают только с одной молекулой), симпортеры (переносят две разные молекулы в одном направлении), антипортеры (переносит две разные молекулы в противоположных направлениях, например АТФ/АДФ антипортер в митохондрии). Ионные насосы имеют две части: одна из них предназначена для использования внешней энергии (АТФ, мембранный потенциал и т.д.), а другая за счет этой энергии выполняет действие переноса.

Холестерол в мембранах.

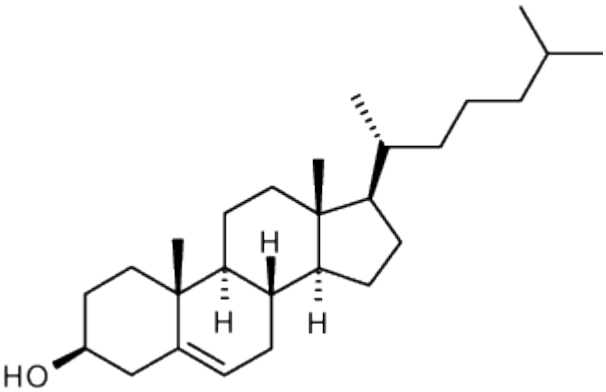


Рис. 9 Молекула холестерола

Холестерол необходим для модуляции растворимости мембраны и ее точки фазового перехода, т.к. он нарушает организацию липидных хвостов бислоя за счет своей ненасыщенности.

Кардиолипин в мембранах.

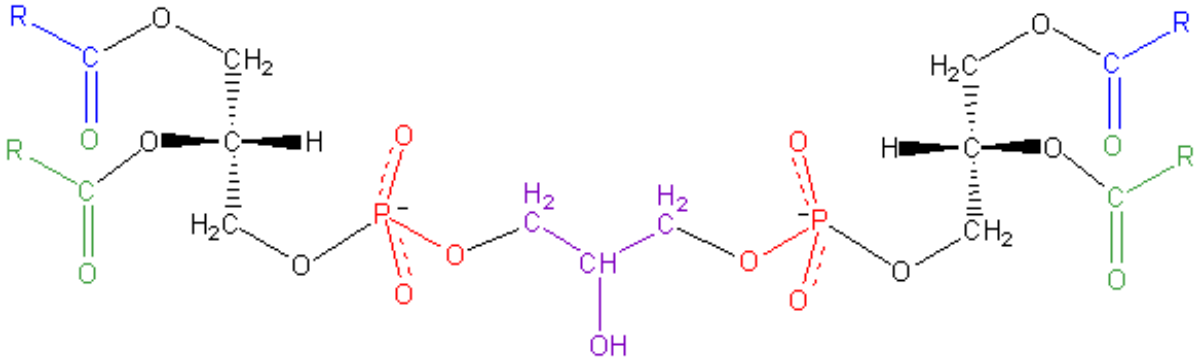


Рис. 10 Молекула кардиолипина

Кардиолипин впервые был выделен из митохондрий мышечной ткани бычьих сердец. Он представляет собой двойной фосфолипид, составляет до 20% всех липидов внутренней мембраны митохондрии и является важным аспектом правильной работы белков дыхательной цепи. Примечательно, что кроме митохондрий кардиолипин характерен только для бактерий, и не характерен для любых других эукариотических клеток и архибактерий.

Энергетическая роль митохондрий

Митохондрий много там, где нужно много энергии, например - в сетчатке глаза. Увеличение рабочей площади митохондрии достигается за счет увеличение количества крист.

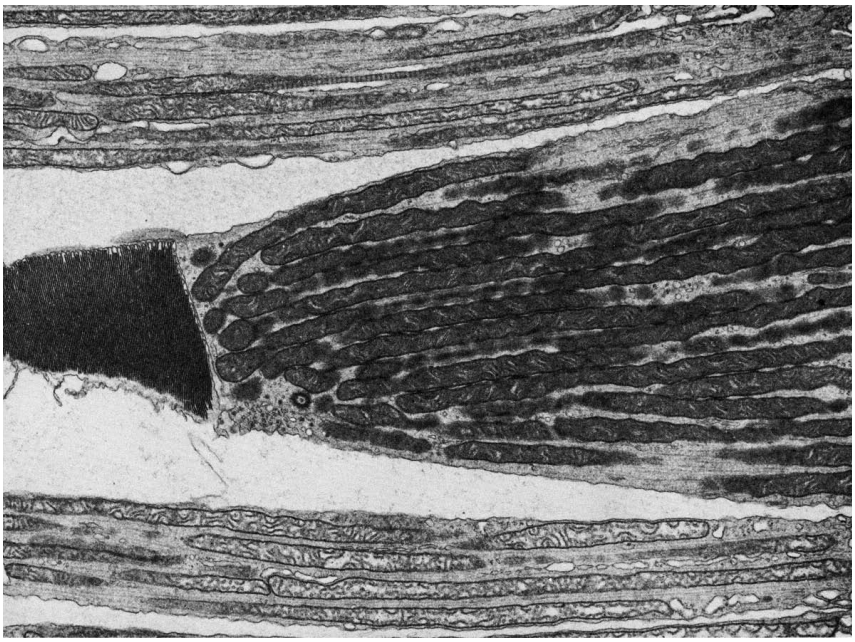


Рис. 11 Фотография микроструктуры сетчатки глаза. Клетки-палочки (снизу и сверху), клетка-колбочка (посередине), заполнены митохондриями.

Митохондрии в цифрах

Размер: 0,5-10мкм.
Количество на клетку: от 1 до ~10 000 шт. Количество митохондрий в клетке может динамично изменяться; чаще митохондрии находятся в клетке в виде митохондриального ретикулума, а не отдельных органелл.
мтДНК: от 6 до 2900 тыс. пар оснований (у человека: кольцевая, 16 569 п.о.)
Количество белков: 1000-1500
Мембраны: 2
Электрический потенциал: на внешней мембране 0, на внутренней – 180 мВ

Роль митохондрий в патологиях

В последнее время замечена большая роль митохондрий в разных патологиях, в т.ч. онкологических заболеваниях, воспалительных процессах, старении, в клеточной гибели.

Сайт проекта MitoCarta, направленного на определение всех митохондриальных белков:
http://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta/

Количественное распределение белков митохондрии

Белки дыхательной цепи и энергетического метаболизма являются самыми многочисленными (рис. 12), следом идут переносчики и каналы, система импорта и созревания белков, белки метаболизма липидов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, аппарат трансляции и экспрессии, белки сигнальных каскадов, и самыми малочисленными являются белки биосинтеза железосерных кластеров и белки динамики и морфологии.

Транспорт митохондриальных белков, которые синтезируются за пределами митохондрии, осуществляется специальной системой транспортных белков. На таких белках есть так называемый *митохондриальный адрес* – специальная последовательность, указывающая путь белка в митохондрию. В цитоплазме система, которая во время трансляции узнает этот адрес, останавливает синтез до тех пор, пока рибосома не сядет вместе с фрагментом белка на митохондрию, и только тогда снова запускает синтез, после которого белок попадает в митохондрию.

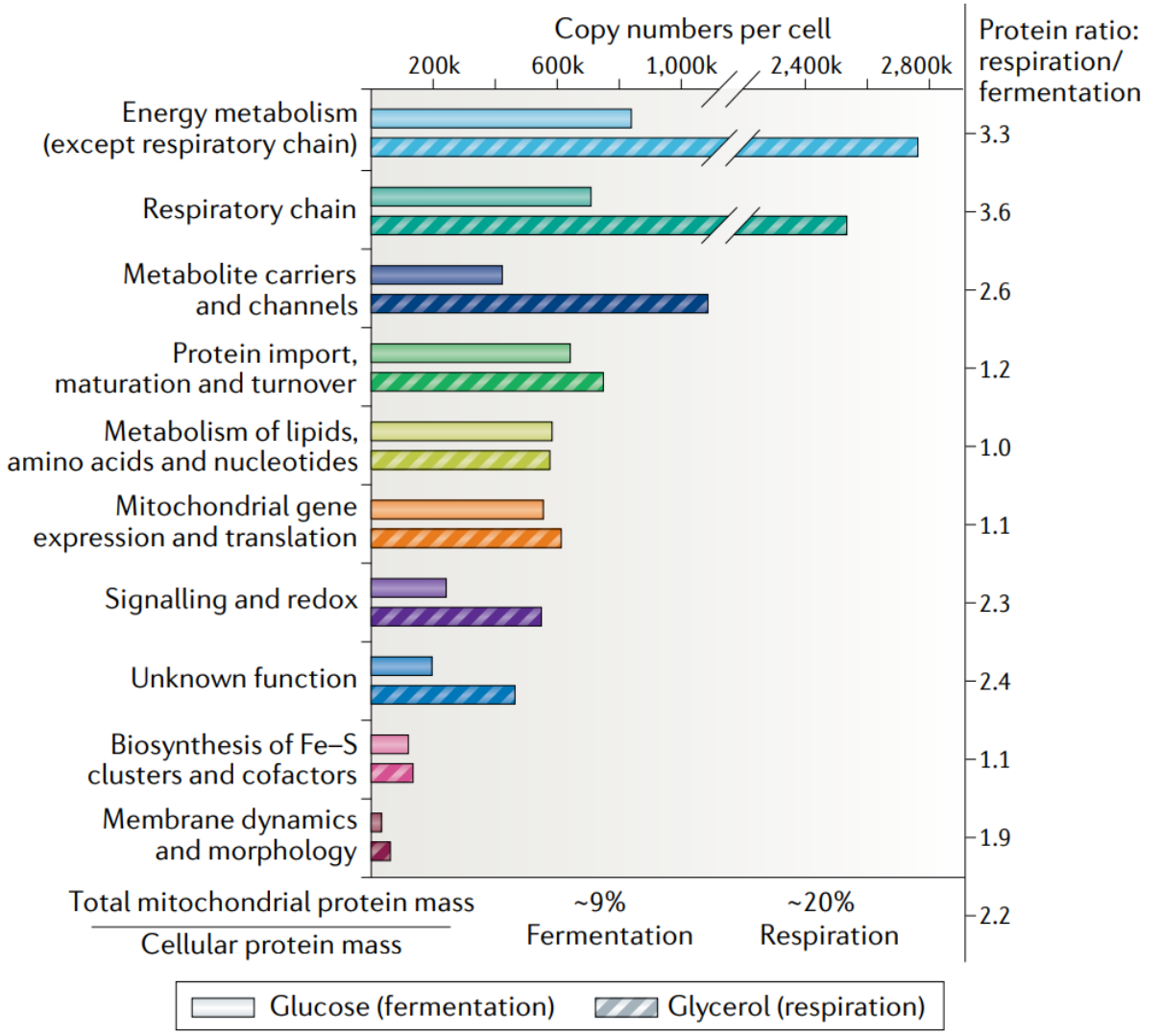
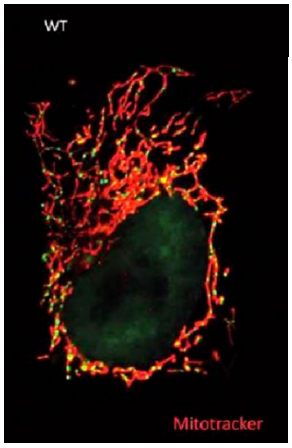


Рис. 12 Количество молекул митохондриальных белков на клетку

Лекция 2.

В ходе лекций часть материала будет посвящена методам изучения клеточных структур, в частности митохондрий

В данном случае клетка HeLa (линия раковых клеток) окрашена красным флуоресцентным зондом. Это положительно заряженная, довольно гидрофобная молекула, она проходит через мембраны и накапливается в области накапливания отрицательного заряда митохондрий.



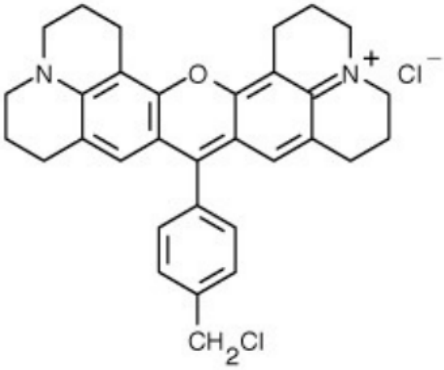


Рис 1. клетка Hela Рис. 2 Митотрекер красный

Количественная оценка митохондрий

Невозможно точно сказать, сколько митохондрий находится в клетке. Гораздо правильнее оценивать количество митохондрий по:
1) содержанию специфичных митохондриальных белков (закодированных в мтДНК)
2) числу копий митохондриальной ДНК
3) количеству нуклеоидов – белковым комплексов ДНК, содержащих в среднем 1,5 копий ДНК

Этилродамин – также положительно заряженный флуоресцентный краситель, накапливается в митохондриях в областях скопления отрицательных зарядов. Обычно в клетках сложно изучать отдельные митохондрии, так как они объединены в сеть.
Был проведен эксперимент: фибробласт человека окрасили этилродамином (на рис.3 видны окрашенные митохондрии); затем лазером выжгли участок митохондриальной системы, в результате чего трансмембранный потенциал упал и в области локального повреждения мембран, и в достаточно большой области вокруг него; при этом краситель уравновешивается с цитоплазмой и флуоресценция митохондрии уменьшается.

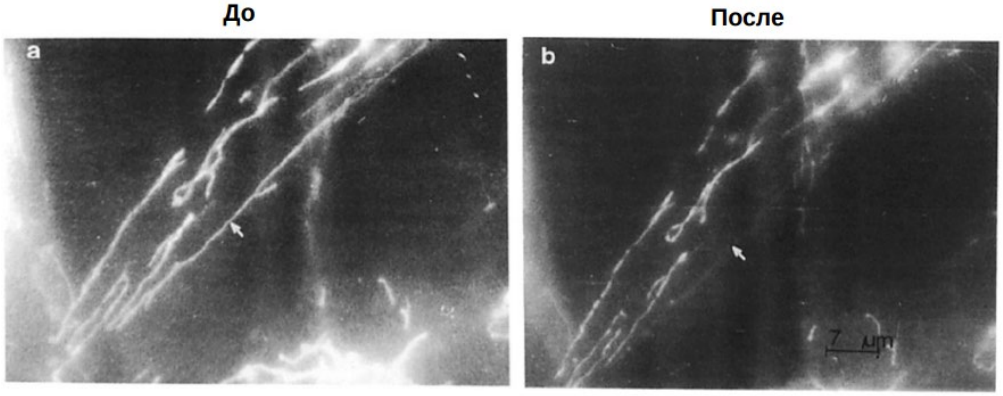


Рис. 3 Эксперимент с этилродамином

Митохондрии в клетке образуют подвижную сеть, и в клетке постоянно происходят слияния и деления митохондрий, поэтому имеет смысл говорить не об отдельных митохондриях, а о митохондриальном ретикулуме. Прекращение или замедление (ингибирование процессов слияния) приводит к фрагментации митохондриального ретикулума.

С помощью siRNA уменьшили кол-во белка Mfn1, необходимого для слияния митохондрий:

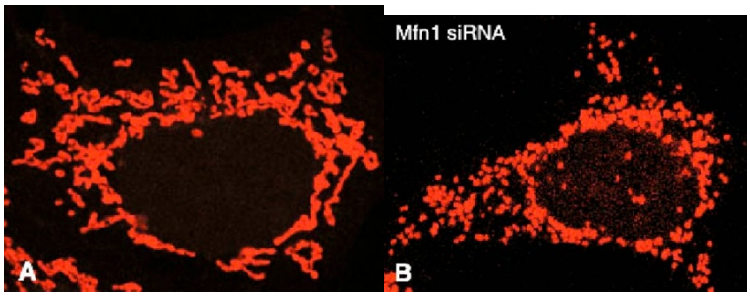


Рис. 4 Клетки дикого типа и с siRNA

И наоборот, ингибирование процессов деления приводит к появлению большой протяженной сети с малым количеством свободных концов:

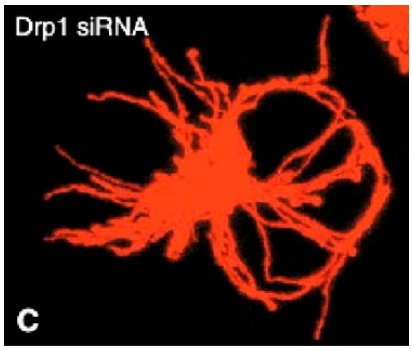


Рис. 5 Клетка с siRNA по Drp1

Под **митохондриальной динамикой** обычно подразумевают процесс слияния и деления митохондрий, т.е. некий процесс перестройки митохондриальной сети, происходящий постоянно даже в покоящихся клетках.

Гетерогенность митохондрий

В определенных случаях можно наблюдать гетерогенность митохондрий.

На рисунке показана клетка HeLa, окрашенная флуоресцентным зондом JC-1, имеющим свойство окрашивать митохондрии с высоким трансмембранным потенциалом в красный, с низким – в зеленый.

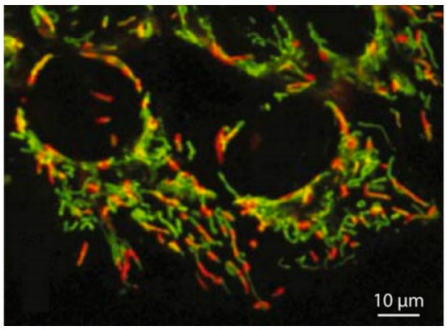


Рис. 6 HeLa, окрашенная флуоресцентным зондом JC-1

Про зонд JC-1:

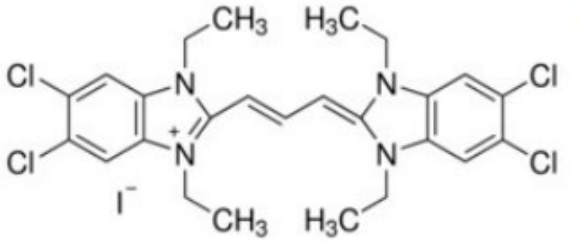


Рис. 7 Молекула JC-1

Заключение:

– митохондрии в клетке образуют единую сеть, отдельные элементы которой могут делиться и объединяться друг с другом
– в большинстве случаев имеет смысл рассматривать митохондрии как единое целое
– баланс слияний и делений митохондрий определяет среднюю протяженность митохондрий в клетке

Деление митохондрий

За деление митохондрий отвечают динамин–подобные белки, способные за счет энергии гидролиза ГТФ менять свою конформацию.

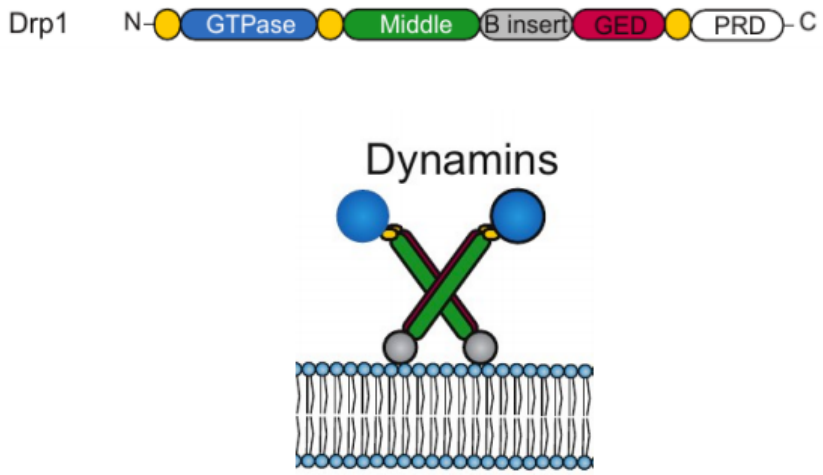


Рис. 8 Строение Drp1

Drp1(Dynamin Related Protein 1) (рис. 8)– динамин-подобный белок человека и остальных млекопитающих, Dnm1 – его гомолог у дрожжей. Эти два белка в контексте лекции равнозначны, имеют почти одинаковое строение и функции, но упоминаются оба белка, т.к. часть исследований проводится на животных белках, часть - на белках дрожжей.

Имеет несколько доменов, один из которых обладает ГТФазной активностью, часть нужна для связывания с мембраной, часть для осуществления механической работы. Drp1 связывается с поверхностью искусственной мембраны; GTP нужен для работы олигомера Drp1 на искусственных везикулах:

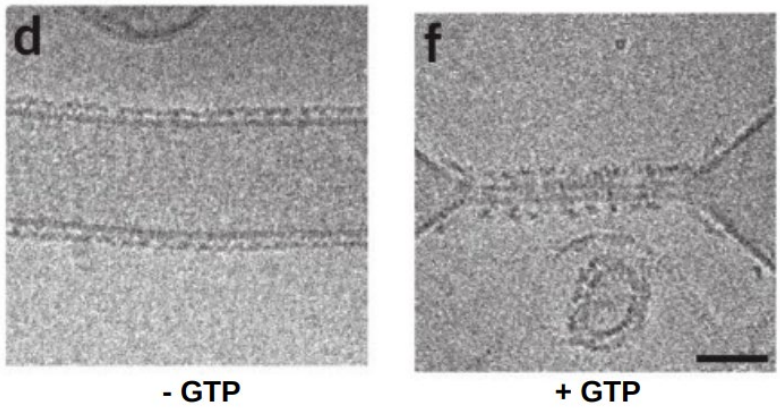


Рис. 9 Связывание мембран искусственных везикул с помощью Drp1

Dnm1 образует олигомер в виде спирали вокруг мембраны. При наличии «разрешения» регуляторной системы, белок гидролизует ГТФ, меняет конформацию, в итоге весь

олигомер, образующий спираль, скручивается и сужает митохондрию. Получившееся суженное состояние митохондрии нестабильно, происходят липидные перестройки, и в итоге она разделяется на две независимые органеллы:

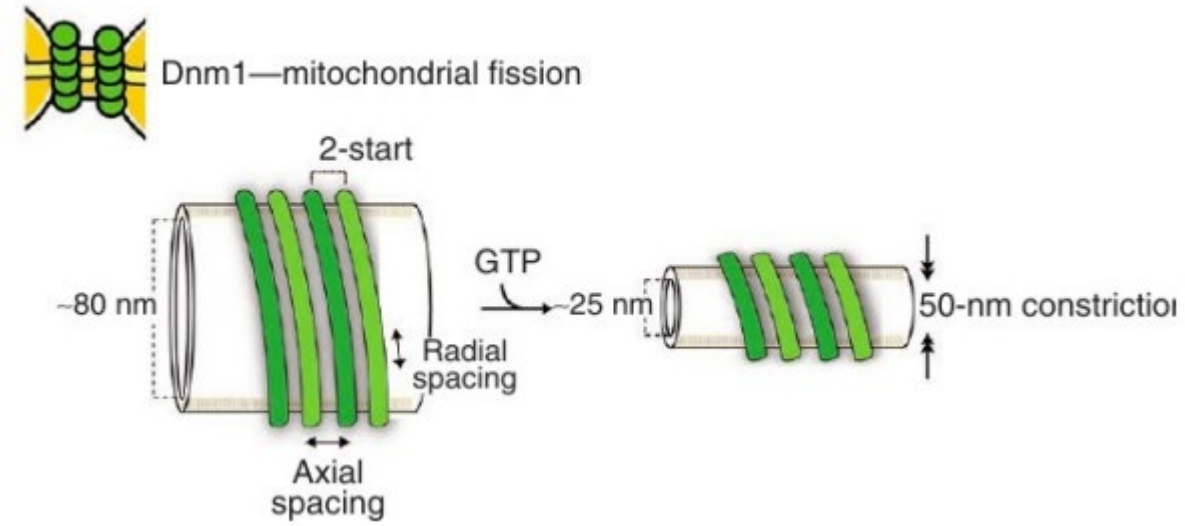


Рис. 10 Сжатие спирали, образованной олигомером Dnm1

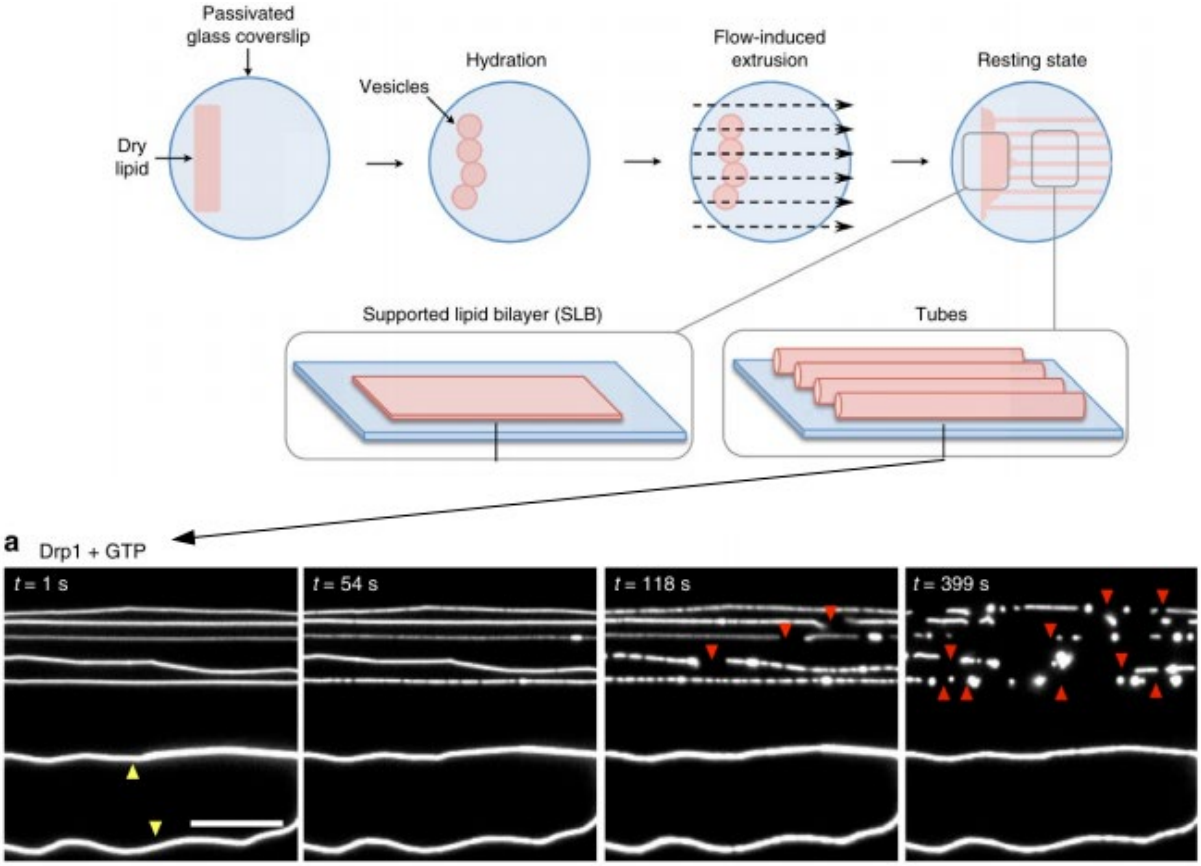


Рис. 11 Описание опыта, показывающего способность Drp1 вызывать дробление мембранных структур в присутствии ГТФ.

(рис 11) Исследователи наносили липид на стекло, гидратировали поверхность, вызывая образование везикул, затем с помощью тока жидкости вытягивали из везикул полые трубочки, окрашивали их специальным флуоресцентным зондом, после чего добавляли Drp1 и ГТФ. В результате наблюдали дробление этих трубочек.

Dnm1 нарабатывается в цитоплазме на рибосомах, связавшись с ГТФ, меняет свои свойства и получает повышенное сродство к митохондриальной мембране. Если в каком-то месте митохондрии собирается достаточное количество молекул Dnm1, образующих спирали, то происходит скручивание и дальнейшее деление митохондрии. Примечательно, что после разделения органеллы молекулы белка вновь уходят в цитоплазму. В цитоплазме находится пул молекул Dnm1, в т.ч. в виде олигомеров различного состава.

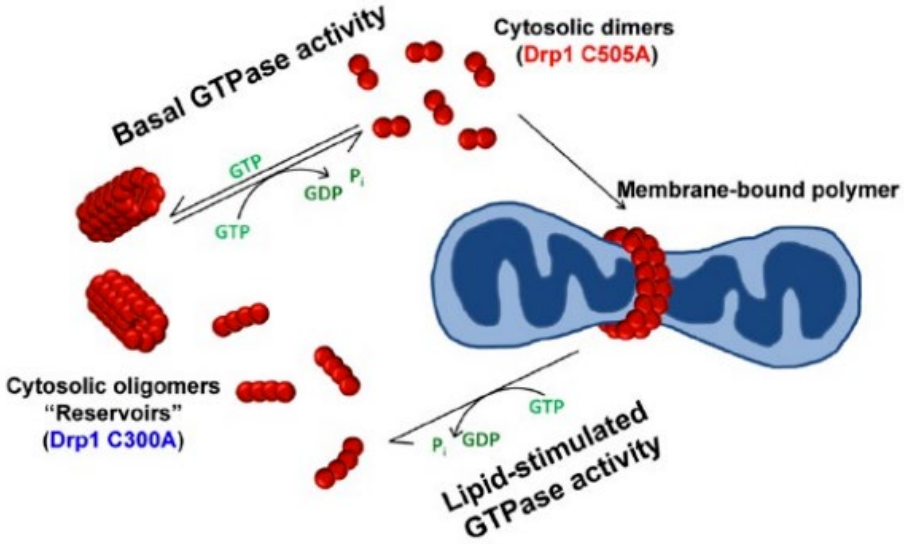


Рис. 12 Цикл работы Drp1 или Dnm1

Drp 1 также участвует в дроблении других мембранных структур – пероксисом.

На рисунке 13 представлены две ситуации: 1) клетка с флуоресцентно окрашенными пероксисомами, нормальная работа Drp1 – пероксисомы представляют собой отдельные органеллы 2) работа Drp1 подавлена с помощью siRNA – пероксисомы образуют непрерывную сеть

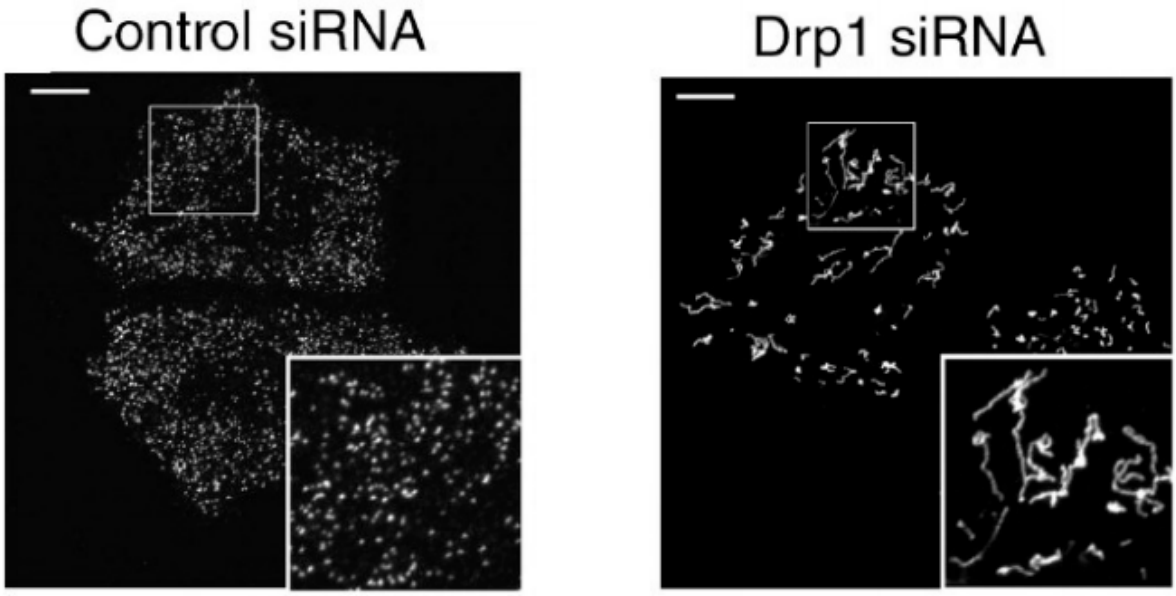


Рис. 13 Флуоресцентно окрашенные пероксисомы в клетке дикого типа и с siRNA

Для связывания с биологическими мембранами белку Dnm1 требуются специальные рецепторы. Например, рецептор связывания белка с митохондриальной мембраной у дрожжей – Fis1p. Этот рецептор синтезируется в цитоплазме, импортируется в наружную мембрану митохондрии. В случае дрожжей, Dnm1 связывается не напрямую с рецептором, а через белок «адаптер». Такие адаптеры влияют на способность олигомеризующегося белка к гидролизу ГТФ и образованию спиралей. Для Drp1 на данный момент известно как минимум три рецептора – Mid49, Mff, Fis1, имеющих различные свойства и особенности работы.

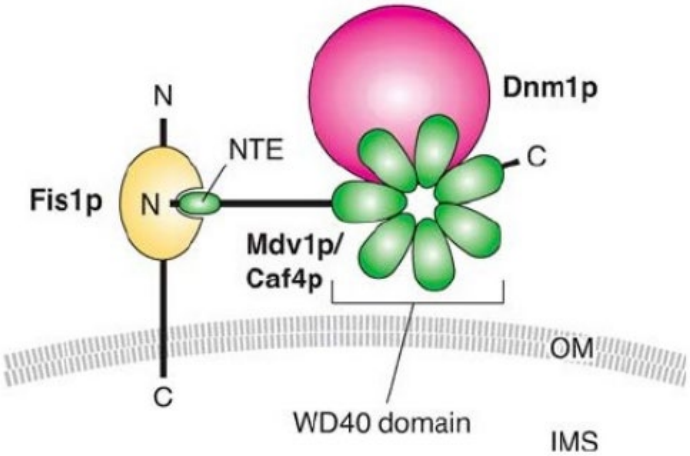


Рис. 14 Рецептор Fis1p

Второй динамин-подобный белок у животных – Dyn2 – действует синергично и завершает полное разделение митохондрий. В отсутствие этого белка получаются не до конца разделившиеся структуры с тонкими перетяжками.

Пока достоверно неизвестно, как именно определяется сайт, в котором динамин подобные белки «разрезают» митохондрию, однако основной принцип состоит в том, что в каждой получившейся отдельной органелле должна быть своя ДНК. Есть данные, показывающие, что сборка спиралей этих белков происходит преимущественно в местах контактов митохондрий с эндоплазматическим ретикулумом.

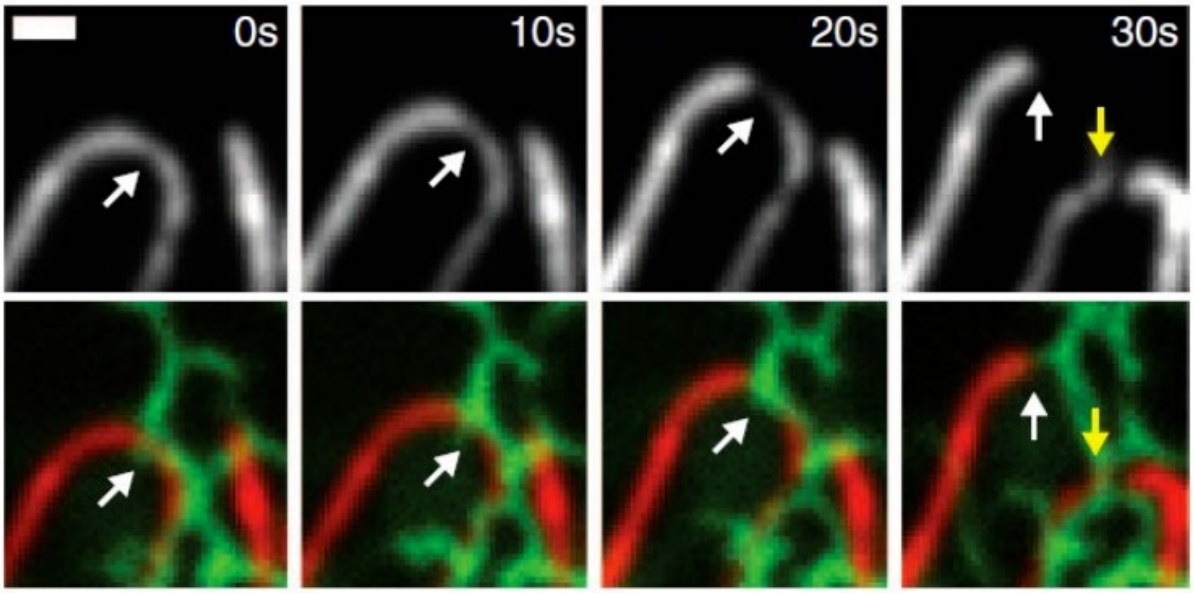


Рис.15 Контакт митохондриального и эндоплазматического ретикулумов
Верхняя линия кадров: развитие деления митохондрии во времени. Нижняя линия: красным показана митохондрия, зеленым – ЭПР.

Итого: в местах контакта ЭПР с митохондриальным ретикулумом происходит сборка спиралей белка Drp1, скручивание спиралей. На суженном участке происходит рекрутинг Dyn2 и окончательное разрезание митохондрии. Оба белка диссоциируют с поверхности митохондрии в цитоплазму, и цикл начинается заново. (рис. 16)

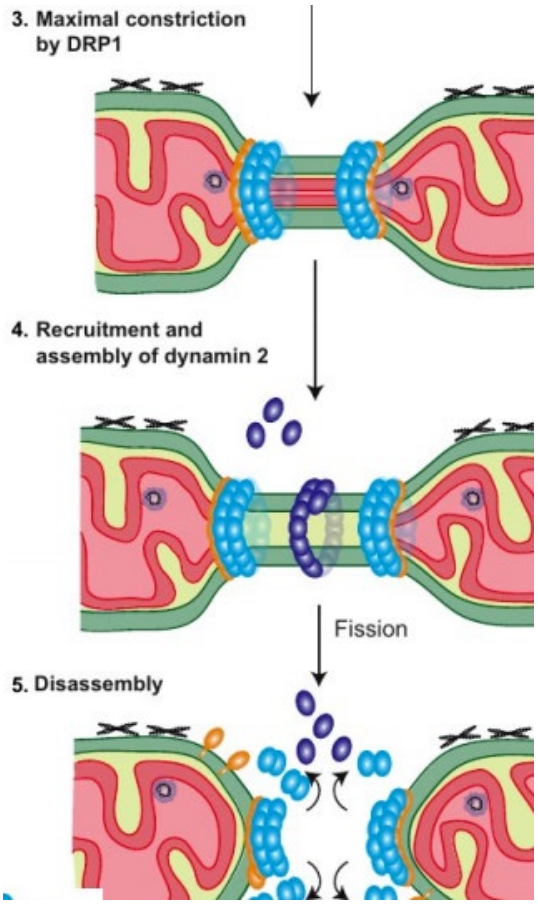
У некоторых групп эукариот сохранился другой механизм деления митохондрий: он осуществляется белком, гомологичным бактериальному FtsZ. FtsZ собирается внутри бактерии и осуществляет ее деление.

Заключение:

1. Деление (дробление) митохондрий – это активный процесс, требующий затрат энергии (гидролиз ГТФ)
2. Деление митохондрий – результат слаженной работы систем, образованных олигомерами белков Drp1 и Dyn2.
3. Молекулярная машина разрезает митохондрии «снаружи», на поверхности наружной мембраны.

Открытые вопросы в изучении динамики митохондрий:

- в какой степени наличие крист ограничивает диффузию белков и мтДНК по митохондриальной сети?
- как происходит инициация дробления?
- как происходит проверка наличия мтДНК в каждой образовавшейся отдельной митохондрии?
- существуют ли механизмы дробления, независимые от Drp1 и другие рецепторы?


3. Maximal constriction
by DRP1
4. Recruitment and
assembly of dynamin 2
Fission
5. Disassembly

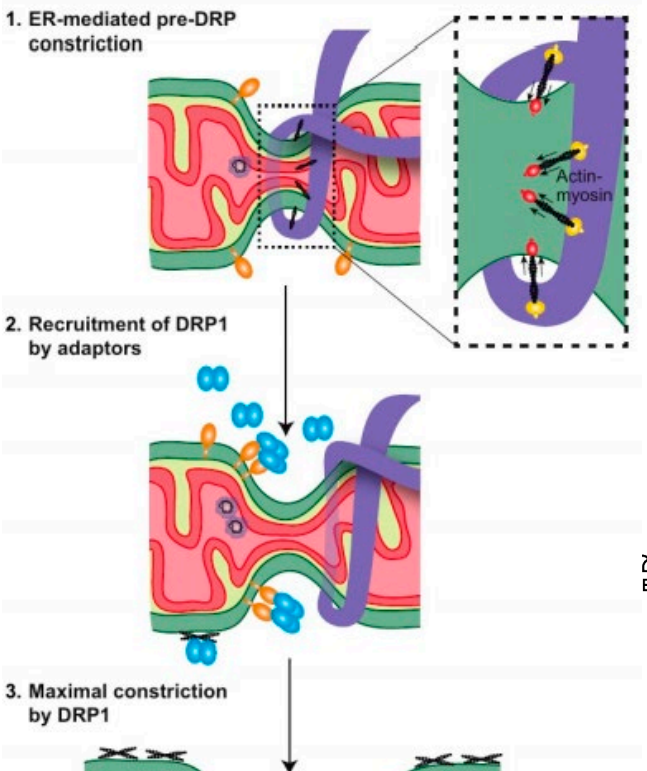

1. ER-mediated pre-DRP
constriction
Actin-
myosin
2. Recruitment of DRP1
by adaptors
3. Maximal constriction
by DRP1

Рис. 16 Схема работы аппарата деления митохондрии

Лекция 3

В этой лекции также будут упоминаться аналогичные белки как многоклеточных животных, так и одноклеточных дрожжей.

Белки процессов слияния

Основные белки ГТФазы процесса слияния митохондрий у дрожжей:
– Fzo1 (метафузин; отвечает за слияние наружных мембран митохондрий)
– Mgm1 (mitochondrial genome maintenance; отвечает за слияние внутренних мембран митохондрий).

Важно отметить, что, в отличие от белков вроде Dnm1, у Fzo1 есть трансмембранные домены, т.е. они интегрированы в мембрану.

Белки процесса слияния митохондрий у человека
- гомологи MFN1 и MNF2 (слияние наружных мембран)
- OPA1 (optic atrophy; влияние внутренних мембран)

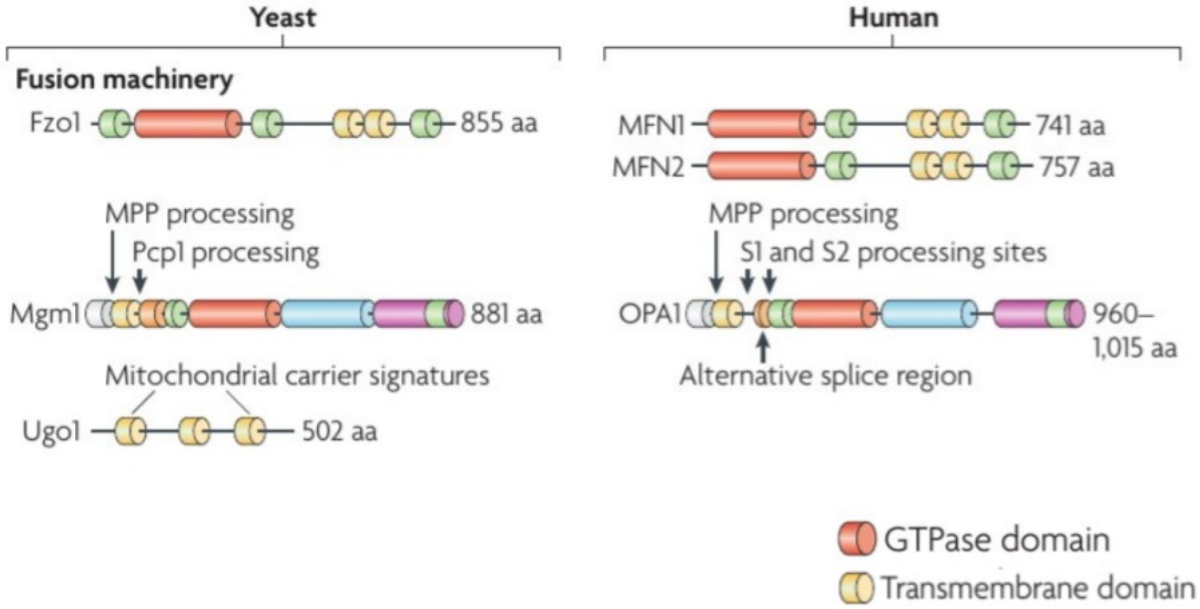


Рис. 1 Белки процесса слияния митохондрий

Строение белковых комплексов, принимающих участие в слиянии митохондрий у дрожжей и у млекопитающих.

У Fzo1 есть два трансмембранных домена и один ГТФазный, белок обращен наружу от мембраны. Mgm1 также заякорен в мембране с помощью трансмембранного домена и обращен в межмембранное пространство. Ugo1 – вспомогательный белок с неясными свойствами, неизвестно, есть ли аналог у млекопитающих.

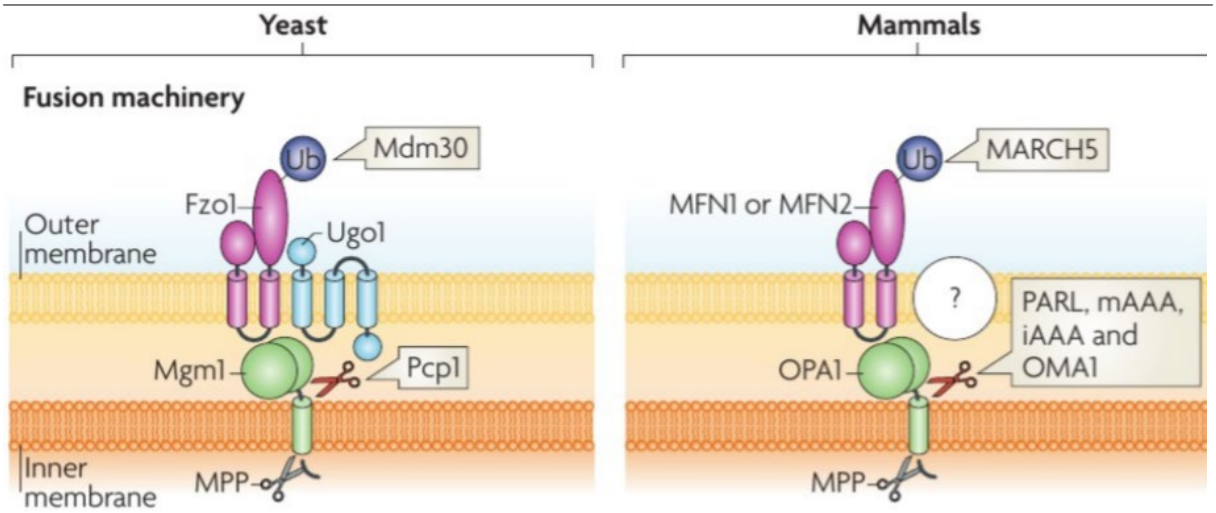


Рис. 2 Строение Fzo1 у дрожжей и млекопитающих

Как исследуют слияние мембран?

В мембраны липосом добавляют исследуемый белок, нагружают липосому флуоресцентным зондом и его тушителем, а потом добавляют не меченые липосомы. Если произошло слияние, то и флуоресцентный зонд, и тушитель распределяются по получившейся большей площади. В результате флуоресценция образца вырастает.
Также с флуоресценцией связан другой способ: митохондрии метят флуоресцентными зондами двух цветов, а после предполагаемого процесса слияние ищут митохондрии, в которых перекрываются сигналы от этих меток.

Последовательность событий при слиянии наружных мембран митохондрий.

Слияние наружных мембран

Fzo1, как и большая часть белков, синтезируется в цитоплазме и импортируется в мембрану митохондрии. Белок димеризуется в цис-димер (если в течение некоторого времени этого не происходит, то он убиквитинируется и деградирует). При сближении частей наружной мембраны, на которых расположены эти цис-димеры происходит объединение в транс-комплекс; срабатывание ГТФазы вызывает конформационное изменение комплекса и сближение мембран, после чего весь комплекс убиквитинируется и деградирует.

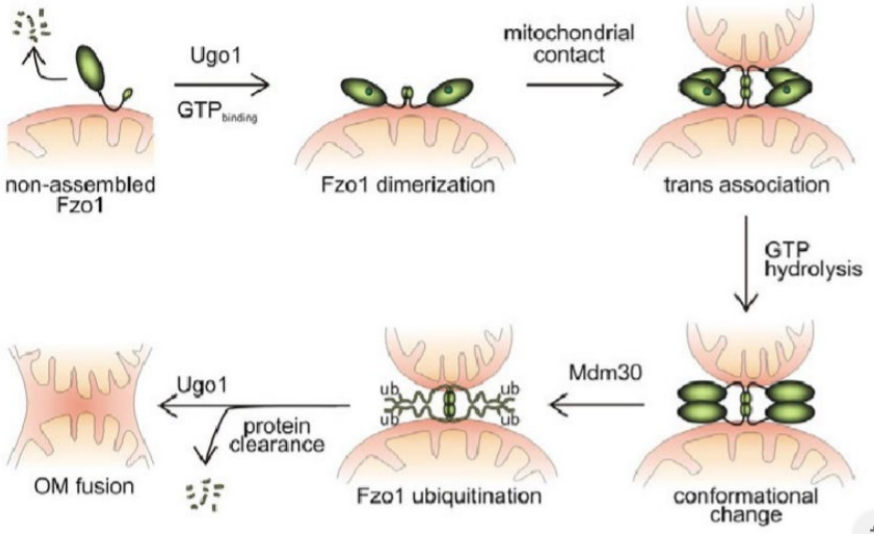


Рис. 3 Механизм работы Fzo1

Сейчас уже расшифрованы структуры метафузинов и принцип их механической работы: фактически, изменение конформации приводит к складыванию белка по «шарнирному» участку. Однако, как на молекулярном уровне происходит собственно слияние мембран – пока не известно, так как это сложный для моделирования и представления процесс.

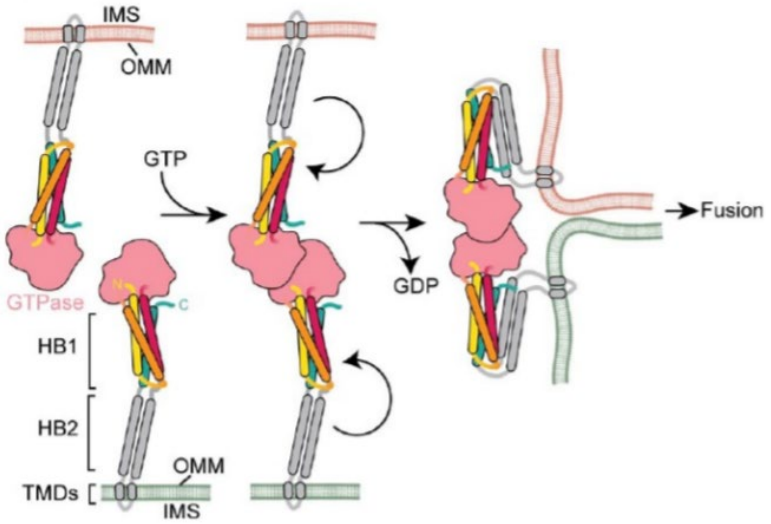


Рис. 4 Принцип работы метафузинов

Слияние внутренних мембран

Как процесс слияния внутренних мембран зависит от их трансмембранного потенциала? В митохондрии есть система, зависящая от трансмембранного потенциала – это импорт белков в матрикс митохондрии через внутреннюю мембрану. В норме, чтобы белок попал внутрь митохондрии, нужна энергия, в частности – трансмембранный потенциал. Так, например, белок OPA1, синтезировавшись в цитозоле,

транспортируется внутрь митохондрии и интегрируется во внутреннюю мембрану. Уже после этого OPA1 может подвергаться атаке протеазами для превращения, в т.ч. в свободную форму белка, которая остается в межмембранном пространстве. Для нормального слияния митохондрий необходимы как заякоренная, так и свободная форма белка. Еще один белок, транспортирующийся в митохондрию – протеаза OMA1. Пока митохондрия высоко энергизована, OMA1 быстро деградирует, но если трансмембранный потенциал падает (из-за поломки дыхательной цепи и т.д.), то протеаза стабилизируется на поверхности внутренней мембраны и начинает атаковать одну из форм OPA1, после чего митохондрия оказывается неспособной к слиянию. Таким образом, через потенциал-зависимый транспорт белков регулируется способность митохондрий к слиянию.

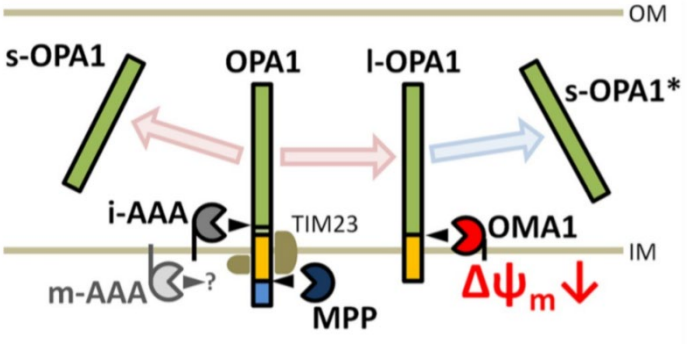


Рис. 5 Преобразование белка OPA1 в митохондрии

Важным отличием OPA1 от метафузинов является тот факт, что OPA1 осуществляет слияние мембран без образования транс-димеров, используя только либо мономеры L-OPA1 либо цис-гетеродимеры L-OPA1/S-OPA1, образующиеся в ходе процессинга на мембране. При этом OPA1 узнает те участки мембраны, в которых повышено содержание кардиолипина.

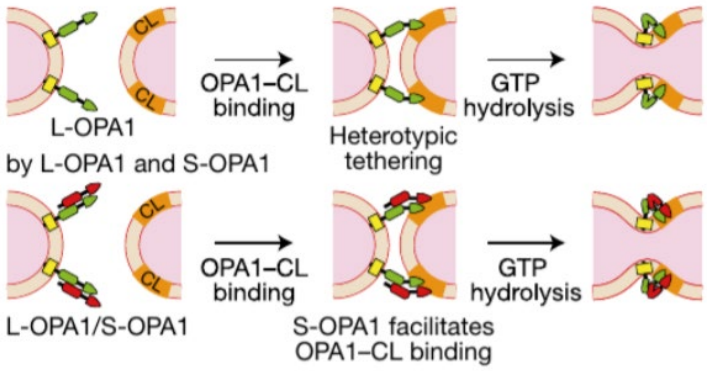


Рис. 6 Механизм слияния мембран с помощью OPA

При образовании транс-димеров L-OPA1 происходит не слияние мембран, а их сближение и образование «складки». Такие взаимодействия играют роль в образовании крист.

Факторы, влияющие на процесс слияния

Довольно много разных факторов влияет на процесс слияния мембран: например, инициация слияния наружных мембран чувствительна к окислительно-восстановительному балансу клетки, т.к. один из первых этапов образования транс-димеров метафузина связан с образованием дисульфидных мостиков. Также для слияния мембран, как наружных, так и внутренних, важен липидный состав. Несимметричность состава монослоев может влиять на кривизну поверхности бислоя.

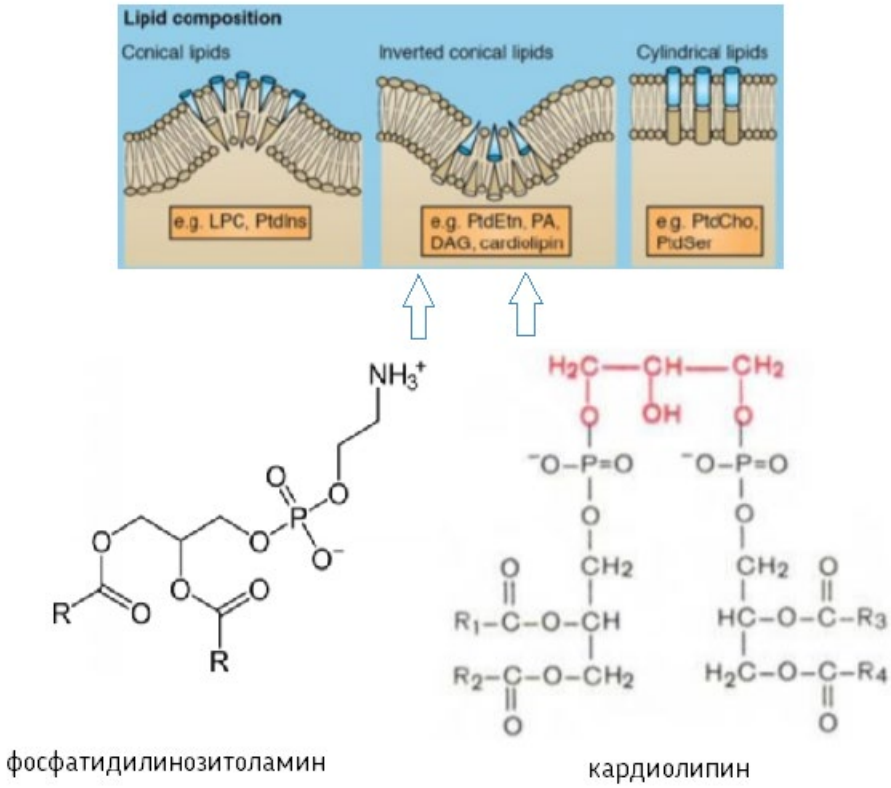


Рис. 7 Влияние кардиолипина и фосфатидилинозитола на кривизну мембраны

Кардиолипин: имеет 4 остатка жирных кислоты (большая гидрофобная часть), маленькую гидрофильную «головку» и соответственно дает отрицательную кривизну (выгибает мембрану «внутрь»). Такое же свойство имеет фосфатидилэтаноламин. Если появляется недостаток этих липидов, то слияние мембран отсутствует или сильно заингибировано.

В 2009 году был открыт так называемый процесс ‘Kiss and run’ – довольно быстрое для митохондриальной динамики слияние (~ 6 сек) и последующее дробление (~ 2 мин) митохондрий, в ходе которого их содержимое успевает перемешиваться. Предполагается, что этот механизм предназначен для лучшего перемешивания содержимого митохондрий, так как обычно из-за складчатости крист диффузия, особенно белков, вдоль митохондрии затруднена.

Итого:

1. Слияние митохондрий происходит в 3 этапа: докинг, слияние наружных и слияние внутренних мембран, при этом процесс может быть остановлен на любом этапе.
2. Слияние митохондрий требует затрат энергии – гидролиза ГТФ.
3. Слияние внутренних мембран митохондрий регулируется трансмембранным потенциалом.

Открытые вопросы изучения:

- как происходит ремоделинг мембран при слиянии митохондрий?
- как происходит выбор сайтов слияния?

Кристы митохондрий.

Митохондрия – не просто двумембранная органелла. Ее внутренняя мембрана образует складчатость – кристы – значительно увеличивающую площадь внутренней поверхности. Такое внутреннее строение усложняет ремоделинг мембран при митохондриальной динамике.

Кристы могут сильно различаться по форме.

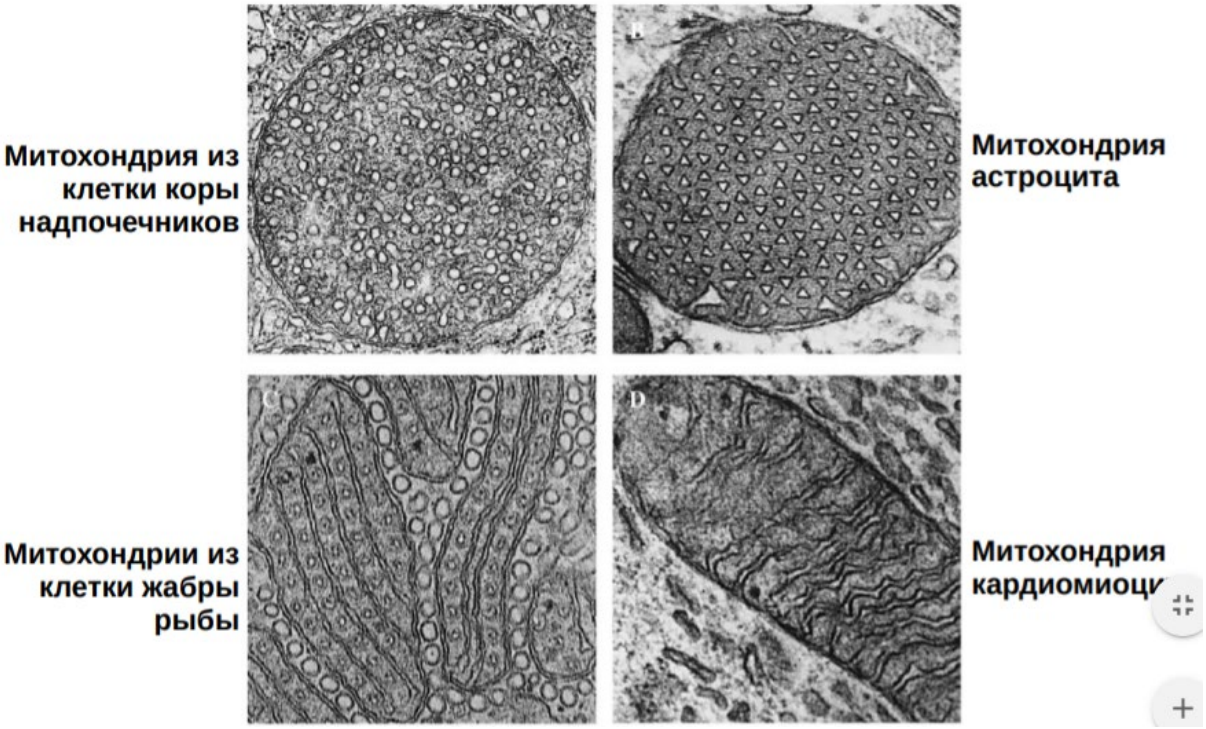


Рис. 8 Различные формы крист

При изучении строения крист при помощи электронной микроскопии надо помнить, что на срезах разного уровня кристы будут выглядеть по-разному в соответствии со

своей 3d структурой, поэтому для реконструкции изображения важно рассматривать в серию срезов в совокупности. И чаще всего кристы являются бутылкообразными: узкие участки, расширяющиеся к концу.

Внутренняя мембрана митохондрии неоднородна. Одни белки чаще локализованы в кристах, другие чаще расположены в местах контактов внутренней и наружной мембран.

Сравнение содержания некоторых белков в наружной/внутренней мембране (черный) и в мембране крист (серый):

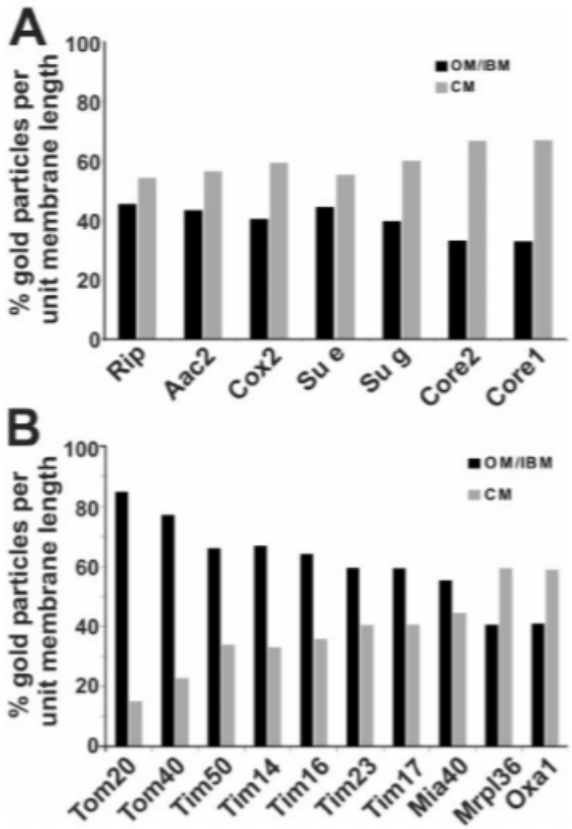


Рис. 9 Сравнение содержания некоторых белков в наружной/внутренней мембране

Наиболее выраженным примером структурированности внутренней мембраны является расположение АТФ-синтазы. Две единицы АТФ-синтазы, расположенные под углом, характерным для каждого вида, и образуют димер, меняющий кривизну мембраны в месте своего расположения. Так, например, в опытах с протеолипосомами АТФ-синтазы олигомеризуются и образуют «ряды» определенной формы и кривизны. При этом если убрать сайты олигомеризации АТФаз, то получаются неструктурированные липосомы неопределенной формы.

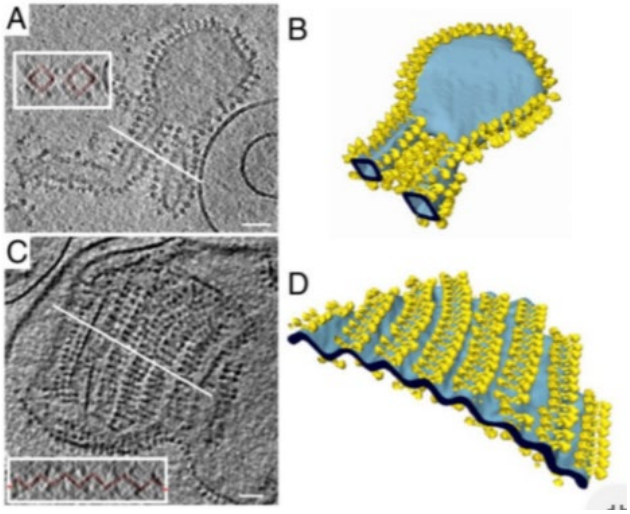


Рис. 10 Формирование складчатости АТФ-синтазами

В формировании крист принимают участие и другие белки: комплекс MICOS (формирует контакты внешней и внутренней мембраны), s- и l-формы OPA1 (формируют стабильное сближение мембран в основании крист), белки дыхательной цепи, MIC25, MIC10 и т.д.

Модели формирования крист.

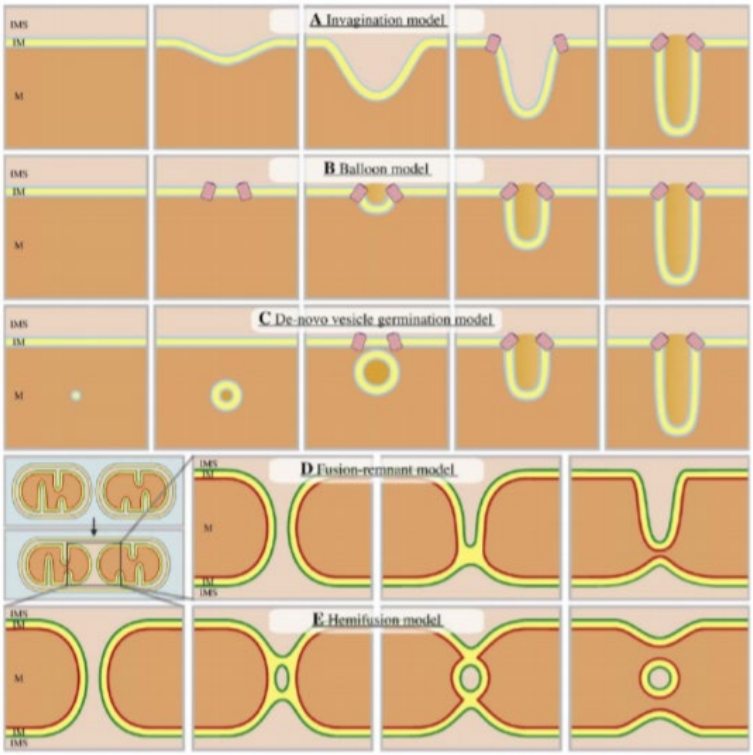


Рис. 11 Модели формирования крист

Существуют различные модели образования крист в клетке (рис11). Одни модели предполагают образование комплекса OPA1 после выпячивания мембраны, другие - образования складки уже после появления комплекса. Есть довольно экзотические модели, предполагающие образование везикул и их присоединение к внутренней мембране. Еще одна модель описывает формирование крист при слиянии митохондрий.

Функции митохондриальной динамики.

1. Пролиферация митохондрий (координация с клеточным циклом). Изменение структуры митохондриального ретикулума происходит по мере смены фаз клеточного цикла.

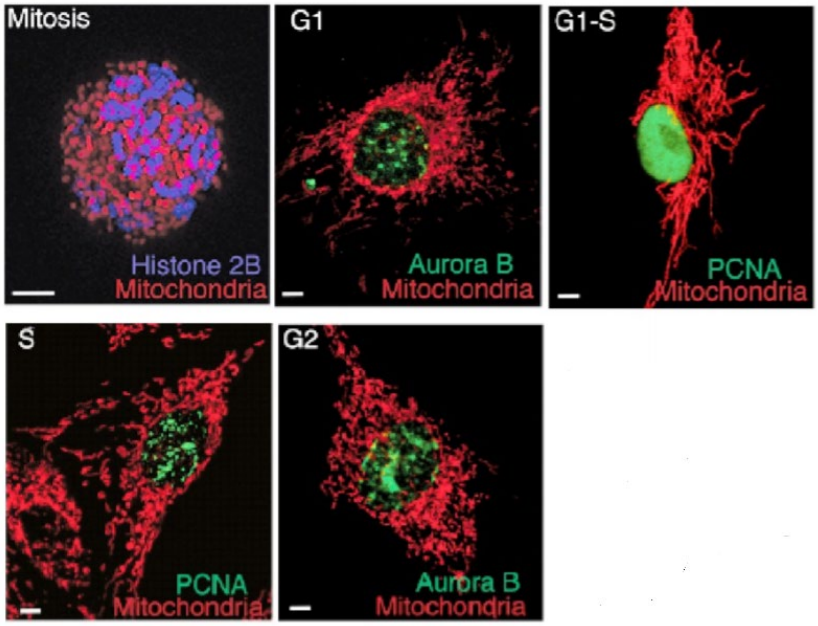


Рис.12 Динамика митохондриальной сети на протяжении клеточного цикла

Вместе со структурой митохондриального ретикулума меняется и его функциональное состояние. Эти изменения коррелируют с изменениями трансмембранного потенциала; наибольший потенциал наблюдается в поздней G1 фазе.

В настоящее время остается открытым вопрос, существуют ли митохондриальные «сверочные точки» (check point) и механизмы, которые останавливали бы клеточный цикл, пока митохондрии не будут готовы двигаться дальше.

2. Комплементация. Эффективность работы митохондрий после слияния выше, чем до.

3. Слияние митохондрий позволяет перетасовать мтДНК так, чтобы в каждой органелле был полный набор функциональных генов дыхательной цепи. Это помогает восстановить функциональность митохондрий с нарушениями в днк.

4. Метаболитическая функция: слияние неэнергизованной митохондрии с нормально энергизованной помогает быстро восстановить трансмембранный потенциал.

5. Предполагается, что в некоторых клетках возможно пространственное разделение работы АТФаз и дыхательной цепи по митохондриальной сети – т.е. транспорт энергии по клетке.

6. Стрессорные условия вызывают фрагментацию митохондрий. Механизмы слияния необходимы для восстановления обычной структуры после прекращения стресса.

Однако достоверно неизвестно, почему митохондрии дробятся при стрессе. Это может как эпифеноменом (следствие того, что при стрессе снижается трансмембранный потенциал, и частота их деления превышает частоту их слияния), так и защитным механизмом, способом предотвратить повреждение митохондриальной сети как единого целого.
Также у животных массовое деление митохондрий является одним из этапов активации программируемой клеточной смерти (апоптоза). Считается, что дробление митохондрий способствует выходу в цитоплазму проапоптотических факторов.

Лекция 4

Транспорт митохондрий

Транспорт митохондрий может осуществляться с помощью актинового и тубулинового цитоскелета. В основном движение митохондрий изучают в нейронах – антероградный и ретроградный транспорт митохондрий в аксоне. В основном митохондрии двигаются по тубулиновому цитоскелету – микротрубочкам – и существуют молекулярные моторы, которые двигают их в одну или другую сторону. По некоторым оценкам в аксоне одновременно двигается около 10% митохондрий, и это позволяет практически равномерно распределить эти органеллы по аксону и немного сконцентрировать их в зоне синапса.

Скорость движения достигает 2 мкм/сек. Однако, надо понимать, что, наблюдая за движением митохондрий, мы увидим некоторое распределение скоростей. В целом скорость движения составляет около 0,2-0,5 мкм/сек.

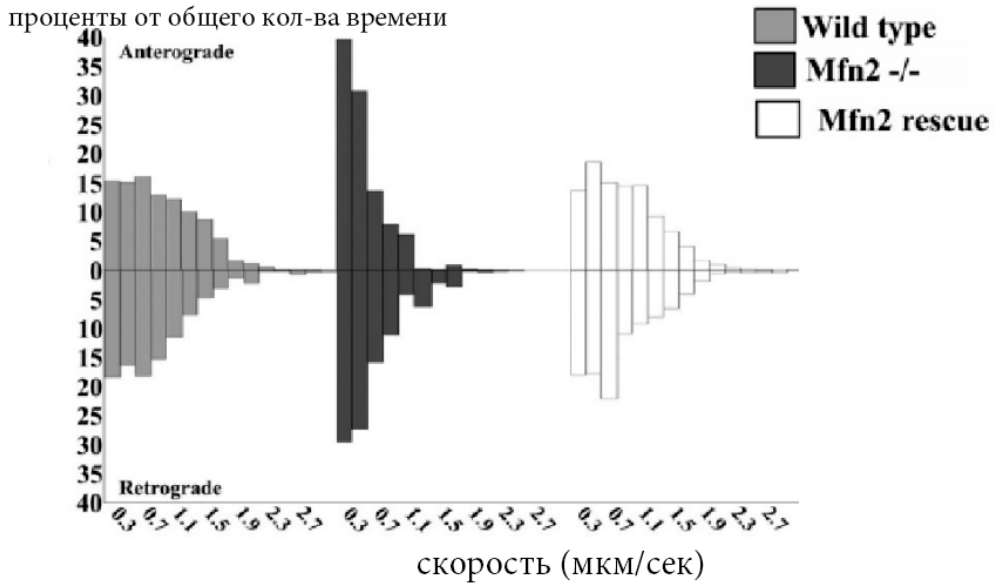


Рис. 1. Сравнение средних скоростей движения митохондрий дикого типа и мутантных

Также проиллюстрирована скорость движения мутантных митохондрий: 1) с отсутствием метафузина (белка, отвечающего за слияние внешних мембран) – скорости движения уменьшаются 2) с восстановленным метафузином – скорость движения вернулась к значениям, характерным для дикого типа. Вероятно, при нарушении функции слияния митохондрий уменьшается количеству доступных сайтов связывания с микротрубочками, следовательно, уменьшается количество двигающихся митохондрий и скорости их движения.

Для антероградного транспорта митохондрий вдоль микротрубочек необходимы:

1) **кинезины**. В клетке существует порядка сотни разных изоформ белка, принцип их работы похож, но для митохондрии существует специальная система адаптеров для

взаимодействия органеллы и кинезина:
2) белок **Miro**, заякоренный в наружной митохондрии, который взаимодействует с кинезином через белок milton, является GTPазой
3) **milton**(= TRAK), эти белки также существуют в нескольких изоформах.

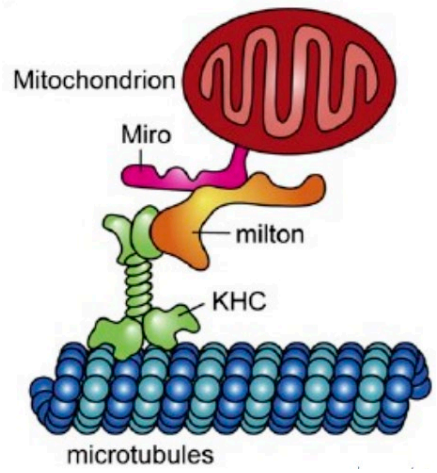


Рис. 2. Схема белкового комплекса, отвечающего за антероградный транспорт митохондрий вдоль микротрубочек

При исследовании движения митохондрий важно понимать, какое движение наблюдается – процессивное или броуновское. При процессивном движении в течении нескольких периодов движение совершается в одном направлении (с допущением определенного угла отклонения) и связано с активным транспортом.

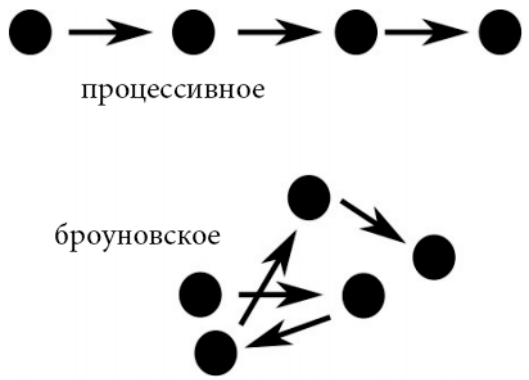


Рис. 3. Схема процессивного и броуновского движения

Зачем нужно движение митохондрий в клетках?

Антероградный транспорт в аксоны двигает митохондрии в сторону синапсов, а когда накапливаются повреждения ферментативных белков и др. – транспортирует обратно к соме.

Также, например, если выключить оба гомолога Miro, то при делении материнской клетки происходит неравномерное распределении митохондрий по дочерним клеткам, а также происходит нарушение распределения митохондрий по объему клетки.

Проблема исследований распределения органелл в клетке – неоднородность клеточных форм. Решить эту проблему можно, например, помещая клетки на микроскопические подложки, добиваясь таким образом стандартизации форм и размеров.

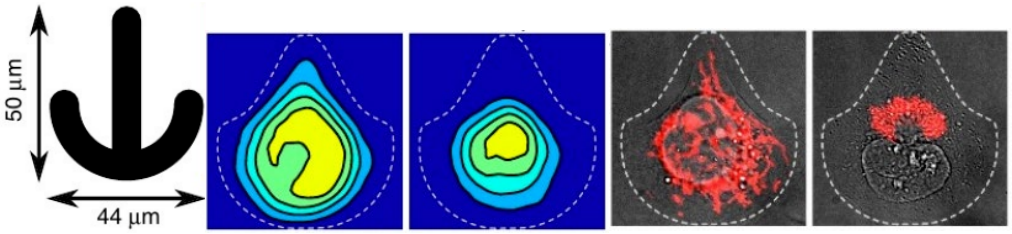


Рис. 4 Выращивание клетки на подложке

Метод иллюстрации движения клетки во времени: были сняты черно-белые кадры с конфокального микроскопа, затем раскрашены градиентно. Каждый оттенок цвета представляет собой положение клетки в определенный момент времени.

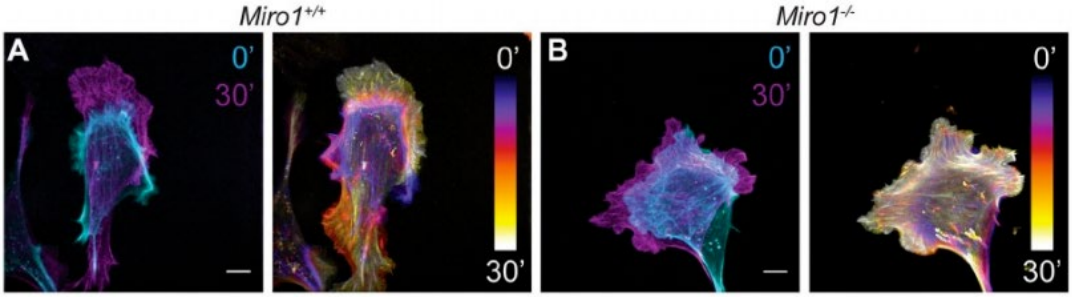


Рис. 5 *Miro1$^{+/+}$ - нормальный фибробласт мыши. Miro1$^{-/-}$ - фибробласт с нокаутированными генами Miro1, показывает пониженную подвижность*

При неравномерности распределения митохондрий в клетке возникают области дефицита АТФ.
Таким образом, нарушения в системе подвижности митохондрий приводят к нарушениям динамики актина. Это мешает миграции фибробластов: исследования показывают, что такие фибробласты гораздо медленнее осуществляют закрытие ран.

Важной особенностью белка Miro являются два сайта связывания кальция. При появлении ионов кальция, он меняет конформацию, появляется сайт, меняющий способ связывания комплекса с кинезином, и в конечном счете это приводит к диссоциации комплекса с микротрубочки. В итоге происходит накопление митохондрий в областях с повышенным содержанием кальция.

Почему Ca^{2+}?
- концентрация кальция в цитоплазме может значительно меняться
- митохондрии являются резервуаром кальция в клетке
- кальций способен быстро входит в митохондрии через кальциевый унипортер

Есть еще одна важная система, влияющая на транспорт митохондрий.
Связывание с белком синтафилином (митохондриальный GFP) иммобилизует митохондрии на микротрубочках, помогая достичь равномерного распределения митохондрий по клетке.

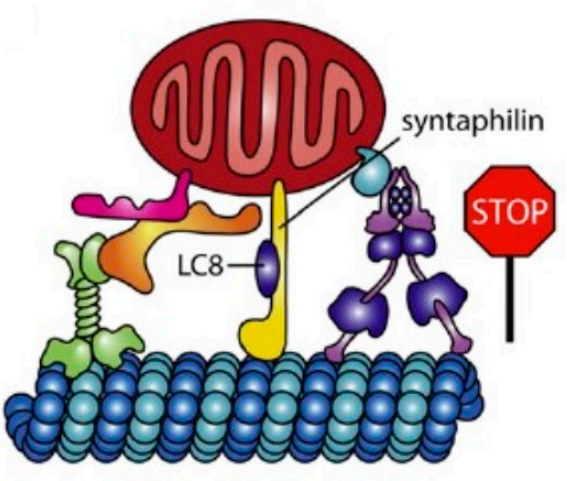


Рис. 6 Комплекс связывания митохондрии с микротрубочкой

Метод визуализации движения митохондрий – **кимограмм**а – объединение отдельных кадров движения в один.

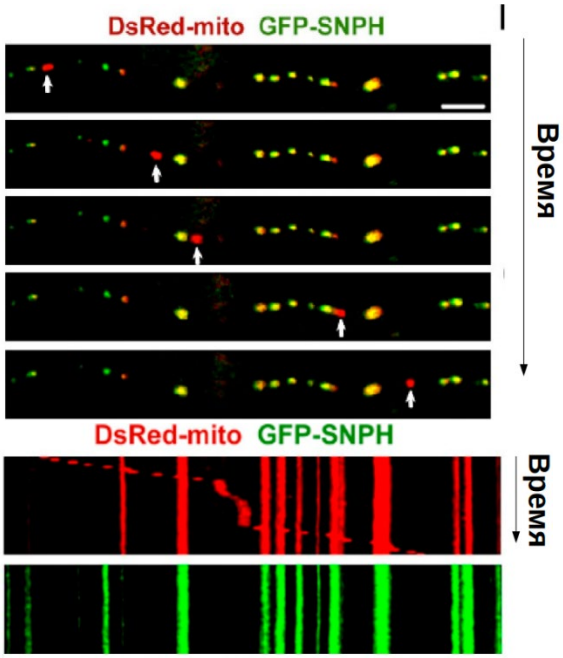


Рис. 7 Кимограмма

Движение с помощью актинового цитоскелета позволяет передвигать митохондрии на небольшие расстояния.

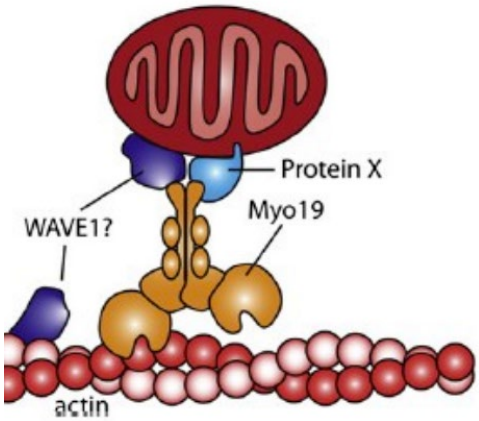


Рис.8 Комплекс связи митохондрии с актиновым цитоскелетом

Существуют явления неравномерного распределения митохондрий по клеткам. Рассмотрим их на примере дрожжей. При делении клетки может происходить сегрегация митохондрий по их функциональному состоянию, так что «плохие» митохондрии попадут в одну из двух новых клеток, которая затем погибнет. Другой пример связан с образованием вытянутых длинных клеток – псевдогиф, которые необходимы для заякоривания на некоторых субстратах. И в кончиках таких псевдогиф скапливаются митохондрии с высоким трансмембранным потенциалом (высокоэнергизованные мембраны).

Итого:

- митохондрии двигаются с помощью молекулярных моторов кинезина и динеина вдоль микротрубочек
- скорость процессивного движения составляет 0,5-2 мкм/сек
- митохондрии присоединяются к моторам через белки-адаптеры (для антероградного транспорта адаптеры – белки Miro и milton
- движение, опосредованное актиновым цитоскелетом, необходимо для перемещения на небольшие расстояния

Открытые вопросы исследований:

- как происходит выбор митохондрии, которая будет транспортироваться?
- чем функционально отличаются митохондрии, двигающиеся к синапсу, от митохондрий, двигающихся обратно?
- как организован транспорт митохондрий в других типах клеток?

Контроль качества митохондрий. Протеостаз митохондрий.

В процессе жизни белки подвергаются различным неферментативным модификациям. Чаще всего рассматривают окислительные повреждения аминокислот, приводящие к образованию сульфоновых кислот, кетонных и альдегидных групп (рис 9, А). Нарушения аминокислот могут повлиять на работу и активность целого белка, изменяя его структуру. Большая часть повреждающих модификаций необратима и требует полного разрушения белка. Однако существует группа обратимых повреждений: так, например, есть ферментативная система, восстанавливающая метионин сульфоксид до метионина (рис. 9, В). В том числе, благодаря обратимости эта реакция может использоваться клеткой как сигнальная модификация белка.

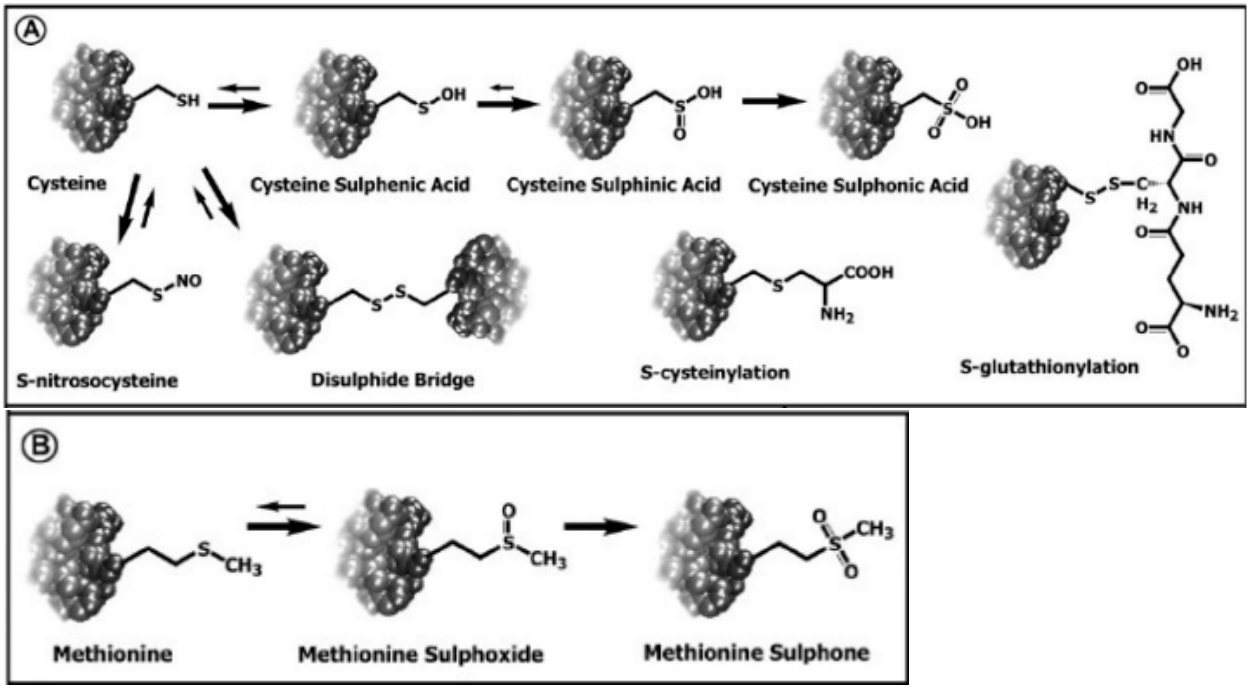


Рис 9. Неферментативные модификации аминокислот

Что же происходит с необратимо поврежденными белками? В цитоплазме для этого существует протеосомальная система, отсутствующая в митохондрии. Роль этой системы в митохондрии играют наборы различных митохондриальных протеаз. Один из главных – ATPases Associated with diverse cellular Activities. Это трансмембранные белки, работающие в виде гексамера; различают две формы – i-AAA и m-AAA, различающиеся про тому, в какую стороны от внутренней мембраны они ориентированы (рис 10). Они разрушают мембранные белки.

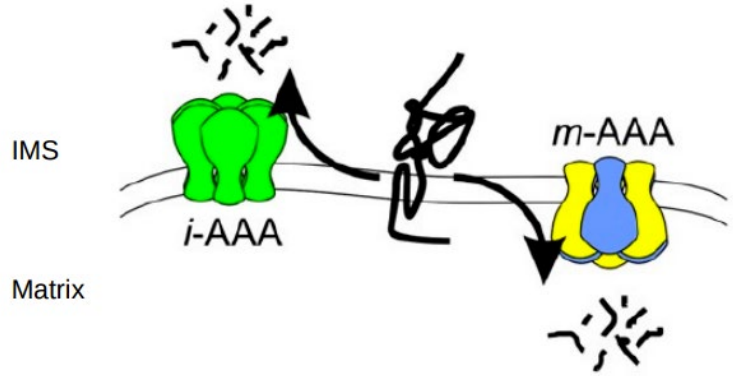


Рис. 10. Митохондриальные трансмембранные протеазы

Матриксная протеаза Lon разрушает растворимые белки матрикса (рис 11)

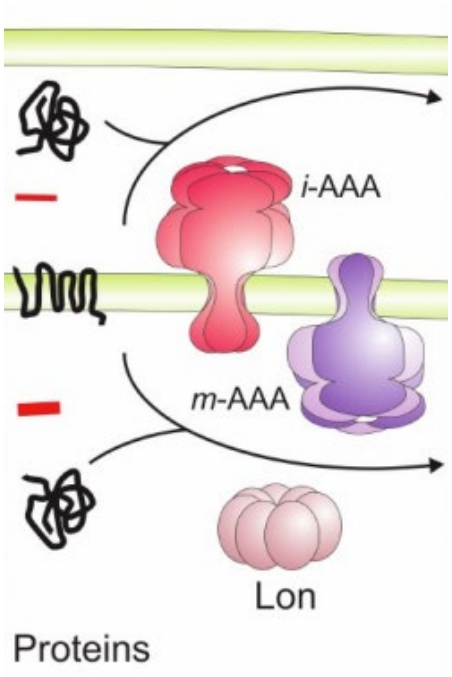


Рис. 11. Матриксная протеаза Lon

От белков, разрушенных упомянутыми выше протеазами, остаются короткие пептиды, которые выбрасываются сначала в межмембранное пространство специальным переносчиком (до сих пор достоверно не изучен), а затем в цитоплазму.

Еще один аспект работы протеаз в митохондрии – это модификация белков и регуляция митохондриальной динамики. Так, в норме белок OPA1 (отвечающий за слияние внутренних мембран митохондрий) синтезируется в цитоплазме, импортируется во внутреннюю мембрану, а затем процессируется с помощью нескольких протеаз (i-AAA, m-AAA, MPP) в короткую растворимую форму, находящуюся в межмембранном пространстве, и в заякоренную форму l-OPA1 (обе формы необходимы для процесса слияния мембран). Протеаза OMA1 в норме постоянно деградирует в матриксе, но при

падении потенциала перестает транспортироваться в матрикс, остается на поверхности внутренней мембраны и режет l-OPA1 до s-OPA1* → слияние мембран становится невозможным. (рис 12)

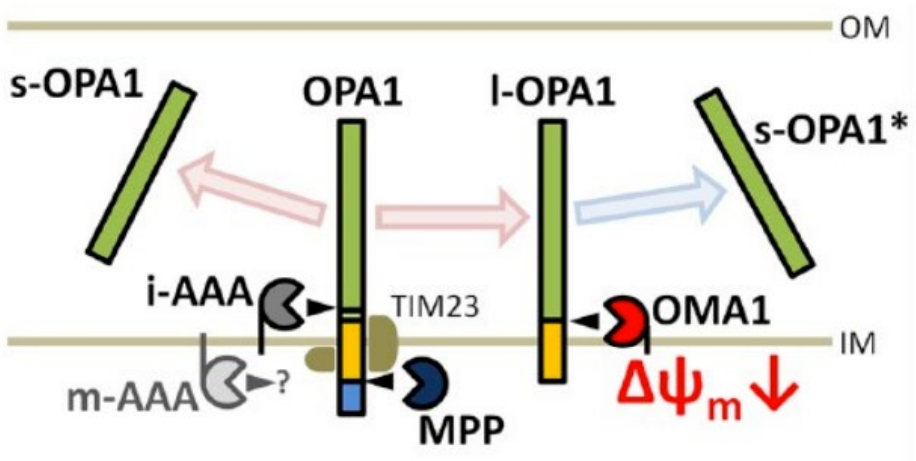


Рис. 12 Протеаза OMA1 и белок OPA1

В настоящее время существуют предположение, что, в связи с очень высокой активностью системы митохондриальных протеаз, они могут принимать участие в поддержании протеостаза белков не только самой митохондрии, но также и цитоплазматических.

Митофагия и контроль качества митохондрий.

- аутофагия, в результате которой специфически уничтожаются митохондрии, но не другое содержимое клетки, называется митофагией.

- деление митохондрий необходимо при митофагии. Если в части митохондриального ретикулума произошла накопление неправильно свернутых белков или другие нарушение, не подлежащие репарации, то эта часть ретикулума будет отделена и разрушена.

Предполагается, что митофагия необходима для контроля качества митохондрий. Как это происходит? После деления митохондрий один из образовавшихся фрагментов деполяризуется. Далее есть два пути: либо эта новообразованная митохондрия сама увеличит свой трансмембранный потенциал и снова сольется с ретикулумом, либо она не сможет активировать дыхательную цепь, и тогда будет направлена на митофагию.

Как происходит детекция поляризованности мембраны в митохондрии? Во внутренней и наружной мембране есть два важных комплекса – TOM и TIM, являющиеся системами импорта этих мембран. PINK1 – киназа, в норме импортируется в митохондрию через TOM и PIM и разрушается протеазами. Если митохондрия деполяризована, то транспорт через TOM и TIM замедляется, и PINK1 остается на наружной мембране. С ним связывается другой белок – Parkin, являющийся убиквитин лигазой (к изучению всей этой системы прилагается много усилий, т.к. мутации в гене

белка Parkin часто ассоциированы с повышенным риском болезни Паркинсона) (рис 13).

Связавшись, Parkin убиквитинирует как PINK1, так и другие белки на поверхности митохондрии. С убиквитинированным белками связываются определенные адаптерные белки, в конечном счете привлекающие аутофагосому (рис 14).

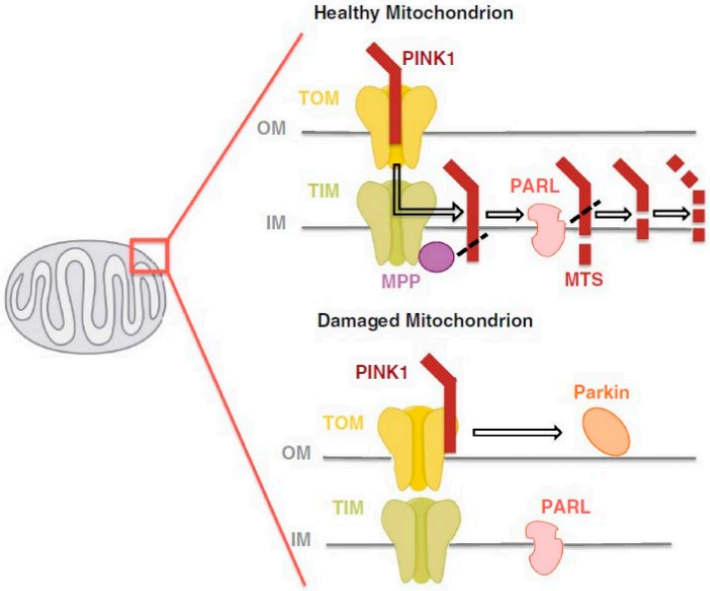


Рис. 13 Система детекции поляризованности мембраны в митохондрии

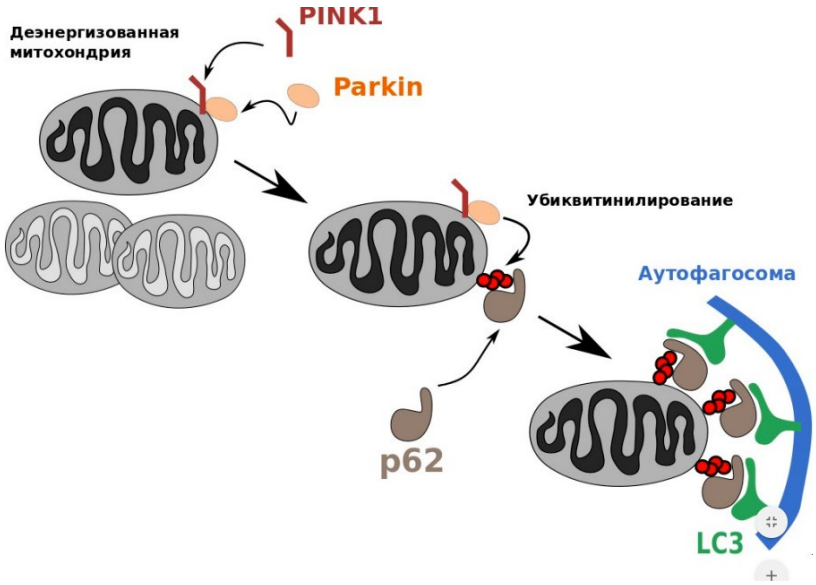


Рис 14. Схема работы PINK1/Parkin системы

Также было показано, что одной из мишеней PINK1 является адаптерный белок транспортной системы митохондрий – Miro – и в результате комплекс с кинезином разрушается, и движение митохондрии останавливается. Еще одна из мишеней – белок наружной мембраны, необходимый для слияния – митофузин.

Существуют системы митофагии, не связанные с PINK1/Parkin.
1) FUNDC1-зависимая митофагия активируется в ответ на гипоксию для сокращения митохондриальной биомассы.
2) Nix-зависимая митофагия нужна для созревания эритроцитов.
3) еще одна система селективной митофагии ответственна за уничтожение отцовских митохондрий в зиготе
4) у дрожжей процесс селективной митофагии, обусловленный совершенно другими белками, запускается в ответ на голодание в стационарной фазе роста – чтобы получать азот для синтеза, когда заканчиваются внешние источники.

Какие еще существуют способы избавления от митохондрий в клетке кроме «разбирания по кусочкам» и аутофагии? Есть работы, показывающие, что в случае накопления большого количества агрегатов, клетки способны выбрасывать наружу части цитоплазмы, обогащенные митохондриями.

Итого:

- в митохондриях отсутствует протеосомальная деградация белков, но работает большое количество протеаз
- клетка способна к селективному уничтожению деполяризованных митохондрий. Детекция таких митохондрий осуществляется за счет ингибирования импорта киназы PINK
- при дифференцировке некоторых типов клеток и адаптации к гипоксии происходит деградация митохондрий с помощью других (отличных от PINK/Parkin) систем митофагии

Лекция 5

Закономерности наследования митохондриальной ДНК

Гетероплазмия

Гетероплазмия – это наличие сразу нескольких молекул мтДНК в одной клетке. В клетке есть несколько молекул, и возможна ситуация, когда они будут различаться. Эти различия могут быть небольшими – изменения одного нуклеотида, однако может быть и значимая разница.
Гетероплазмия – это наличие сразу нескольких различных молекул мтДНК в одной клетке. Гетероплазмия широко распространена в популяции человека – примерно у 45% людей. Около 2,4% сайтов в мтДНК находятся в состоянии гетероплазмии. Стоит уточнить, что лишь в небольшом количестве работ удается производить секвенирование одной клетки, что создает трудности в исследовании гетероплазмии.

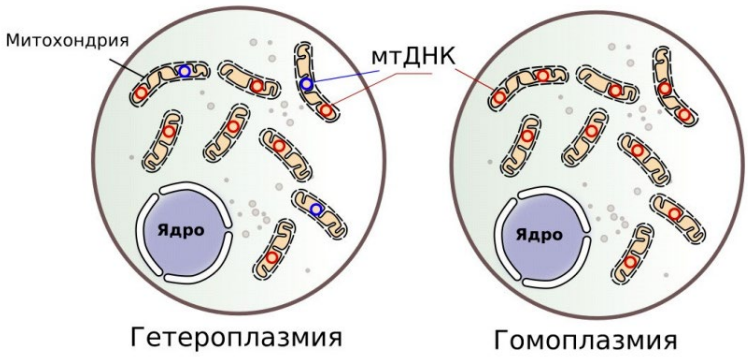


Рис. 1 Гетероплазмия и гомоплазмия митохондрий

Гетероплазмия приводит к трудностям в изучении наследования мтДНК. Допустим, если клетка несет митохондрии с нормальной ДНК (wild-type mtDNA) и с мутантной, к примеру, вызывающей какую то патологию (mutant mtDNA), то в определенный момент при делении клетки может произойти неравномерной распределения митохондрий у потомков, и тогда в череде поколений частота мутантной ДНК будет дрейфовать. Количество мутантной ДНК в зародышевом ряде и в яйцеклетке матери будет разным (рис2)

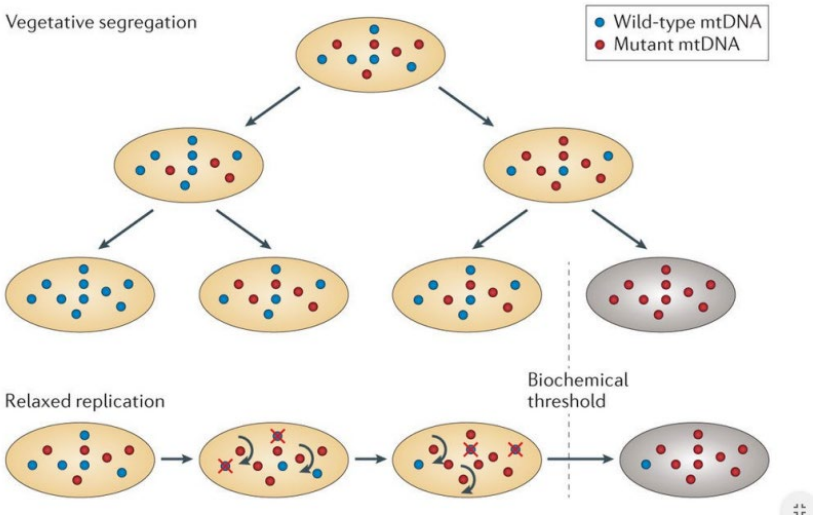


Рис. 2 Появление популяций клеток с мутантной мтДНК

Обычно клетка «нечувствительна» к наличию митохондрий с мутантной ДНК, пока их количество не достигнет определенного порога проявления патологии ~50-70%. Это связано с тем, что обычно митохондрии работают как единая сеть.
Многоклеточный организм развивается из одной клетки, и в процессе индивидуального развития происходит огромное количество делений. Если в яйцеклетке есть гетероплазмия даже с небольшим количеством мутантной мтДНК, в итоге в результате дрейфа порог проявления может быть достигнут в какой-то определенной ткани организма.

<u>Уровни проявления фенотипа мтДНК</u>. (рис.3)
1) органелла: мтДНК реплицируется в нескольких копиях внутри одной митохондрии, и эти копии могут конкурировать, например, в скорости репликации между собой и влиять на работу одной митохондрии
2) клетка
3) целый организм
4) популяция
Проявления на уровне митохондрии и на уровне целого организма могут быть различны по значимости и направленности (например: в клетке получает преимущество мутантная ДНК, т.к. быстрее реплицируется, однако она приводит к негативным последствиям на уровне организма)

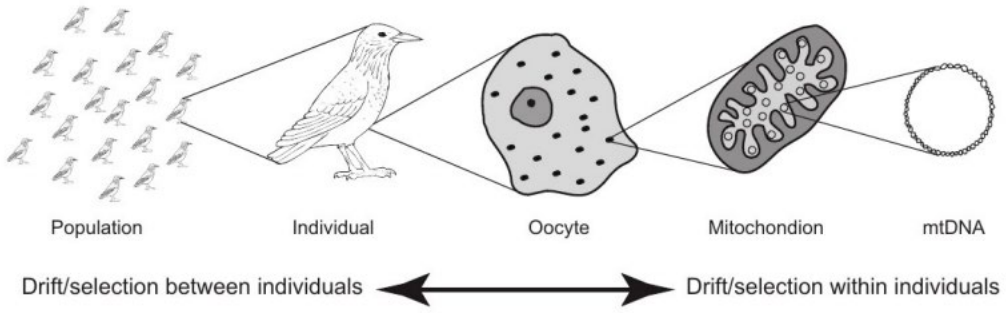


Рис. 3 Уровни проявления фенотипа мтДНК

Способы изучения гетероплазмии.

Один из вариантов – секвенировать родителей и ребенка. Существует хорошая модель на мышах, у которых введена мутация по митохондриальной ДНК-полимеразе (так что она часто делает ошибки при репликации, в клетке создается гетероплазмия). Такую мутантную мышь-гомозиготу скрещивают с нормальной. Мутация по ДНК полимеразе становится гетерозиготной и практически не проявляется. После нескольких поколений оказывается, что в большинстве случаев потомство менее разнообразное по количеству вариантом мтДНК (рис4).

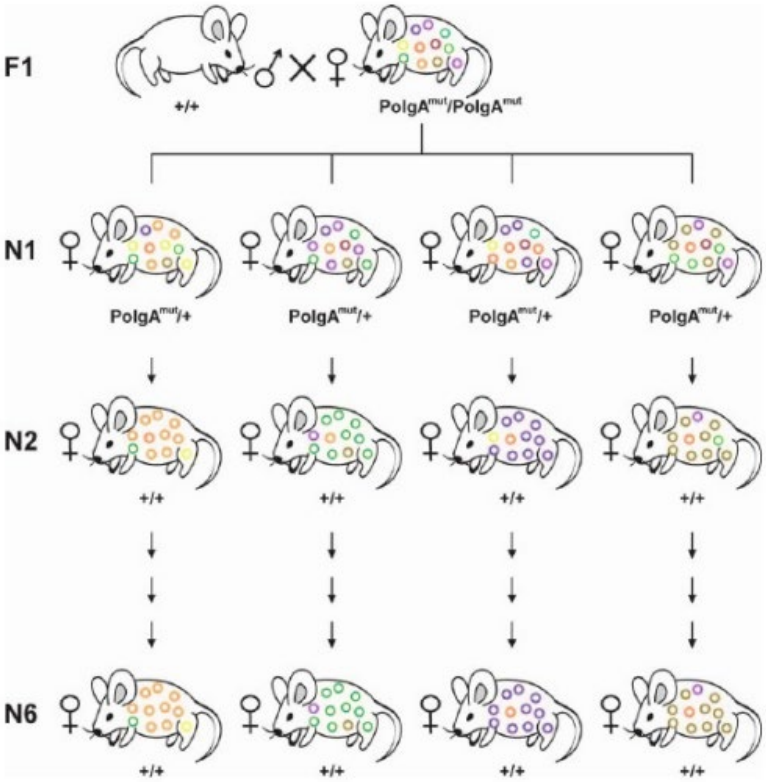


Рис. 4 Модель исследования гетероплазмии

Это связывают с тем, что в процессе созревания половых клеток мтДНК зародышевой линии проходит через **«бутылочное горлышко»**. Предполагается наличие двух бутылочных горлышек – в первичных зародышевых клетках и в раннем эмбриогенезе.

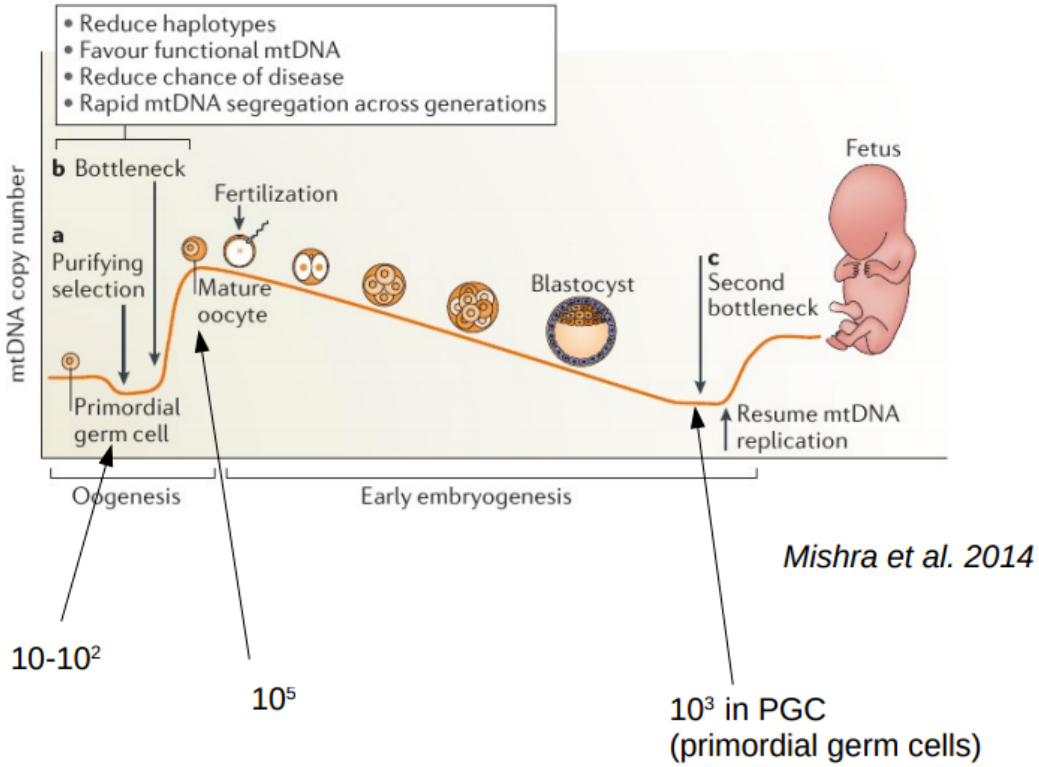


Рис. 5 Количество мтДНК на разных стадиях развития эмбриона

(рис. 5). На графике по оси У показано количество копий мтДНК, по оси Х – развитие яйцеклетки и эмбриона во времени. Видно, что при созревании яйцеклетки проходят очень узкое бутылочное горлышко – с точки зрения генетики остается 10-15 копий мтДНК (у человека) и это сильно снижает разнообразие митохондриальной ДНК у потомства. Второе узкое горлышко – в эмбриогенезе, причем оно специфично для различных тканей. Последние исследования показывают, что, например, для клеток крови его нет, а клетки при формировании волосяного фолликула через него проходят. В этой же работе с мышами было показано, что чем старше мать, тем больше вероятность передать потомству гетероплазмию.

Как именно осуществляется «бутылочное горлышко» на данный момент достоверно неизвестно.

Зачем нужно это явление? Возможно, таким образом происходит перевод селекции мтДНК из уровня «в клетке» на межклеточный уровень, т.к. в одной клетке сложно проводить отбор «правильных» копий ДНК. Если в каждой клетке будет гомоплазмия, то можно вести отбор «правильных» клеток (фактически, способ защиты от распространения мутантных «вредных» мтДНК).

Но как происходит отбор разделение митохондрий, если, как мы знаем, в клетке большую часть времени митохондрии образуют ретикулум и работают как единое

целое? Дело в том, что именно в клетках зародышевой линии подавлена активность гена метафузина. Тогда, при недостатке метафузина, митохондриальная сеть находится в раздробленном состоянии (при индуцированной сверхэкспрессии метафузина возможность отбора митохондрий в клетках зародышевой линии исчезает).

Еще один аспект механизма наследования митохондриальной ДНК – наследование мтДНК не всегда бывает строго монородительским. Известны уже несколько случаев присутствия отцовской мтДНК у потомков, в т.ч. млекопитающих, в также у других хордовых (мыши, аскарида) – такое наследование приводит к появлению гетероплазмии. В этом случае возможна рекомбинация отцовской и материнской мтДНК. В итоге получается, что, в каком-то смысле, характер наследование мтДНК – это не качественный, а количественный признак, который характеризуется частотой смешения отцовской и материнской мтДНК и тем, насколько эффективно отцовская ДНК убирается из зародышевой линии после слияния гамет. Более того, существуют организму со строго отцовским наследованием мтДНК (показано для некоторых растений и грибов).

Характер наследования, если посмотреть на филогенетическое древо (рис 6), довольно часто менялся. Нет какой-то строгой закономерности, привязывающей характер наследования мтДНК к одной филогенетической группе.

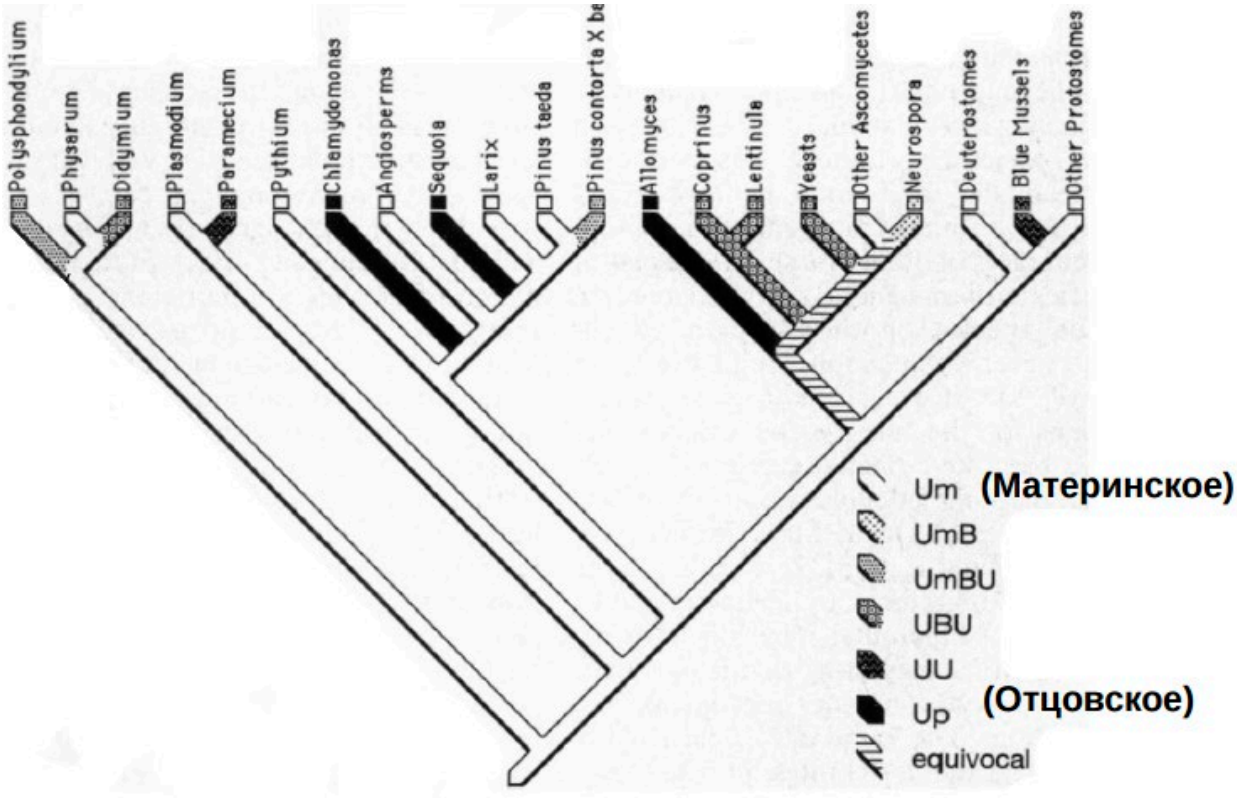


Рис. 6 Эволюционное древо с указанием вида наследования мтДНК

Видно, что материнское наследование мтДНК с очень низкой частотой попадания отцовской мтДНК превалирует у большинства организмов.

Двойное моно-родительское наследование мтДНК – в материнской линии наследуется материнская мтДНК, по отцовской линии – отцовская. Такой тип наследования представлен у мидий (рис 7). Если после слияния гамет развивается женская особь, то будет задействована женская мтДНК, если мужская особь – то, соответственно, мужская. Хотя на самом деле все еще немного сложнее: если развивается женская особь, то мужские митохондрии «разбавляются» и не детектируются, потом яйцеклетки формируются в основном с женскими митохондриями. При закладывании сперматозоидов, до сих пор достоверно неизвестно каким именно образом, отцовская мтДНК собирается в определенных участках, где будут появляться сперматозоиды. Получается, что в целом в клетках особи гетероплазмия, а в сперматозоидах – гомоплазмия. Также интересно, что мтДНК мужского и женского типа у *Mytilus edulis* дивергировали больше, чем мтДНК у разных видов.

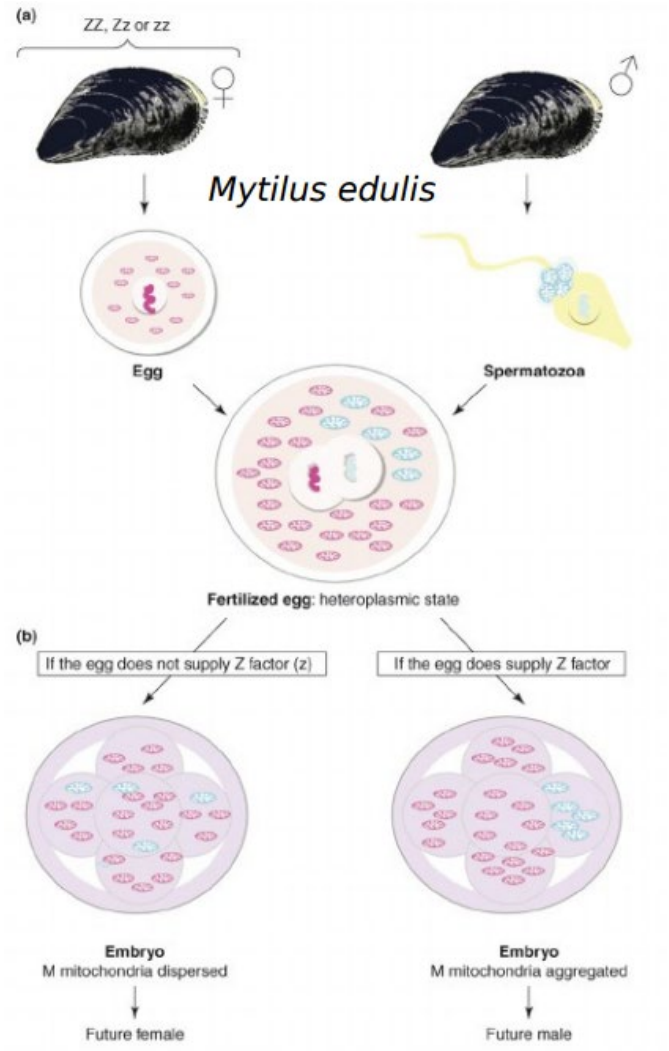


Рис. 7 Наследование мтДНК у *Mytilus eduli*

Почему однородительское наследование так широко распространено? Возможно, это следствие анизогамии (при изогамии гаметы разного качества, женские гаметы крупнее и содержат больше мтДНК). Однако это не объясняет того строгого контроля наследования чисто по материнской линии. Более того, существуют примеры (рис. 8, Ectocarpus siliculosus) изогамных организмов, у которых также митохондрии наследуются только от одной из гамет.

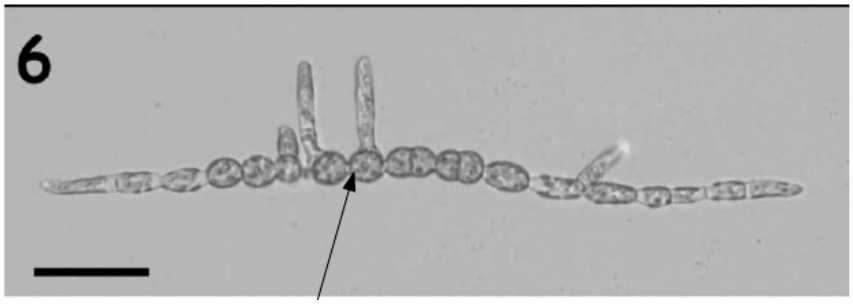
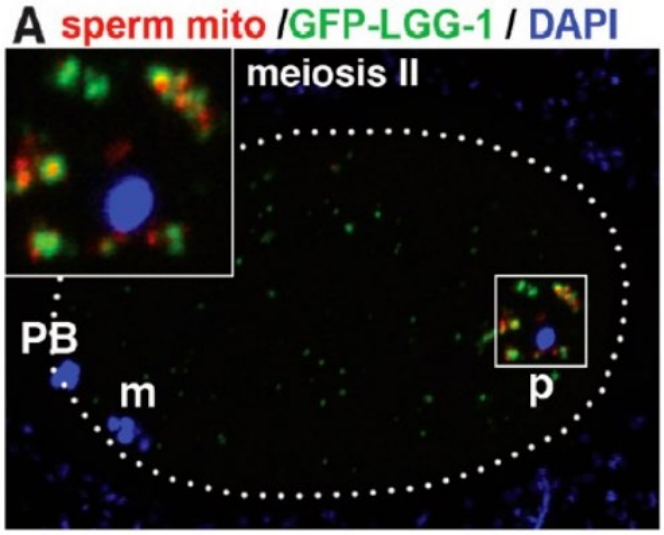


Рис. 8 Ectocarpus siliculosus

Изучены **механизмы**, уничтожающие отцовскую мтДНК, и они могут быть очень разными. Рассмотрим на примере Caenorhabditis elegans.

На картинке (рис. 9) представлена оплодотворенная яйцеклетка. Красным помечены митохондрии сперматозоида. Зеленым помечен белок, участвующий в аутофагии. Видно, что митохондрии, полученные от сперматозоида, съедаются аутофагосомой. Также, при мутации этого белка нарушается строго материнское наследование мтДНК.



Sato et al. 2011 Science

Рис. 9 Оплодотворенная яйцеклетка Caenorhabditis elegans

Механизмы контроля материнского наследования митохондрий могут быть очень разными. Где-то отцовские митохондрии погибают еще в сперматозоиде, где-то при оплодотворении в яйцеклетке. У плодовой мушки часть мтДНК удаляется в процессе сперматогенеза, в процессе участвует митохондриальная нуклеаза EndoG.

До сих пор не совсем понятно, куда девается отцовская мтДНК у человека и мыши. Существует ряд работ, в которых показывается, что у мышей в процессе также задействована аутофагия. Также существует предположение, что отцовские митохондрии неравномерно распределяются по клеткам в ходе дробления и тем самым сильно «разбавляются».

Эгоистичная мтДНК

Почему так много разных способов поддерживать монородительское наследование мтДНК? На самом деле, никто достоверно не знает. Известно, что поддержание монородительского наследования, осуществляемое разными способами у разных видов – это активным процесс, поддерживаемый в ходе эволюции, но неизвестно, зачем на самом деле это нужно. Одна из теорий основывается на специализации яйцеклеток и сперматозоидов. Предполагается, что в яйцеклетках поддерживается специальная **фракция «покоящихся» митохондрий**, в то время как в сперматозоидах митохондрии активны, что сопряжено, в том числе, с выделением активных форм кислорода, вредных для клеток. Также при созревании сперматозоида происходит больше клеточных делений, что связано с большей репликативной активностью мтДНК, и, соответственно, большим количеством мутаций. **«эгоистичная мтДНК»**. Эгоистичный ген – это ген, который не приносит пользу всему организму или даже причиняет вред, но при этом имеет некое преимущество при репликации. мтДНК может быть «эгоистичным геном». Иногда при репликации мтДНК возникает мутация – теряется часть информации, но такой вариант ДНК копировать намного быстрее. При этом селекция на уровне клеток препятствует накоплению эгоистичных вариантов мтДНК в соматических клетках. В итоге появляется стабильная гетероплазмия, с одной стороны поддерживаемая быстрым распространением мутировавшей мтДНК, с другой стороны сдерживаемая клеточной селекцией. Такая система довольно распространена у грибов. Но чем старше становится мицелий гриба, тем больше в клетках появляется митохондриальных плазмид, выщепляющихся из мтДНК – происходит старение (рис. 11). Такой же процесс накопления коротких мтДНК происходит, например, в нейронах человека (с возрастом увеличивается количество мтДНК с делециями, хотя при этом могут быть задействованы и другие механизмы).

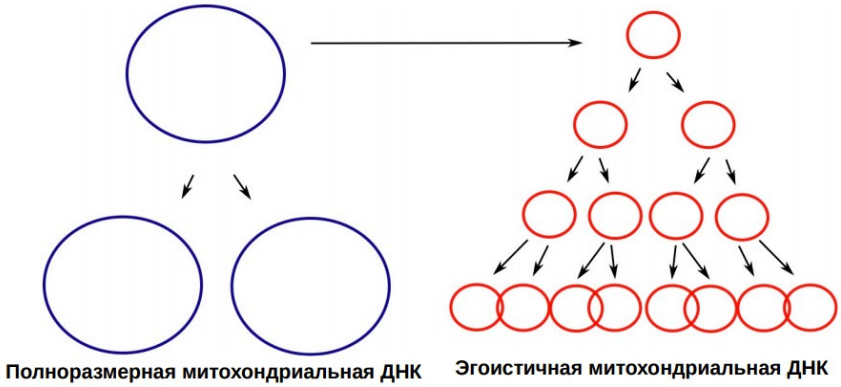


Рис. 10 Сравнение репликации нормальной и мутантной мтДНК

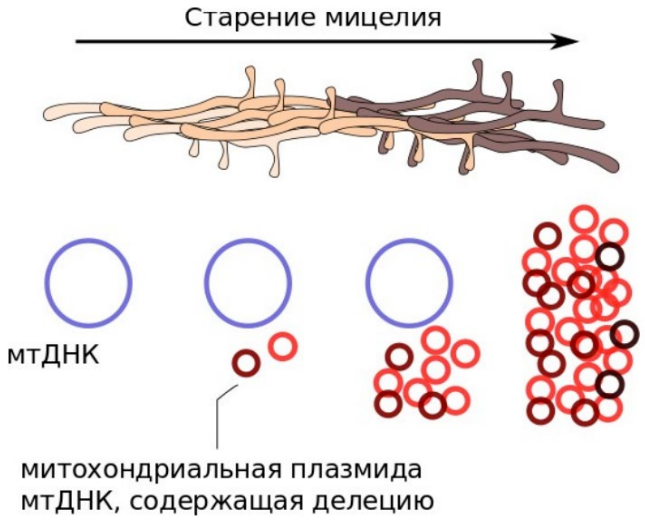


Рис. 11 Накопление эгоистичной мтДНК по мере старения мицелия

Эгоистичная мтДНК может передаваться через поколения. В природных популяциях C. briggsae мутантная мтДНК с делецией по гену nad5 содержится на довольно высоком уровне ~90%.

Теперь можно рассмотреть вторую гипотезу: материнское наследование мтДНК возникло как **механизм защиты от повторяющихся инвазий** эгоистичных мтДНК в популяции.

Тогда как выходят из ситуации виды, наследующие мтДНК от обоих родителей? В клетках дрожжей, например, есть механизмы, препятствующие экспрессии эгоистичного вариант мтДНК – искусственно вызванная митофагия (FCCP). Таким образом, клетки дрожжей имеют закодированный в ядре механизм искусственной селекции мтДНк. Этот механизм работает только в зиготах, а в вегетативно размножающихся клетках выключен. Еще одна работа –на этот раз на C. Elegans – показывает, что делеция паркина (pdr1) у нематод приводит к накоплению «нефункциональных» мтДНК, т.е. клетки хуже справляются с патогенными вариантами отцовских митохондрий.

Итого:

1. В природе распространено однородительское наследование мтДНК.
2. Механизмы реализации такого варианта наследование сильно различаются у разных видов и являются активными.
3. Предполагается, что такой механизм наследования возник как способ защиты от распространения эгоистичных вариантов мтДНК.
4. Искусственная активация процессов контроля качества митохондрий (селективной митофагии) в зиготе может препятствовать распространению эгоистичных вариантов мтДНК даже в условиях двуродительского наследования мтДНК.

Интрогрессия

Интрогрессия – это когда какой-то ген проникает в популяцию другого вида и сохраняется там. Как это происходит? Может произойти гибридизация двух видом на границах их ареалов. Скрестилась женская особь вида a с мужской особью вида b. Появились гибриды со смешанными ядерными геномами и митохондриями вида a. На протяжении многих поколений эти потомки скрещивались только с особями вида b, в итоге не смотря на почти полностью b геном, материнская линия сохраняет митохондрии a. Такая ситуация довольно часто встречается в природе и сильно мешает оценке границы видов.

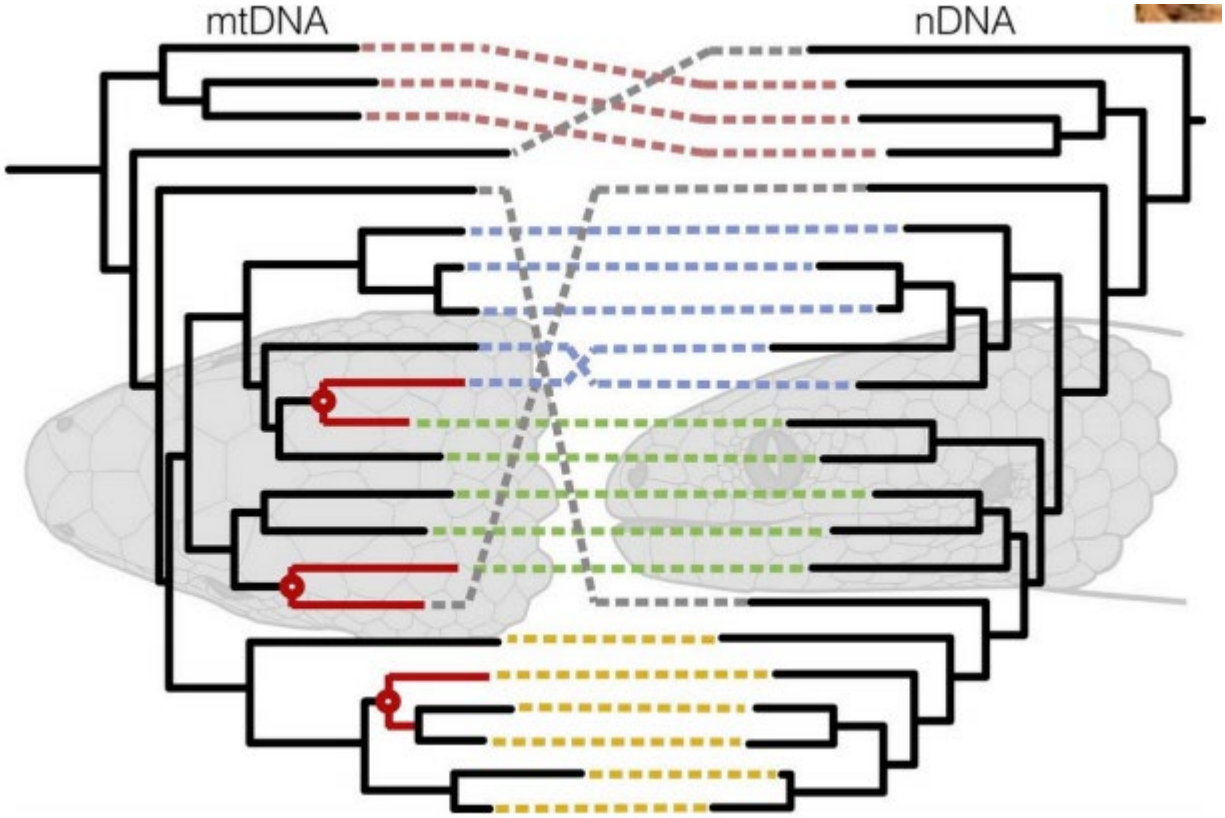


Рис. 12 Построены деревья по ядерной ДНК и по мтДНК. Пунктирной линией соединены одинаковые виды.

Призрачная интрогрессия – мтДНК не просто другого вида, а при этом еще и вымершего.

Трансмиссивные раки.

Описан ряд случаев передачи ракового заболевания от особи к особи. Один из самых известных – у тасманских дьяволов. Более распространенный случай – трансмиссивный венерический рак собак. Оказалось, что во многих случаях клетки рака захватывают митохондрии клеток хозяина, что компенсирует мутации в собственных изначальных митохондриях раковых клеток.

Лекция 6

Цитоплазматические гибриды

В митохондрии закодирована часть белков комплексов дыхательной цепи (кодовые субъединицы 3, 4 и 1 комплексов) и АТФ-синтазы. Эти субъединицы в большей степени взаимодействуют друг с другом и составляют ядро комплексов.
Как изучали **митохондриально-ядерные взаимодействия**? Здесь возможны два пути: изучать белок-белковые взаимодействия субъединиц, закодированных в митохондрии и ядре, или изучать генетические взаимодействия.
Для изучения используют **цитоплазматические гибриды**, которые помогают оценить вклад в приспособленность митохондриальных и ядерных геномов.
Берут две клетки дрожжей, в одной из которых нет мтДНК, при этом существуют специальные штаммы, у которых при слиянии клеток не происходит слияние , а происходит только перенос митохондрий в другую клетку. Если таким образом гибридизировать, допустим, 10 вариантов ядерного генома, 10 вариантов мтДНК, то получим 100 штаммов и посмотрим на их фенотипы. Такой эксперимент позволит выяснить, что играет большую роль – митохондриальный или ядерный геномы.

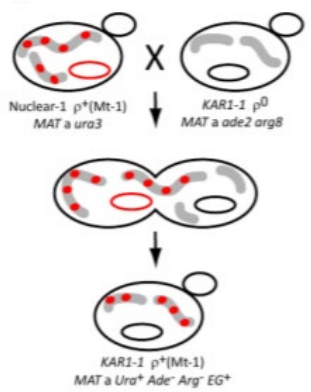


Рис. 1 Получение цитоплазматического гибрида

Так, например, можно посмотреть на зависимость скорости роста от температуры при различных фенотипах. Оказалось, что в присутствии некоторых вариантов ядерного генома разные митохондриальные геномы работают очень по-разному, а в некоторых практически ничего не зависит от мтДНК.

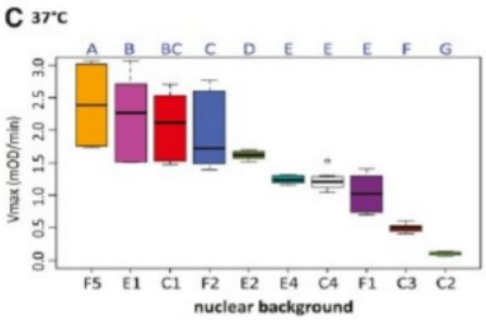


Рис. 2 Зависимость скорости роста от температуры при различных фенотипах

Исследование такой матрицы 10x10 вариантов позволила оценить для разных условий какой вклад в дисперсию фенотипа вносит ядерный геном (наибольший вклад, обозначен белым), какой вклад делает митохондриальный геном (обозначен желтым), а какой – именно комбинация ядерного и митохондриального генома (обозначено красным) (рис 3). Такие исследования показали, что больше смысла в исследовании не отдельно митохондриального генома, а его совокупности с ядерным.

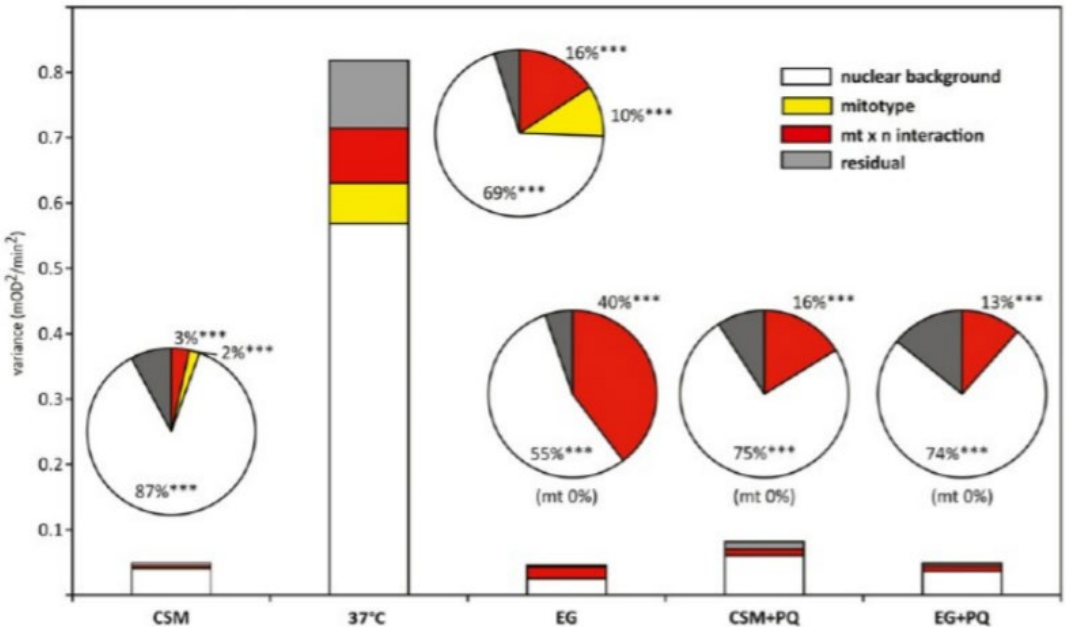


Рис. 3 Диаграмма вкладов ядерного, митохондриального генома и их взаимодействия.

Вспоминаем, что интрогрессия – это пенетрация мтДНК одного вида в другой вид за счет событий гибридизации при скрещивании. Получение цитоплазматических гибридов – искусственный вариант получения комбинация разных ядерных и митохондриальных ДНК. При этом такие гибриды могут быть жизнеспособны – как, например, искусственно полученные цитоплазматические гибриды между клетками человека и человекообразных обезьян. Т.к. при сборке белков дыхательных цепей задействуются белки, закодированные как в митохондрии, так и в ядре, и которые должны крайне точным образом взаимодействовать, то по всей видимости замены и мутации в генетическом коде, накопившиеся между человеком и, к примеру, гориллой, не влияют на сборку комплексов дыхательной цепи.

Также искусственное получение цитоплазматических гибридов используется при ЭКО тремя донорами. Проведено уже несколько таких экспериментов. Первый ребенок от такого ЭКО родился в Мексике. Задействуются три «родителя»: женщина донор ядра из яйцеклетки, женщина донор яйцеклетки со здоровыми митохондриями и донор сперматозоида. Проблема этой процедуры в том, что каким бы образом не осуществлялся забор ядра из яйцеклетки, все равно вместе с ним в здоровую яйцеклетку попадает часть «плохих» митохондрий, и некоторые варианты этих

мутантных мтДНК, сопряженных с патологией, могут начать со временем вытеснять здоровые.

«Проклятие матерей»

Очевидно, что мтДНК, которая попала в мужской организм (у видов, где передача мтДНК осуществляется по материнской линии), до этого передавалась исключительно по женской линии и никогда до этого не попадала в мужские организмы, и это порождает некий генетический конфликт. Отбора против вредных вариантов мтДНК, взаимодействующих каким-то образом с генами или с проявлениями этих генов в мужском организме не было. «Условно вредные» мутации в мтДНК в мужском организме могут вступать в конфликт с аллелями, проявление которых подавляется в женском организме. Отбор не будет препятствовать появлению и фиксации таких аллелей. Такой генетический конфликт условно называется «проклятие матерей». Одно из первых описаний этого генетического конфликта – болезнь снижения плодовитости у зайцев: влияет только на плодовитость самцов, не затрагивая самок. Однако «проклятие матерей» может быть связано не только с митохондриями, но и с эндосимбионтами или внутриклеточными паразитами (напр. у золотоглазок), паразитирующими в клетках зародышевой линии и передающимися по материнской линии. Обнаружили некоторое количество золотоглазок, у которых в потомстве вырастали исключительно самки, а после обработки антибиотиком тетрациклином стали появляться и самцы. Оказалось, что эндопаразиты бактерии в потомстве убивают только самцов.

Эволюция мтДНК

К митохондриях современных эукариот осталось мало генов.
У человека: 16 569 п.н.; 13 белок-кодирующих генов
У некоторых протист их побольше, например у *Recklinomonas americana*: 69 034 п.н.; 62 белок-кодирующих генов.

Большая часть генов была потеряна или перенесена в ядро.

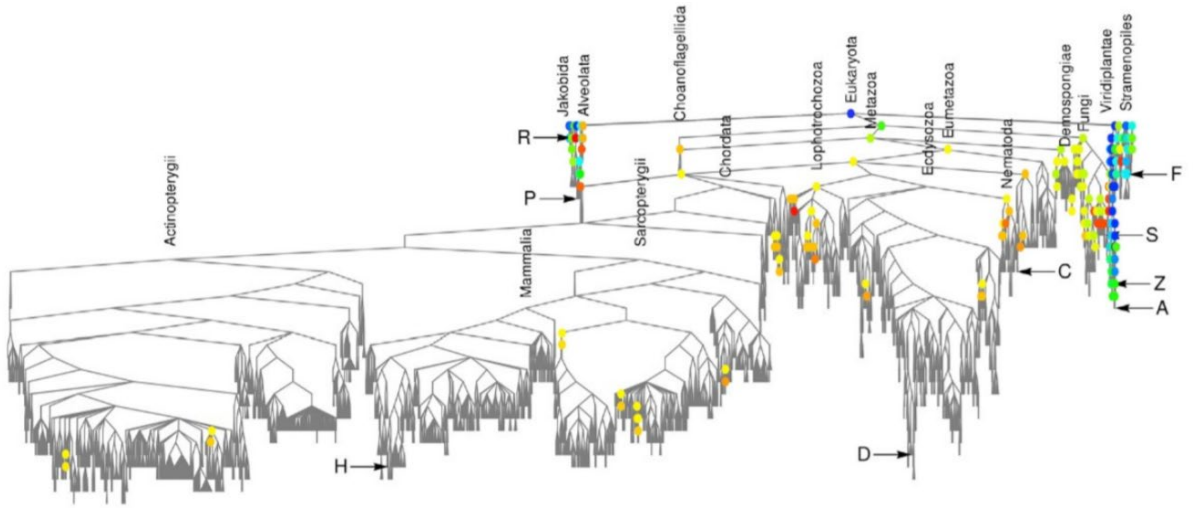


Рис. 4 Каждая цветная точка соответствует узлу, в котором произошла потеря генов в мтДНК. Желтым обозначено наименьше кол-во генов, синим – наибольшее.

Псевдогены

Вероятно, наибольшая часть утерянных генов была потеряна и перенесена в ядро на ранних этапах эволюции эукариот. Однако процесс переноса генов наблюдается и сейчас. У многих современных организмов в ядерной ДНК содержится много **псевдогенов** (NUMT – NUclear MiTochondrial pseudogenes) – генов мтДНК, перенесенных в ядро, на которых при этом уже не действует должным образом естественный отбор и которые непредсказуемо меняются, что усложняет в значительной степени изучение геномов популяционными генетиками.

Процесса обратного переноса генов из ядра в митохондрию у животных обнаружено не было. У растений зафиксированы случаи переноса ДНК из пластид в митохондрию.

Почему существует только вектор переноса генов из митохондрии в ядро? Есть несколько факторов. Во-первых, в митохондриях нет (или она значительно слабее чем в ядре) гомологичной рекомбинации. Чтобы ген интегрировался в геном, надо чтобы сработала как-то ошибочно система репарации, основанная на гомологичной рекомбинации. Во-вторых, мтДНК – это полианион. Митохондрия сама заряжена отрицательно, и с точки зрения базовой биохимии достаточно сложно направить в нее полианион. Механизм переноса генов в ядро еще не достаточно изучен.

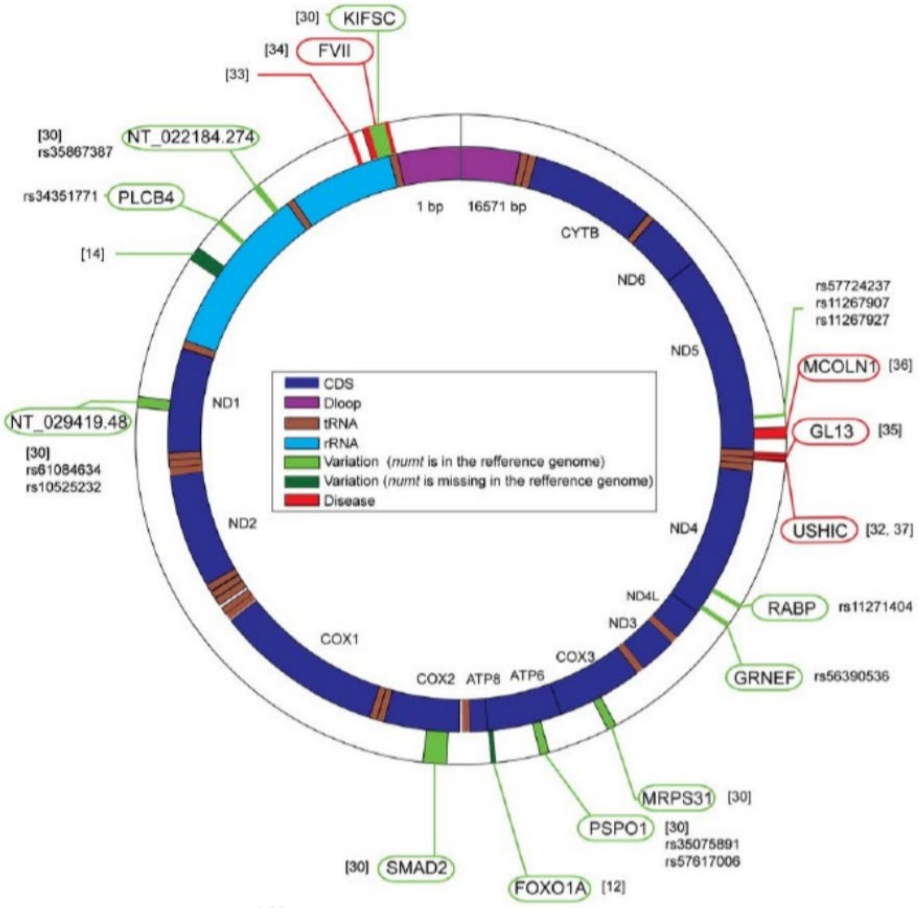


Рис. 5 Карта мтДНК человека с указанными участками, ставшими псевдогенами мтДНК беспозвоночных животных.

У многих групп беспозвоночных животных мтДНК представлена множественными и/или линейными хромосомами. Например, есть насекомые, у которых мтДДНК разбита на две хромосомы. У многих кишечнополостных линейный митохондриальный геном с теломерами. У блохи 20 маленьких кольцевых хромосом.

Почему некоторые гены остались в мтДНК?

- ограничения систем импорта: слишком гидрофобные белки нельзя перенести в митохондрию
- белки могут приобретать высокую токсичность в цитоплазме
- необходимость регуляции «на месте»
- особенности нуклеотидного состава (GC-контент), неподходящий для интеграции в ядро
- процесс переноса генов продолжается до сих пор

Преодолимы ли эти ограничения? Можно ли искусственно экспрессировать митохондриальные гены, но уже в ядре? Проведены такие эксперименты. В одном из них митохондриальный ген цитохромоксидазы экспрессировали в ядре, пришив митохондриальный адрес, но клетки дрожжей, модифицированные таким образом, не

росли в культуре. После некоторых изменений в структуре гена, в т.ч. в трансмембранном домене, удалось добиться искусственной экспрессии цитохромоксидазы в ядре, транспортировки ее в митохондрию и роста культуры в среде.

Редукция митохондрий

В ходе эволюции у групп организмов происходила редукция митохондрий. На данной картинке (рис. 6) зеленым цветом обозначены группы организмов с нормальными митохондриями с дыхательной цепью, синим – гидрогеносомы разных вариантов, красным – митосомы. *Митосомы* – некая редуцированная форма митохондрий, в них нет мтДНК; редукция происходит независимо на разных ветвях эволюции.

Гидрогеносомы – сильно редуцированные митохондрии, в которых остаются фрагменты присущих им метаболических путей. Они способны поддерживать трансмембранный градиент pH, но они не переносят протоны через мембрану, а превращают ионы в молекулу водорода (рис. 7)

Наиболее консервативной функцией митохондрий, сохраняющейся даже у митосом, является биосинтез железо-серных кластеров. На данный момент единственное известное исключение – оксимонады, паразитические организмы, которые потеряли эту митохондриальную систему биосинтеза Fe-S кластеров, но захватили бактериальную систему, локализирующуюся в цитоплазме.

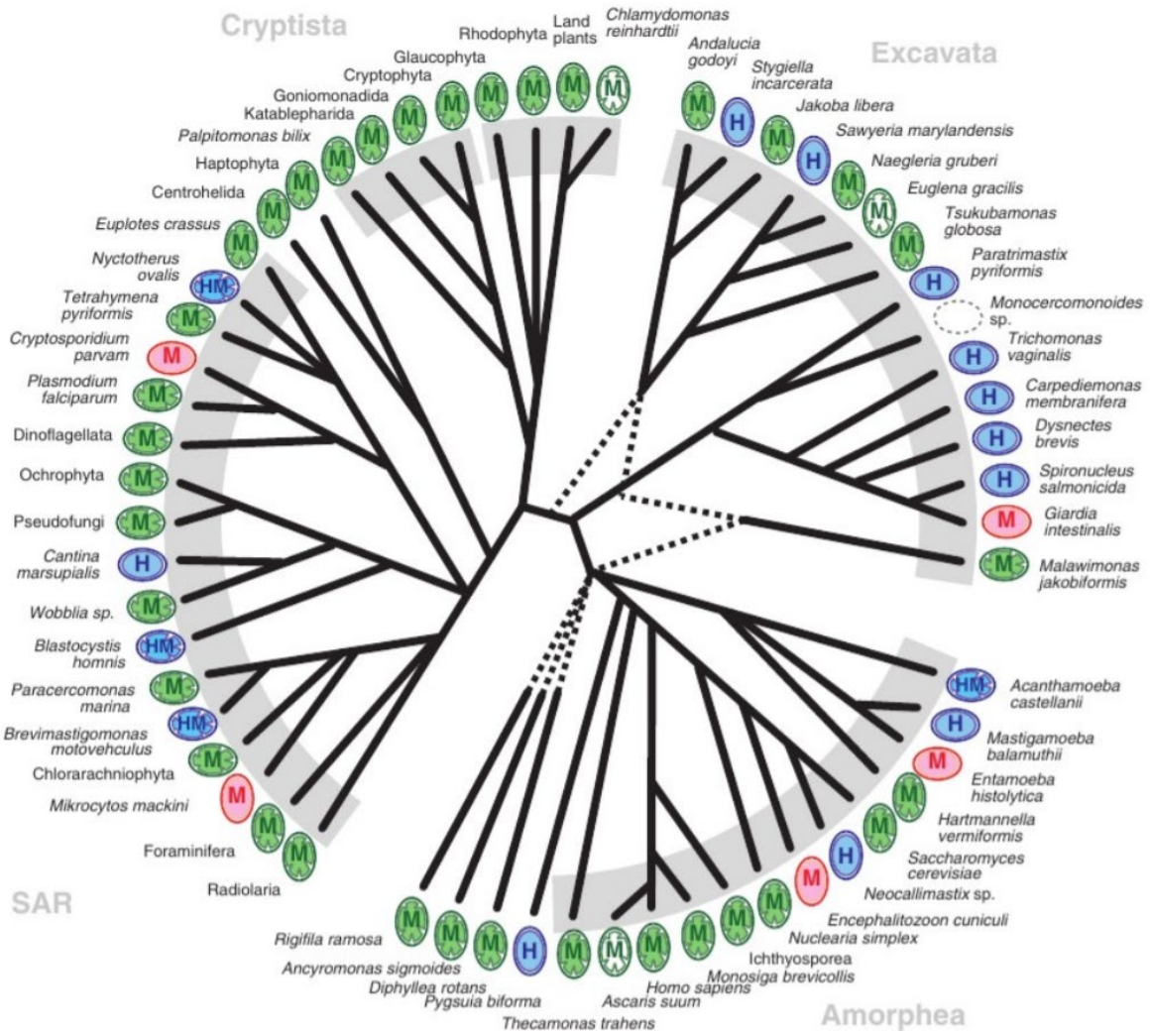


Рис. 6 Эволюционное древо организмов с обозначенными митохондриями и их производными.

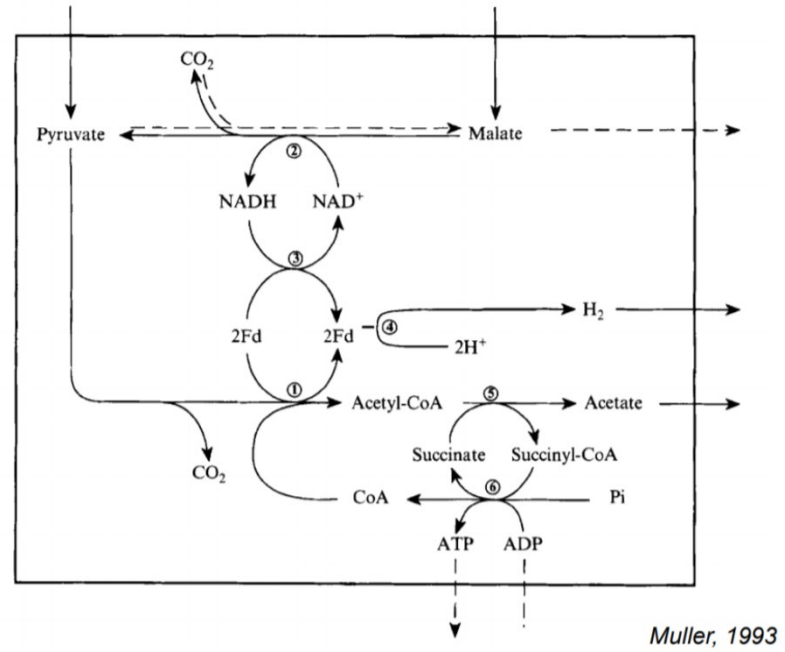


Рис. 7 Принцип работы гидрогеносомы.

Ретроградная сигнализация.

Помимо генной, существует механистическая система координации ядра и мтохондрии.

В эксперименте к клеткам дрожжей добавляли различные ингибиторы (рис. 8), тем самым блокировали мтДНК, и оказалось, что довольно большое количество геном меняло уровень своей экспрессии (цифры на рис. 8 – кол-во генов). Но что представляют собой эти гены, изменяющие экспрессию при дисфункции митохондрий?

Numbers of upregulated genes

	ρ^0	Antimycin	Oligomycin	CCCP
ρ^0	43	19	1	2
Antimycin		82	3	13
Oligomycin			69	10
CCCP				75

ρ^0	20			
Antimycin	0	18		
Oligomycin	3	2	166	
CCCP	0	2	0	67

Рис. 8 Кол-во генов, изменяющих экспрессию при обработке различными ингибиторами митохондрий.

Во-первых, при нарушении функции митохондрий в клеттке происходит увеличение количества пероксисом (увеличивается экспрессия пероксисомальных генов) (рис. 9)

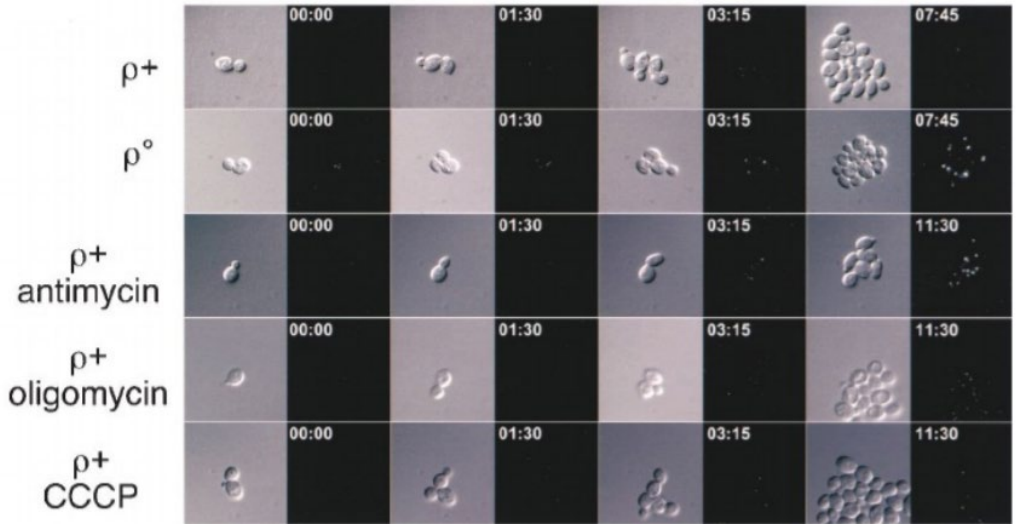


Рис. 9 Развитие по времени клеток дрожжей, обработанных ингбитором, пероксисомы флуоресцентно мечены.

Дело в том, что в митохондриях протекает большое количество метаболитических путей, и многие из них завязаны на дыхательную цепь, так что они не могут идти при заингбированной дыхательной цепи (в т.ч. при ингибировани мтДНК). В этом случае запускаются различные шунты, например глиоксилатный шунт в пероксисомах во избежание остановки цикла Кребса.

Другой ответ клетки связан с тем, что дисфункция митохондрий приводит к активации помп множественной лекарственной устойчивости. В цитоплазматической мембране находят специальные белки, обычно ABC-переносчики, которые за счет энергии гидролиза АТФ могут выбрасывать из клетки разные по физико-химическим свойствам соединения. Активность этих переносчиков является естественной защитой клетки от ксенобиотиков. Как объясняют их активацию в ответ на дисфункцию митохондрий? Логично предположить, что клетка оказалась в токсичной среде с ядом, который блокирует митохондрии, и на всякий случай происходит включение защиты от токсичных веществ: митохондрия посылает в ядро Rtg1p и Rtg3p, мишенями которых являются гены упомянутых переносчиков.

Активация ретроградной сигнализации в некоторых клетках ингибирует скорость пролиферации клеток.

Механизмы ретроградной сигнализации во многом еще недостаточно изучены, но известны некоторые циплазматические факторы, трансдуцирующие сигнал от неработающей митохондрии к ядре. Так, например, для пекарских дрожжей известен каскад транскрипционных факторов, нуклеотидсвязывающих белков (рис.10), но неизвестно, как именно считывается функциональное состояние митохонтрии (возможно, это редокс сигналинг). Также, в норме митохондрия – это можно антиоксидант, с большой скоростью поглощающий перекись водорода, но при дисфункции может сама стать источником активных форм кислорода.

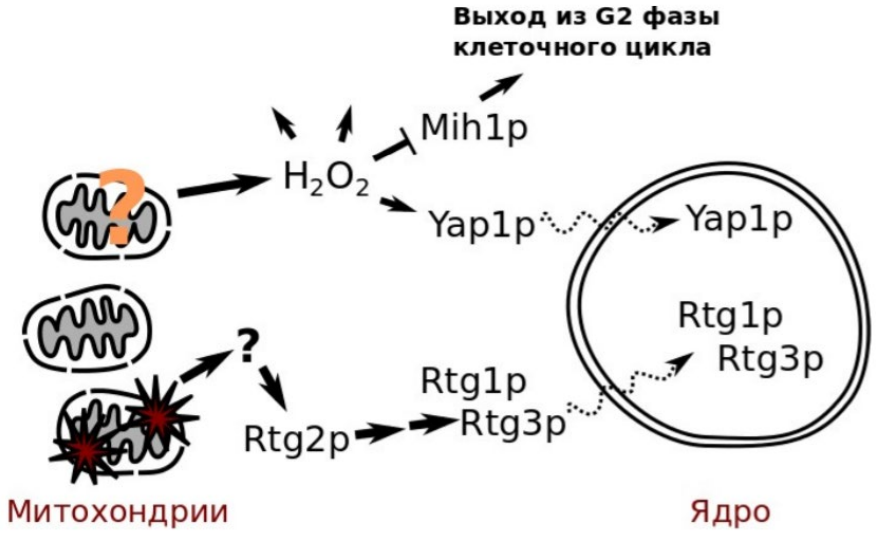


Рис. 10 Схема ретроградного сигналинга пекарских дрожжей.

У человека митохондрия является депо Ca2+, и при выходе его из органеллы запускаются каскады по многим мишеням.

Рис. 11 Ca2+ - зависимая ретроградная сигнализация.

Возможно и принципиально иная схема сигнализации. Ее метафорически можно описать следующим образом: представьте, что вы хотите проверять, не поселился ли человек в пустой квартире, и постоянно отправляете туда письмо. Если все нормально, то письмо возвращается, а если ситуация изменится, то письмо будет «прочитано» и не вернется. То есть проиходит прекращение стандартного прохождения сигнала, и такой способ коммуникации известен и хорошо изучен. Белок ATFS-1 имеет как митохондриальный, так и ядерный адрес, и пока с митохондрией все в порядке, более активным оказыватся митохондриальный таргетинг и он разрушается митохондриальными протеазами. При дисфункции митохондрий начинает преобладать ядерная локализация, там срабатывает транскрипционный фактор, и активируются гены, отвечающие за «спасение» митохондрии.

Сигналинг, связанный с апоптозом (выход цитохрома С) тоже можно рассматривать как вариант коммуникации ядро-митохондрия.

Что еще экспортирует митохондрия в цитоплазму? (эти соединения потенциально могут быть участниками ретроградной сигнализации, достоверно не изучено)
- FeS кластеры
- некоторые органические кислоты
- мтДНК (редкие случаи с горионтальным переносом генов)
- полипептиды (в мембране митохондрии есть переносчики, выкачивающиие пептиды наружу, упоминались в теме митохондриальног протеолиза)

Другие пути сигналинга митохондрий.

Митохондрии могут переговариваться между собой, например с помощью Ca2+. Также известны случаи взаимодействия митохондрий с внутриклеточными паразитами – так миксоплазма обычно собирает вокруг себя большое количество митохондрий для защиты от аутофагии клетки.

Лекция 7

Аутофагия – один из основополагающих механизмов организма, присущий для каждой клетки.

История изучения аутофагии

Сначала поговорим немного о людях, стоявших у истоков изучения аутофагии:

1. Кристиан де Дюв – довольно известный в свое время биохимик, которых в 60х годах развивал и совершенствовал методы клеточного фракционирования, что позволило ему исследовать различные клеточные фракции, анализировать их по ферментативному и т.д. составу. Именно он открыл лизосомы и подробно охарактеризовал состав пероксисомы. В итоге за свои работы в 74м году он получил Нобелевскую премию.
2. Йошинори Осуми – в 2016 году получил Нобелевскую премию за открытие механизмов аутофагии. В частности, он занимался исследованием дрожжевой клетки. Его первая работа в этой области была опубликована в 93 году, но, т.к. она была на японском языке, то не была замечена научным сообществом. Йошинори показал, что существует ряд генов, инактивация которых приводит к дефектам в образовании аутофагосом (ATG-Autophagy-related Genes). Далее были проведены опыты с клетками млекопитающих, позволившие открыть белок LC3 (гомолог дрожжевого ATG8) и исследовать его функционирование. Он же создал мышь с нокаутированным геном ATG5, и развитие этой мыши характеризовалось тем, что ее эмбриональное развитие проходило нормально, но она погибала за первые сутки после рождения. Т.е. аутофагия жизненно необходимо в постэмбриональном развитии.

В настоящее время, что важно, открыто уже более 30ти генов, связанных с аутофагией (ATG), однако в научном сообществе не было интереса к этой теме сразу после открытия процесса аутофагии (рис. 1), а развитие исследований началась только после открытия механизма процесса.

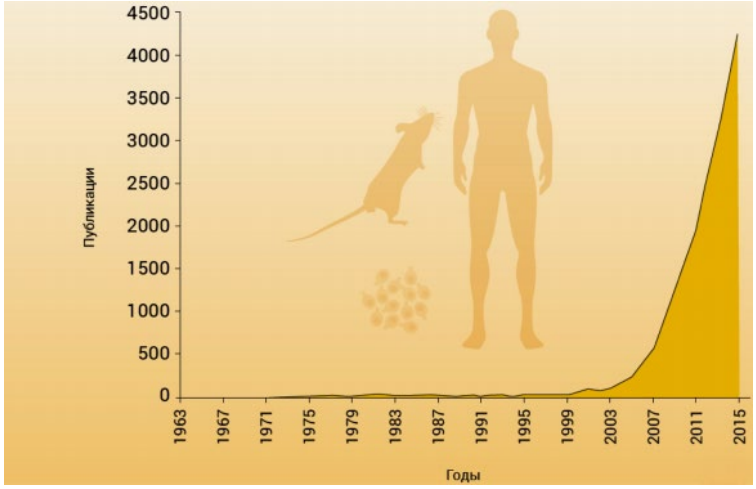


Рис. 1 Развитие интереса к теме аутофагии в 20-21 веке

Основная задача аутофагии – это избавление от «врагов», которые раньше были «друзьями». Как это происходит и для чего необходимо? В процессе функционирования наши клетки так или иначе стареют, нарушаются процессы биосинтеза и распада, накапливаются поврежденные митохондрии. Для этого в клетке имеются лизосомы – органеллы с кислой средой и ферментами, участвующие в деградации внутриклеточного содержимого.

Почему аутофагия так интересна? Она играет важную роль в:

Физиологические процессы:
- клеточная дифференцировка и морфогенез
- защита клеток от патогенов и стрессовых воздействий
- клеточная гибель
- старение

Патофизиологические процессы:
- рак
- нарушения метаболизма (напр.: диабет)
- нейродегенеративные патологии
- миопатии

Какие стимулы активируют аутофагию?
1. Нехватка питательных веществ. Аутофагия — это катаболический процесс, чтобы выжить, клетке необходима энергия, и если питательных веществ не хватает, то клетка начинает «поедать» саму себя. При нехватке аминокислот обычно стимулируется неспецифическая аутофагия.
2. Наличие в цитоплазме поврежденных органелл.
3. Наличие частично денатурировавших белков и их агрегатов.
4. Окислительный и цитотоксический стресс.
5. Гипоксия.

Какие виды аутофагии существуют? В основном их разделяют на три вида:

1. Макроаутофагия

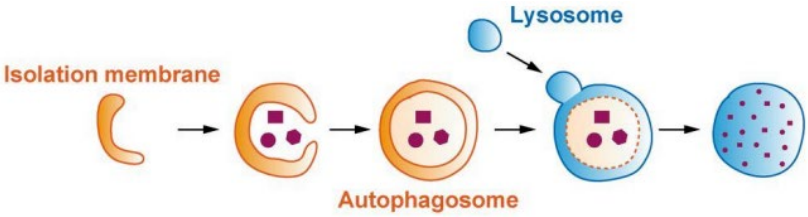


Рис. 2 Макроутофагия

2. Микроаутофагия – особо широко распространенное явление у дрожжей и растений.

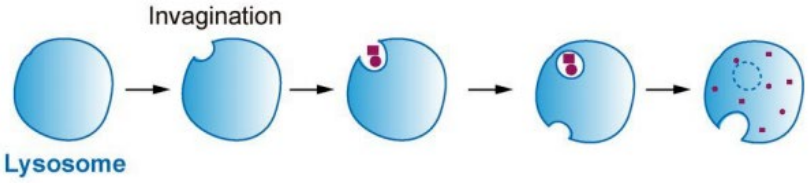


Рис. 3 Микроаутофагия

3. Шаперон-связанная аутофагия – отвечает за деградацию неправильно свернутых и поврежденных белков и их агрегатов.

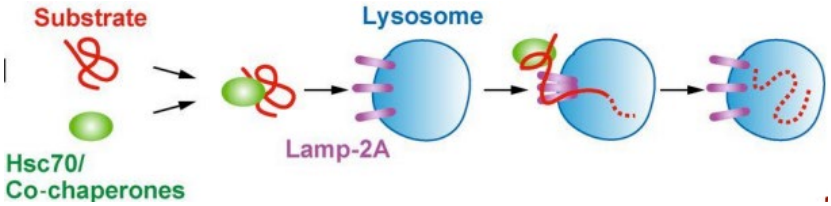


Рис. 4 Шаперон-связанная аутофагия

Макроаутофагия

Она запускается, когда нужно что-то быстро и массированно уничтожить.
На рисунке 5(a) можно видеть созревающую аутофагосому, которая подходит к поврежденной митохондрии. Далее на 5(b) видно, что она уже обернулась вокруг митохондрии, митохондрия подвергается деградации (5(c)), и на 5(d) остается некоторое постепенно переваривающееся скопление белков.

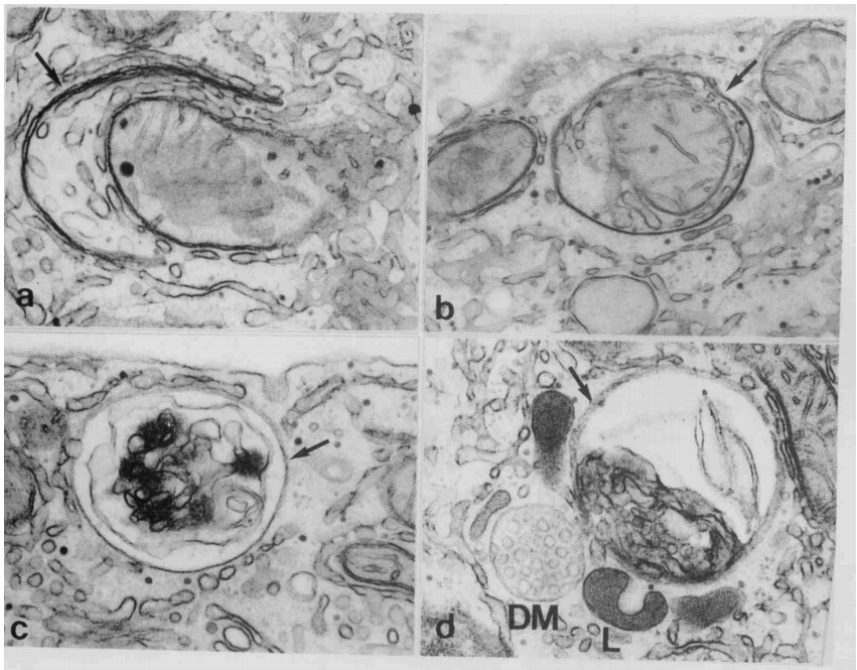


Рис. 5 Макроаутофагия с помощью аутофагосомы

Механизмы (рис. 6)

Комплекс mTORC1 отвечает за регуляцию аутофагии в естественных условиях. Основной участник этого процесса – серин-треониновая киназа mTOR (mammalian

target of rapamycin). Существует также комплекс mTORC2, и их основное различие заключается в белках Raptor (который является мишенью рапамицина) и Rictor (не является мишенью для рапамицина)

> Рапамицин – использовался как иммунодепрессант, но выяснилось, что он запускает механизмы аутофагии.

Другие субъединицы этого комплекса регулируют активность mTOR. В норме, когда mTOR достаточно активен, в клетке достаточно аминокислот и глюкозы, то этот комплекс активен и стимулирует биогенез. При нехватке аминокислот, глюкозы и т.д. комплекс ингибируется. В норме он локализован на мембране лизосом и состоит из двух субъединиц (в виде ромбовидного дуплекса). Как только он становится неактивен, он диссоциирует с мембраны лизосомы в цитоплазму, дефосфорилируется, и запускает различные катаболические процессы, в т.ч. аутофагию, подавление биосинтеза липидов, стимуляцию биогенеза лизосом. При этом mTORC2 не активируется стимулами, которые влияют на mTOR1, а реагирует только на ростовые факторы и влияет на биосинтез липидов и организацию цитоскелета.

Когда в норме mTORC1 активен, он подавляет ULK1 комплекс, состояний из киназы и белков Atg. При инактивации mTORC1 ULK1 перестает подавляться, закрепляется на мембране и начинает фосфорилировать другие белки. В частности, нас интересует PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназный комплекс), в основном образующий фосфатидилинозитол-3-фосфат. Этот липид обогащает мембрану фагофора (ранняя стадия развития лизосомы) и является первичным стимулом для роста этой мембраны. По современным данным донором мембраны для растущей лизосомы могут быть ЭПР, митохондрии, плазматическая мембрана. На этой стадии в мембрану внедряется белок LC3 (в т.ч. он позволяет визуализировать фагосому с самых ранних стадий, чем активно пользуются исследователи, встраивая в него флуоресцентные метки)

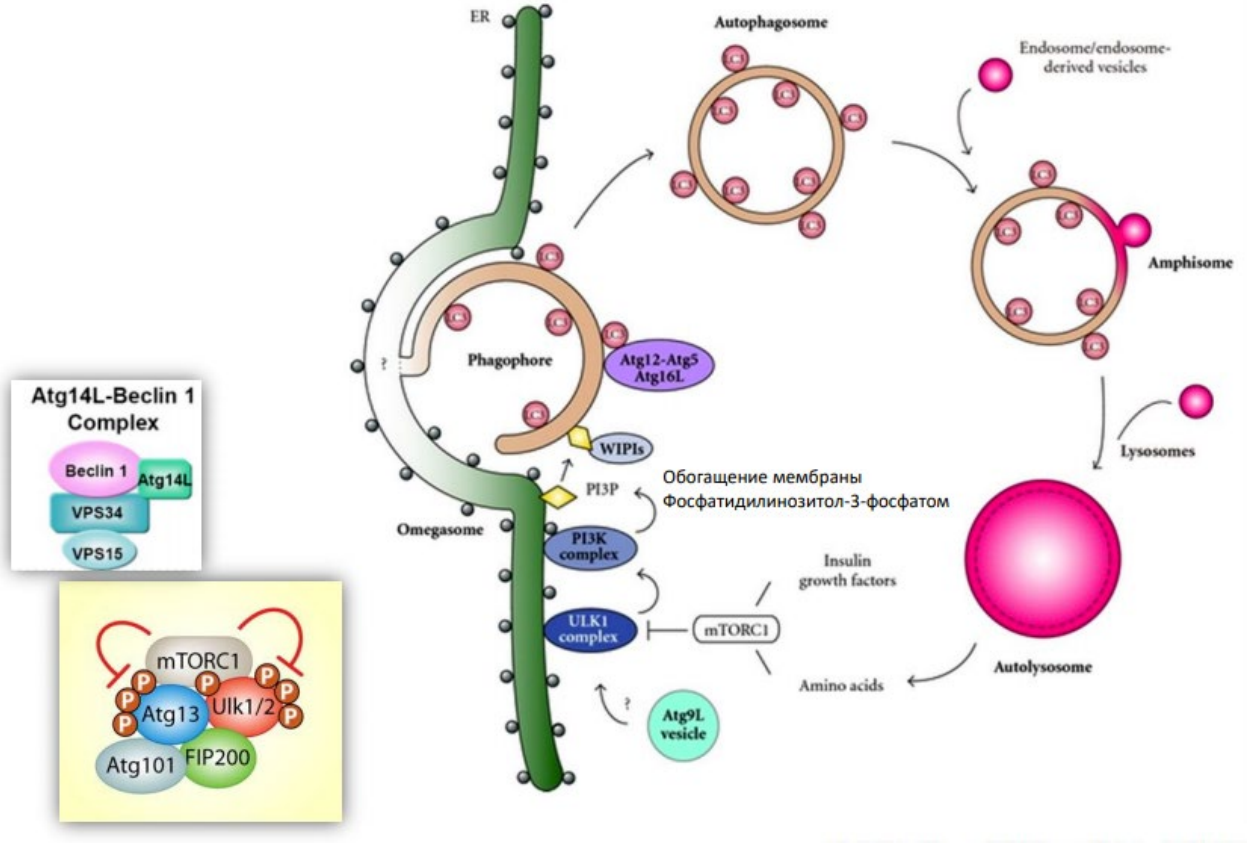


Рис. 6 Механизм образования фагофора

Еще один механизм, за открытие и исследование которого была вручена Нобелевская премия (рис. 7). Нарушение в работе любого из белков этой схемы приводит к нарушениям в процессах аутофагии.
В процессе убиквининирования задействуются в основном три фермента, это: 1) убиквитинактивирующий фермент 2) убиквитин коньюгирующий фермент 3) убиквитинлигаза. Такой же принцип работает в случае аутофагии, где присутствуют два убиквинподобных белка – Atg12 и LC3.

Осуществляет процесс процессирования белка LC3 – происходит его липидизация, присоединение фосфатидилэтаноламина, что позволяет ему закрепляться на мембране формирующей фагосомы. (форма LC3-1 переходи в LC3-2, что является маркером начала аутофагии)

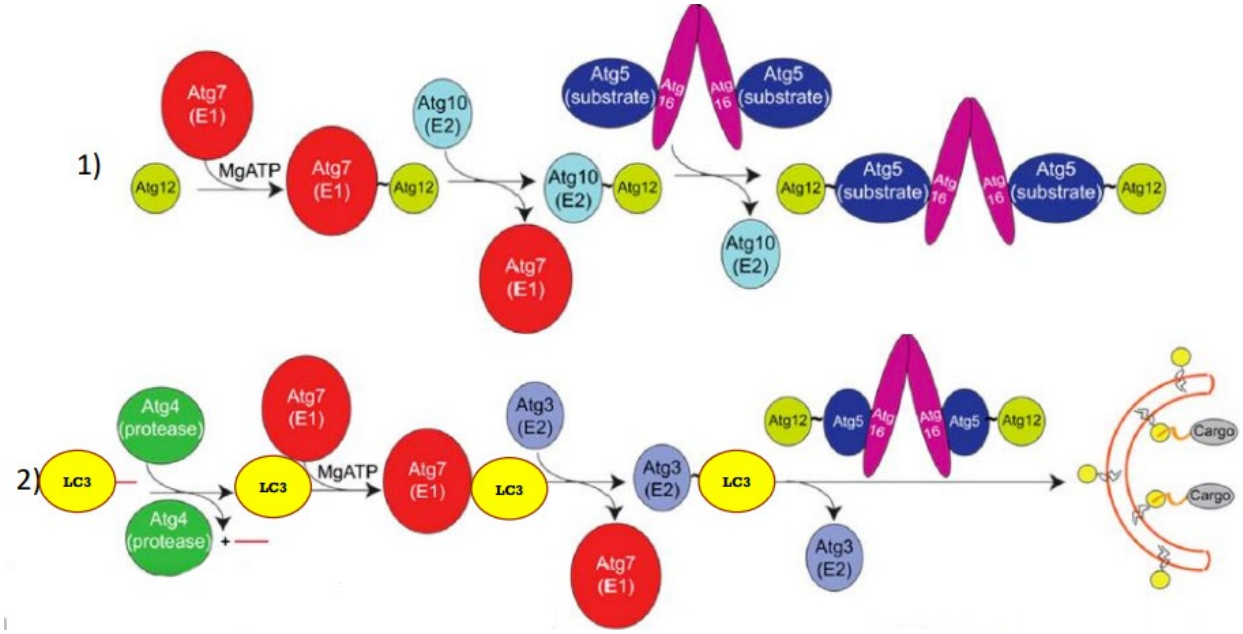


Рис. 7 Система процессирования белка LC3

Микроаутофагия.

В настоящее время микроаутофагия сравнительно мало исследуется по сравнению с другими видами аутофагии, т.к., по-видимому, не очень развита в больших масштабах в животных клетках. Тем не менее существует три основных типа микроуатофагии.

Тип 1: происходит выпячивание мембраны лизосомы, она захватывает часть цитоплазмы с содержимым, чаще с пероксисомами, втягивается обратно и затем происходит переваривание (не замечен у млекопитающих).

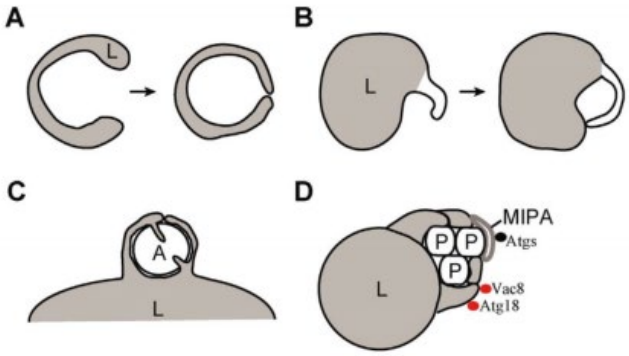


Рис. 8 Тип 1 микроаутофагии

Тип 2: идет с участием небольших белков ГТФаз, в частности Rab7 (ключевой регулятор лизосомо-эндосомального трафика). Происходит инвагинация мембраны и переваривается все то, что туда попало. Таким образом часто происходит накопление липидных капель (существует и у млекопитающих).

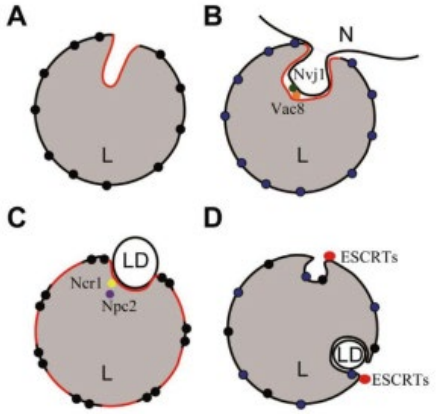


Рис. 9 Тип 2 микроаутофагии

Тип 3: идет с участием белка Hsc70 (шаперон), но в отличие от шаперонзависимой аутофагии LAMP2A (лизосомальный белок) значения не имеет. Происходит электростатическое взаимодействие Hsc70 с фосфатидилсерином мембраны эндосом.

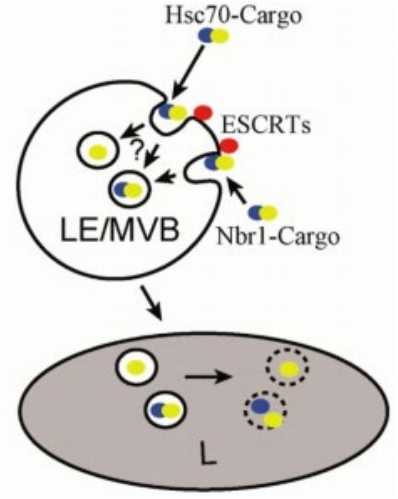


Рис. 10 Тип 3 микроаутофагии

Шаперон-зависимая аутофагия

Имеется в клетках эукариот, важна для узнавания и деградации неправильно свернутых белков и их агрегатов. Белок Hsc70 узнает белки с мотивом KFERQ, что составляет около 30% цитозольных белков. Происходит взаимодействие комплекса (белок-шаперон Hsc70 + таргетный белок) с лизосомальным белком LAMP2A, происходит деградация белка в лизосоме (рис. 11). В норме LAMP2A постоянно обновляется на мембране лизосомы. При активации объединяется в дуплекс и образует пору для входа белка в органеллу.

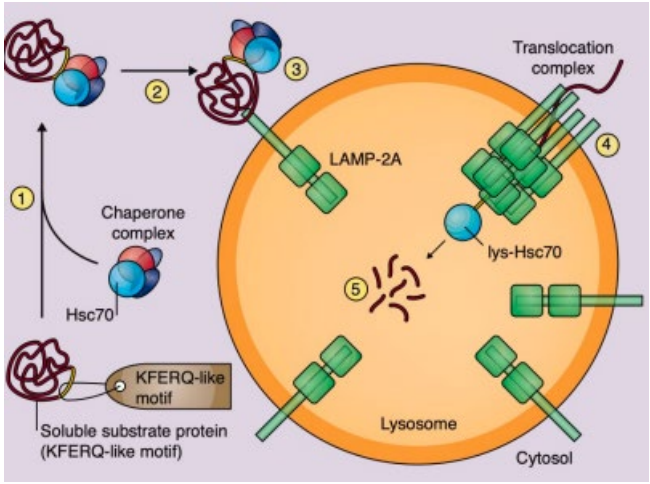


Рис. 11 Шаперон-зависимая аутофагия

Избирательная деградация митохондрий.

Митохондрии – крайне важные органеллы, участвующие в окислительном фосфорилировании, окислении жирных кислот, биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов, но в связи со своими функциями они легко повреждаются и образуют активные формы кислорода. Существуют механизмы, следящие за состоянием митохондрий. В норме митохондрии (часть ретикулума) имеют свой «срок жизни». Деградация митохондрий осуществляются условно на нескольких уровнях. При накоплении повреждений происходит деградация митохондриальных белков протеолизом, они могут специально накапливаться в определенной части митохондрии, которая потом отщепляется и деградирует. Но при падении трансмембранного потенциала на большом участке митохондрии активируется митофагия, скорость которой может достигать уничтожения 50 органелл/час.

Основные митохондриальные протеазы эукариотов:
1) внутримитохондриальные протеазы – локализуются все время внутри митохондрии
2) псевдомитохондриальные протеазы – не обладают протеазной активность, но похожи
3) переходные протеазы – могут переходит в митохондрию и из нее.

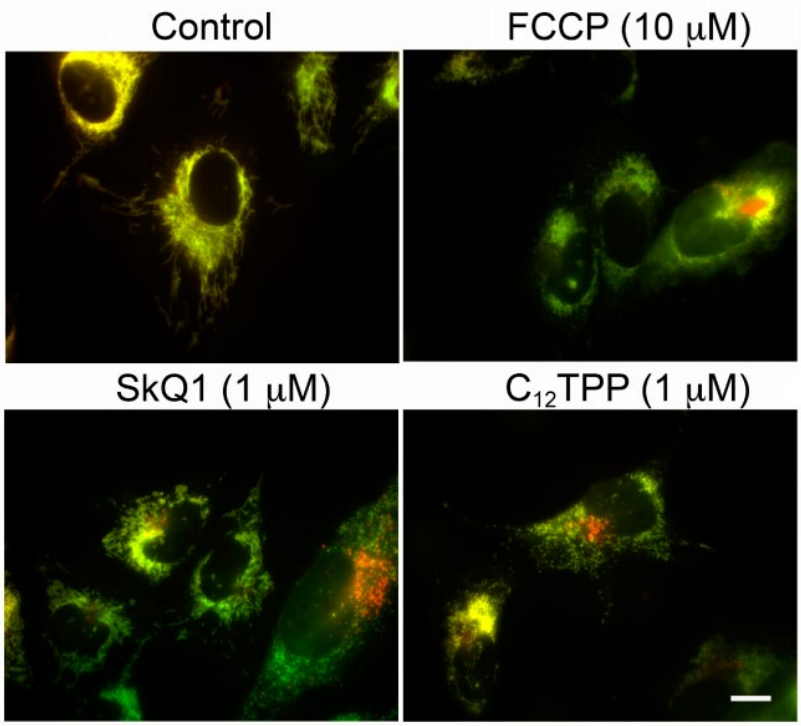
Основная их функция – участие в процессинге белков, попадающих в митохондрию. Также существуют протеазы, участвующие в контроле и регуляции качества митохондрии (например: LONP). Т.к. митохондрии периодически продуцируют активные формы кислорода, часть белков дыхательной цепи может повреждаться, именно эти белки и узнают и деградируют протеазы. Оставшиеся пептиды выбрасываются из митохондрии наружу. Нарушения в работе этих протеаз приводят к различным нейродегенеративным заболеваниям, таким как болезнь Паркинсона, миопатиям и т.д.

Если система протеаз так или иначе не справляется, то запускается процесс селективной макроаутофагии. (Интересно, что при активации аутофагии при голодании

происходит быстрое слияние всех митохондрий в митохондриальный ретикулум, чтобы здоровые митохондрии не попали под деградацию.) При окислительном стрессе происходит фрагментация митохондриальной сети.

PINK-PARKIN зависимая (классическая) аутофагия.

Довольно популярный в последнее время метод исследования митохондрии – метка тандемной конструкцией. Принцип работы конструкции: при кислом pH флуоресценция GFP затухает и остается только красный сигнал mCherry; эти две флуоресцентные метки совместно располагаются на мембране митохондрии. Тем самым мы можем наблюдать митофагию, фактически, в реальном времени.



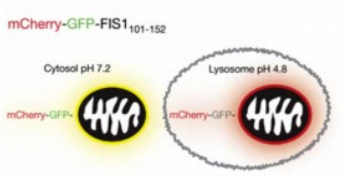


Рис. 12 Мечение тандемной конструкцией с GFP и mCherry

Киназа PINK в норме имеет митохондриальный адрес, проходит через внешний и внутренний переносчики мембраны, в митохондрии адрес отщепляет специальная протеаза, затем PINK выходит наружу и протеолизируется. Когда происходит повреждение митохондрии и деполяризация, PINK «застревает» во внешней мембране и начинает фосфорилировать в т.ч. PARKIN, который начинает убиквитинировать белки на поверхности митохондрии. Адаптерные белки, такие как p62 (с LIR мотивом) взаимодействуют и с LC3 и с убиквитинированными белками, начинается митофагия.

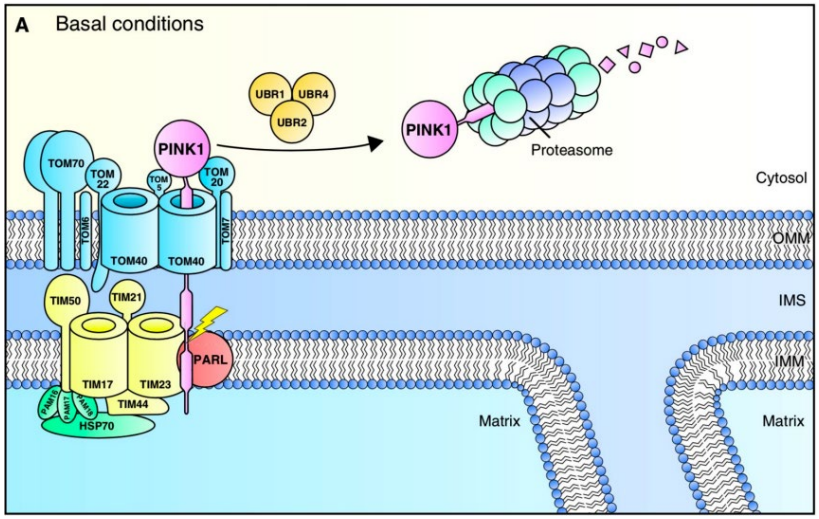


Рис. 13 PINK-PARKIN механизм

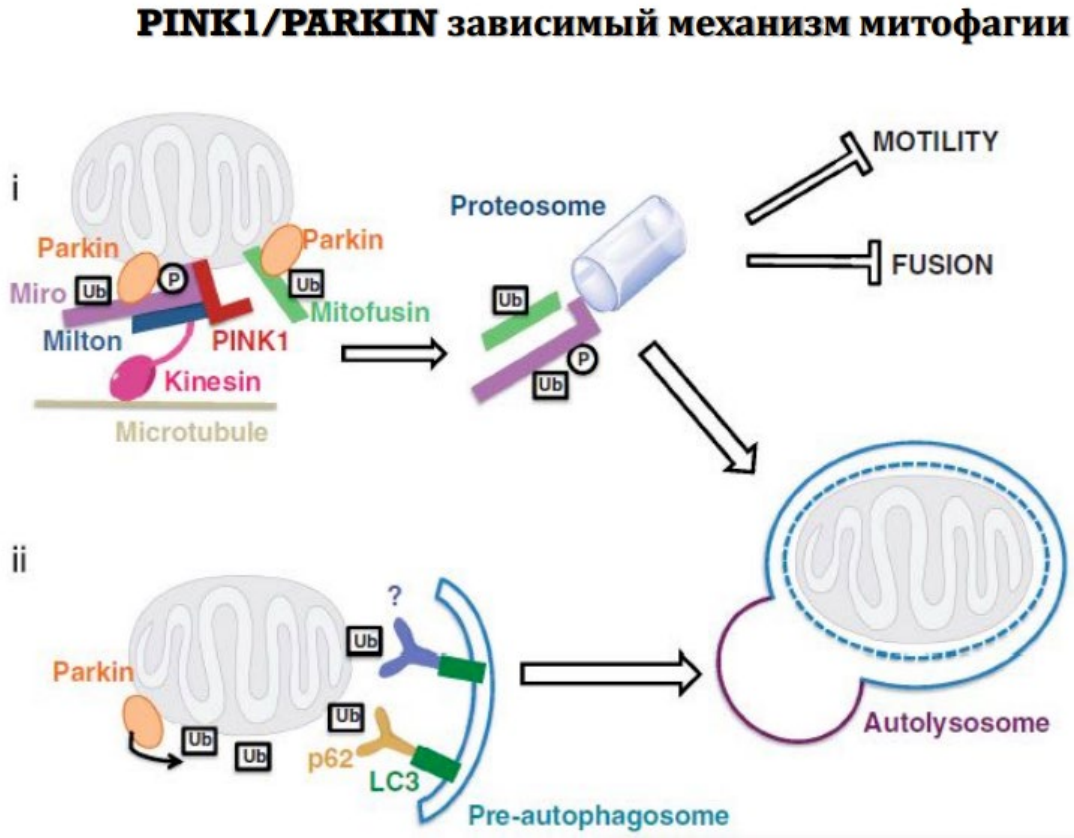


Рис. 14 PINK-PARKIN зависимый механизм митофагии

NIX-зависимый механизм аутофагии.

Еще давно было показано, что ретикулоцит при созревании повышает экспрессию белка NIX, и митохондрии, меченные этим белком, захватываются фагосомой, и в

дальнейшем выбрасываются из клетки в кровоток. В некоторых условиях (например: при неработающей PARKIN системе, в раковых клетках) осуществление этого механизма возможно и в других клетках организма.

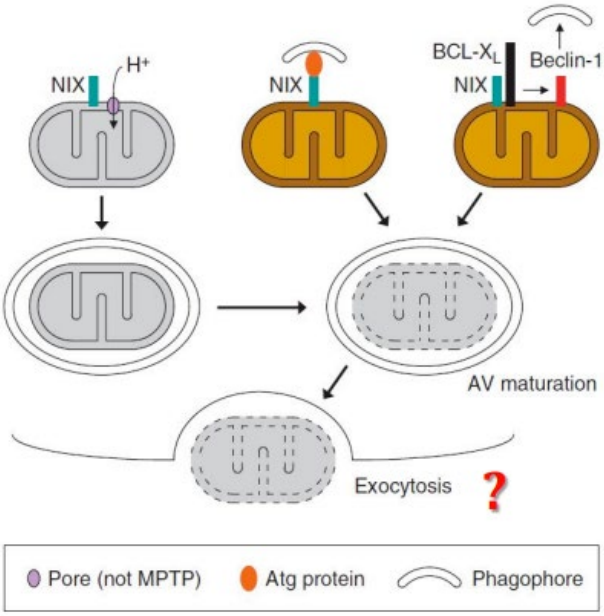


Рис. 15 NIX-зависимый механизм аутофагии

Нобелевская премия по физиологии и медицине 2019 года – присуждена Уильяму Келину, Питеру Рэтклиффу, Греггу Семенце за открытие механизмов адаптации клеток к изменению концентрации кислорода. HIF-1a (фактор, индуцируемый гипоксией) – главный фактор, регулирующий ответ клетки на изменение концентрации кислорода.

Основные функции:
- активирует системы снабжения тканей кислородом
- активирует антиоксидантные системы клетки для борьбы с АФК – важнейшая функция HIF-1α
- временно «выключает» работу митохондрий, что не позволяет им производить АФК
- стимулирует митофагию за счет активации экспрессии белков NIX и BNIP3 (PARKIN независимая митофагия)

Большинство раковых клеток находятся в состоянии гипоксии, поэтому изучение фактора HIF имеет важное значения для понимания борьбу с раковыми опухолями.

При достаточном количестве кислорода экспрессия HIF более менее постоянна, при этом он также постоянно деградирует за счет пропилгидроксилазы (PHD) при реакции окислительного декарбоксилирования 2-кетоглутарата с участием Fe2+ (т.е. регуляция HIF зависит от количества кислорода) . Также в условиях окислительного стресса образуется перекись, опасная для железа в составе этого фермента, так что PHD инактивируется, и происходит накопление HIF.

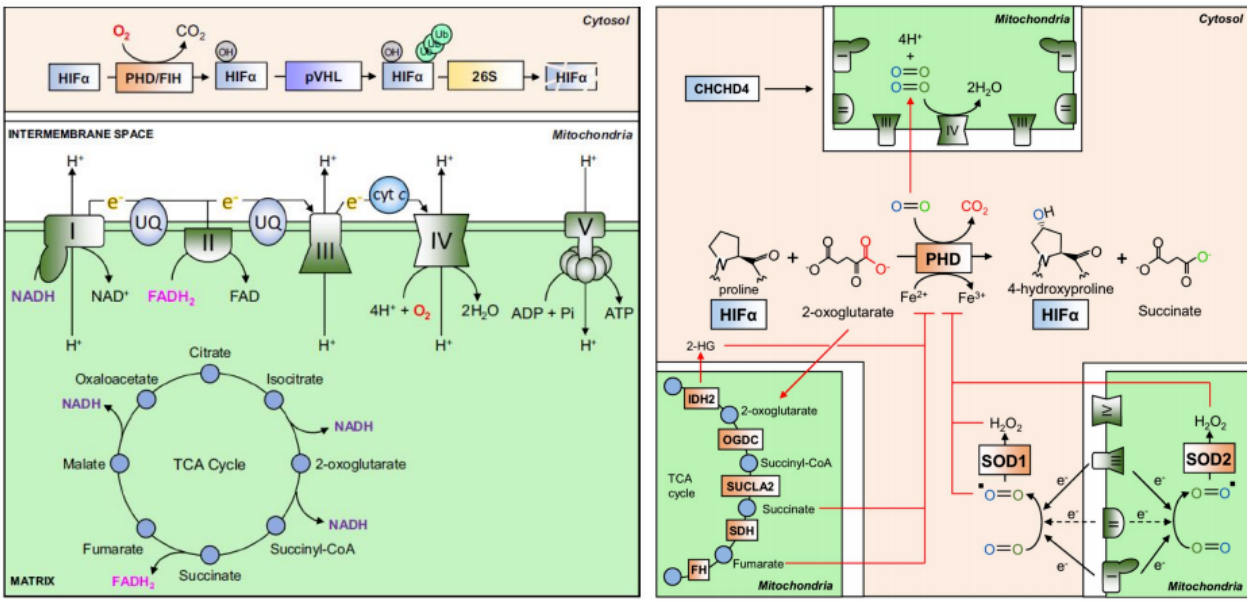


Рис. 16 Схема работы HIF-1a

Лекция 8

Роль митохондрий в регуляции клеточного кальция

Нормальная концентрация кальция составляет:
- в цитоплазме клетки в невозбужденном состоянии - 0,1 мкМ
- во внеклеточной жидкости – 2 мМ
- в цитоплазме клетки в возбужденном состоянии – 0,2-20 мкМ
- в матриксе митохондрий – 0,2-25мкМ
- в ЭПР – до 200-300мкМ

Почему изучение Ca2+ важно для биологии? Ca2+ - один из важнейших неорганических медиаторов. Ион кальция взаимодействует со специальными сайтами связывания белков, для них существуют определенные требования. Сайт связывания не должен связывать Mg2+. Константа диссоциации (константа связывания) - вид константы равновесия, которая характеризует склонность объекта диссоциировать (разделяться) обратимым образом на частицы; когда концентрация чего-то равна константе связывания этого чего-то белков, то половина общего кол-ва белков будет связана с веществом. Чтобы белок эффективно реагировал на изменение физиологических концентраций кальция в цитоплазме, его константа связывания по кальцию должна быть где-то между 100нМ и 20 мкМ.

Ca2+ как внутриклеточный мессенджер.

Допустим, клетка получает сигнал. Он может быть разнообразным: у зрительных клеток – квант света, упавший на родопсин, для мышечной клетки – потенциал действия, пришедший от нейрона через синапс с помощью медиатора, запустивший, в большинстве случаев каскад от g-белков. Большое значение в таких каскадах имеет фосфолипаза С (расщепляет фосфолипиды, у которых через фосфат к глицерину присоединен инозитол, при этом в мембране остается диацилглицерол; и то и дроге являются медиаторами, передающими сигнал возбуждения дальше). Инозитолтрифосфат взаимодействует с инозитолтрифосфатными рецепторами на мембране эндоплазматического ретикулума, диацилглицерол – с кальциевыми каналами. Помимо диацилглицерола кальциевые каналы также могут возбуждаться и другими соединениями. В ответ на некие стимулы, которые могут приходить извне и изнутри клетки, происходит две вещи: открываются кальциевые каналы в цитоплазматической мембране и в мембране ЭПР. В ответ на открытие канала кальций потечет в цитоплазму по градиенту концентрации, подгоняясь за счет электрического потенциала. Кальциевые каналы – самые быстрые из ион-транспортирующих белков. В итоге концентрация кальция в цитоплазме быстро увеличивается, ионы кальция связываются с различными белками, и в зависимости от набора кальций-связывающих белков клетка отвечает на стимул. Ответ произошел, и перед клеткой встает следующая задача: избавиться от кальция. Каналы закрываются, и кальций удаляется из клетки. Этим занимается семейство белков, которое умеет обменить ионы натрия на ионы кальция. Как мы помним, натрия внутри мало, снаружи много, и он заряжен, поэтому

электрохимический градиент направлен внутрь, и за счет обмена белки выкачиваю кальций наружу из клетки. Эти белки имеют низкую константу связывания кальция (десятки микромоль) и работают при высоких его концентрациях. Когда концентрация кальция уменьшается, основную роль начинают играть кальциевые АТФазы, например PMCA – белок выкачивает кальций наружу за счет энергии гидролиза АТФ, имеет большое сродство к кальцию и константу равновесия в десятки наномоль; другой белок SERCA – АТФ-зависимый насос, закачивает кальций внутрь ЭПР.

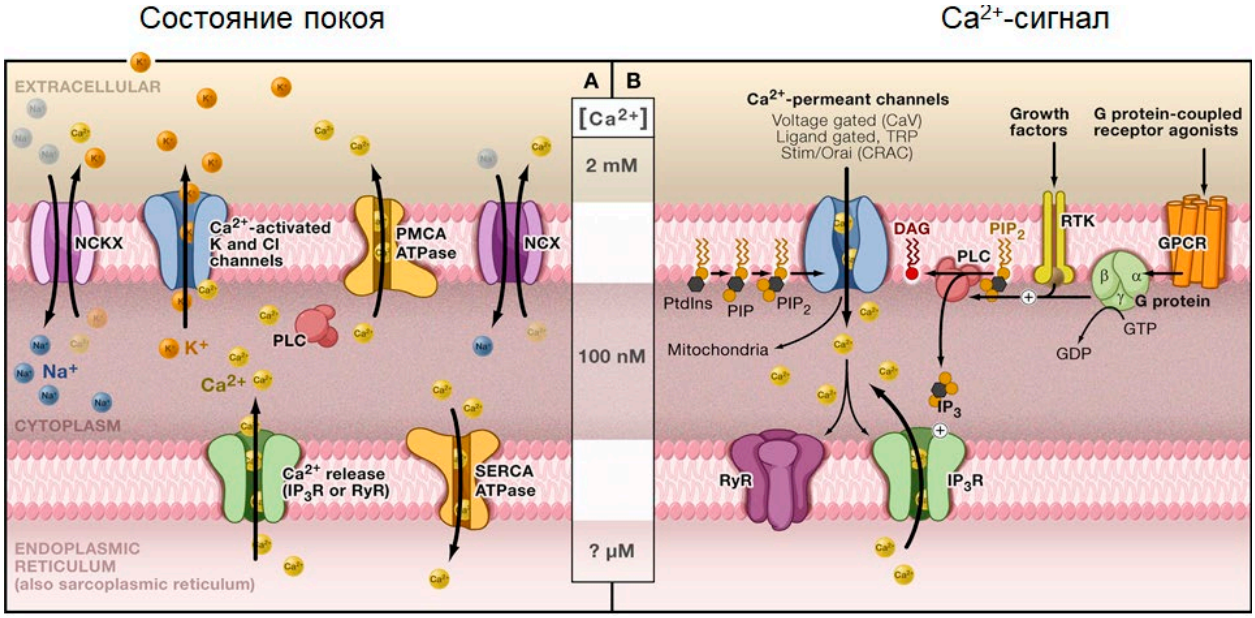


Рис. 1 Сравнение клетки в состоянии покоя и при Ca2+ сигнале

Митохондрии и кальций.

Приводимые далее факты являются верными для человека и других млекопитающих, в других группах организмов механизмы могут сильно отличаться.

Электрический потенциал на внутренней мембране митохондрии равен примерно -180мВ. Белок, пропускающий кальций внутрь митохондрии по электрохимическому градиенту обнаружили функционально 50 лет назад, однако определить структуры этого белка удалось сравнительно недавно. Когда концентрация кальция повысилась и ее надо откачивать, начинает работать митохондриальный унипортер, работающий только при повышенных концентрациях кальция, так что митохондрии довольно быстро заполняются ионами кальция. В митохондриях кальций алостерически активирует цикл Кребса и ферменты окислительного фосфорилирования:
- Пируват-, а-кетоглутарат- и изоцитрат-дегидрогеназу
- Asp/Glu транспортер
- АТФ синтазу
- АТФ/АДФ антипортер

Иными словами, на повышение концентрации кальция митохондрия отвечает активизацией энергетического метаболизма. Что довольно логично, т.к. для работы кальциевых АТФаз требуется много АТФ.

Для возбудимых клеток необходимо избавляться от кальция в цитоплазме очень быстро. К примеру, от скорости изменения концентрации кальция в клетках сетчатки зависит разрешение зрения во времени. Таким резервуаром для откачки кальция служит митохондрия. Когда кальция становится мало в цитоплазме, то он снова вытекает через натрий-кальциевый обменник в цитоплазму, но оттуда уже убирается в ЭПР или наружу из клетки.

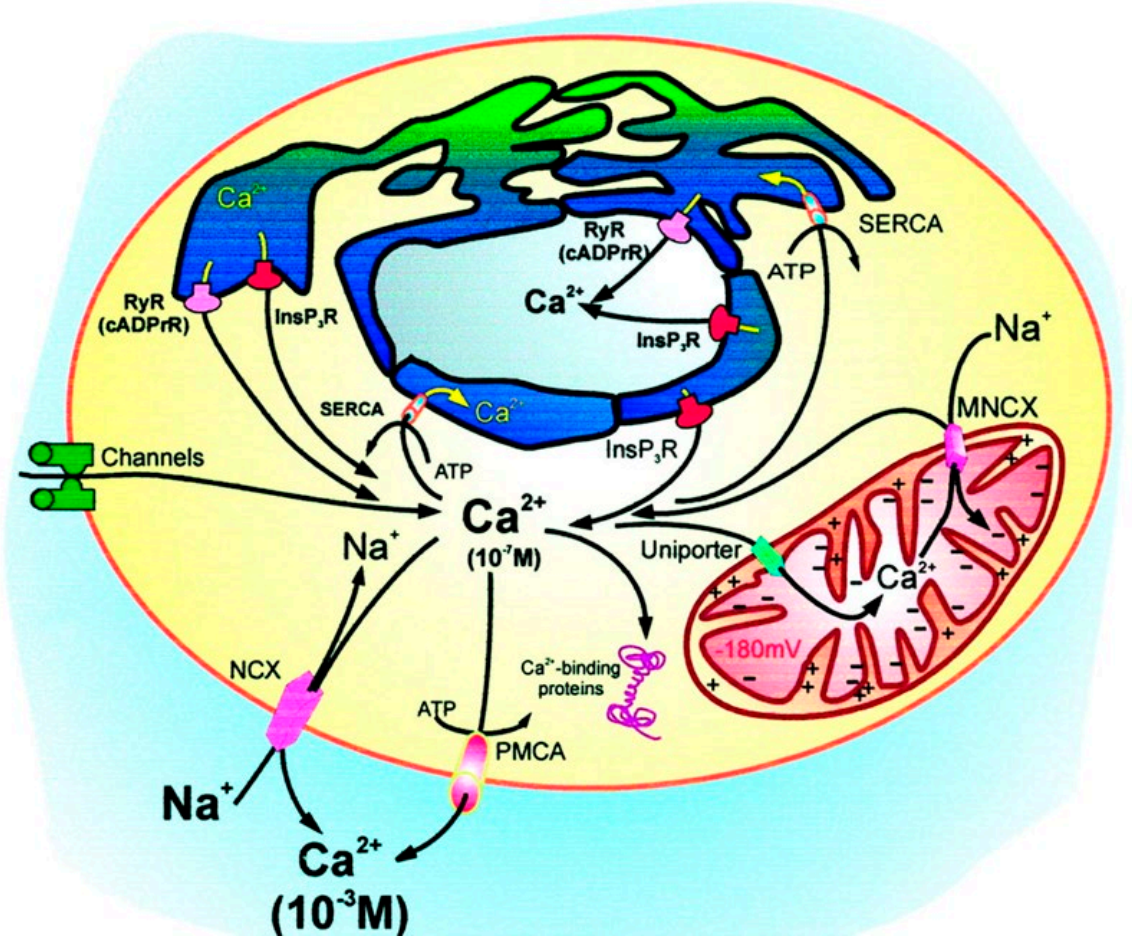


Рис. 2 Структуры клетки, задействованные в изменениях концентрации кальция.

Митохондриальный кальциевый унипортер (MCU)

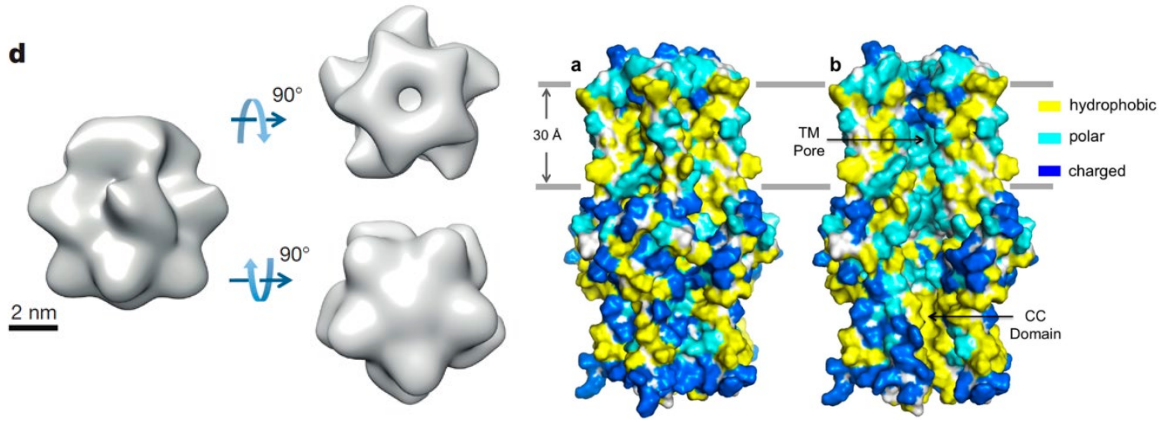


Рис. 3 Кальциевый унипортер митохондрии

Структура этого унипортера была довольно быстро определена в начале этого десятилетия, показана каналоподобная структура. Ингибируется соединением рутениевый красный. Белок способен пропускать кальций, когда его много. Для исследования роли митохондрий в кальциевом обмене удалось сделать трансгенную мышь с делецией по гену унипортера. Исследование проводилось в нескольких условиях, периодически добавляя некоторое кол-во кальция: 1) нормальное состояние митохондрий (кальций после добавления закачивался в митохондрии, после достижение определенного его количества, по-видимому, проницаемость мембран митохондрий нарушается и почти весь кальций выходит в цитоплазму) 2) унипортер ингибировался рутениевым красным (концентрация кальция в цитоплазме после добавления только увеличивается) 3) с делецированным геном унипортера (аналогично концентрация после добавления только увеличивается)

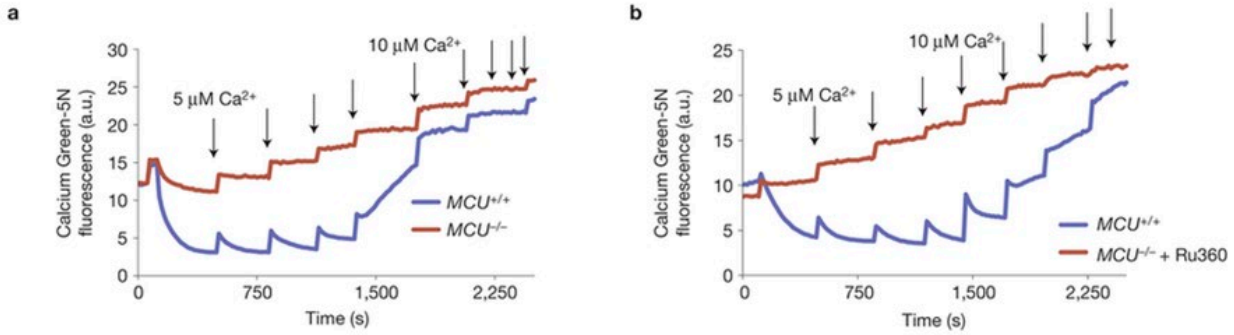


Рис. 4 Сравнение способности митохондрии удерживать кальций с рабочим и нерабочим унипортером

Мыши с нокаутным геном оказались жизнеспособны, фенотипические отличия от дикого типа – медленнее набирали весь и в итоге были меньше по размеру.

Все это указывает на тот факт, что в физиологический концентрациях кальций, поступающий в митохондрии, является «хорошим» и стимулирует синтез АТФ. Но при слишком больших концентрациях или других патологических стимулах кальций

приводит к генерации активных форм кислорода и программируемой клеточной гибели.

Свободнорадикальная теория старения.

Основоположником теории является американский ученый, биогеронтологист, Дэнхам Харман.

Основными пунктами теории были следующие утверждения:

- OH-радикалы, появляющиеся как побочный продукт процесса дыхания в митохондриях, являются главным вредоносным фактором, повреждающим биомолекулы клетки.
- Реакции свободных радикалов с ДНК приводят к повреждениям ДНК, мутациям и раку
- Одной из причин болезней сердца является повреждение свободными радикалами клеток кровеносной системы
- Повреждения, вызванные свободными радикалами, снижают жизнеспособность клетки и ее способность к самовосстановлению

В 1966 году Дженсен экспериментально показал, что основным источником радикалов является пероксид водорода, появляющийся при окислении сукцината и NADH в ходе дыхания; в 1974 году было показано, что супероксид также продуцируется митохондриями.

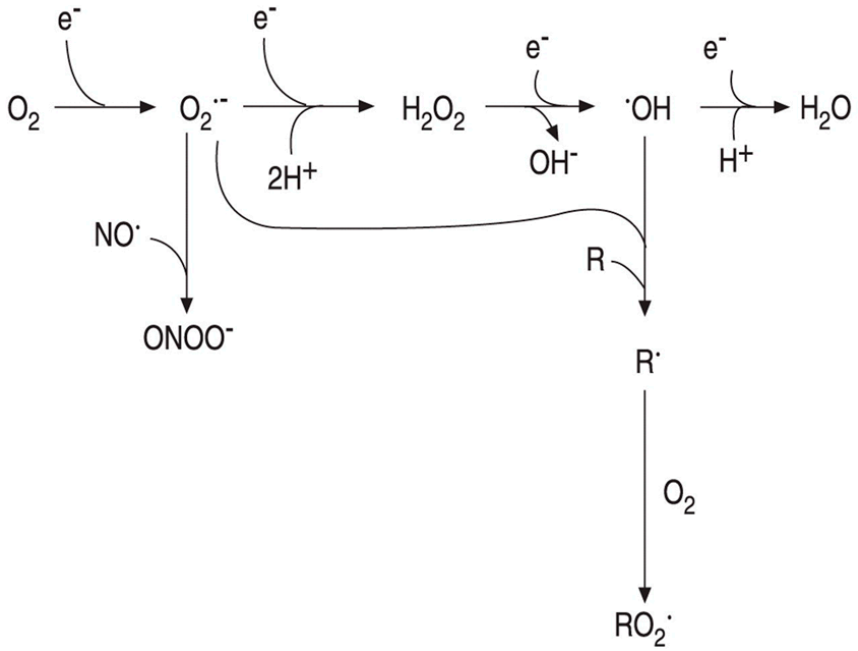


Рис. 5 Схема образования некоторых видов АФК

Супероксид – радикал анион, сильно реакциоспособен, за счет неустойчивой электронной конфигурации может легко принимать и отдавать электрон; если pH не сильно кислая, то из-за своего отрицательного заряда он не может проходит через мембрану, когда образовывается в митохондрии, следовательно не создает повреждений ДНК в ядре. Время жизни составляет микросекунды или меньше. Супероксид по большей части взаимодействует с липидами, легко-окисляемыми молекулами, но для белков относительно безвреден, за исключением металлов-кофакторов и аминокислоты цистеина

Перекись водорода – имеет большое время жизни, если вокруг нет веществ, которые должны ее нейтрализовать. Перекись водорода может проходить через мембраны почти также, как и вода. В нормальных условиях только одна аминокислота – цистеин – взаимодействует с перекисью (это может быть механизмом регуляции, в зависимости от расположения цистеина в белке, где он может быть более доступным к окислению и менее, так что белки могут быть разными по чувствительности к перекиси и соответственно меняют конфигурацию). Вторая мишень перекиси – ионы металлов (кофакторы). Попадание перекиси в клетку из окружающей среды или ее образование внутри является сигналов о каких-то процессах.

OH радикал – наиболее реакциоспособен, наименьшее время жизни. Этот радикал взаимодействует практический с любыми органическими молекулами, включая ДНК.

Источники свободных радикалов:

- Митохондрии: дыхательная цепь и некоторые белки матрикса. Важно отметить, что в нормальных условиях митохондрии не производят перекись, так как имеют специальные гасители для небольших количеств перекиси. *Ишемия-реперфузия:* когда ткань отрезается от доставки кислорода, его уровень падает, белки дыхательной цепи переходят в перевосстановленное состояние до тех пор, пока кислород не появляется вновь. В этот момент, т.к. появляется много восстановленных одноэлектронных кофакторов, есть большая вероятно переноса электрона на кислород с образованием АФК – происходит окислительный взрыв. В случае длительного периода ишемии он может быть значительным, и появление кислорода может вызвать больший стресс, чем сама ишемия. По этой причине в хирургии при операциях на сердце, когда требуется долгая остановка сердца, осуществляется прекондиционирование: останавливают сердце на небольшой промежуток времени, кислород падает, затем его снова запускают, но кофакторы не успевают перевосстановиться. В ответ на это клетки, получив небольшой окислительный стресс, начинают экспрессировать белки защиты. После проведения нескольких повторений этого процесса повреждений от длительной ишемии будет гораздо меньше.

- Цитоплазма: NADPH-оксидаза, цитохром p450 (класс белков, отвечающих за детоксификацию органических ядов) и ксантин-оксидоредуктаза.

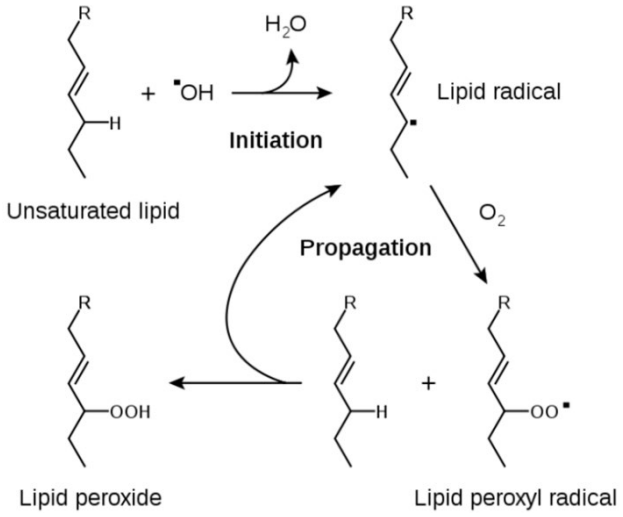
- Перекись водорода и супероксид-анион в присутствии ионов железа:

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{3+}} OH^- + {}^{\bullet}OH + O_2$$

Мишени свободных радикалов:

- Липиды (в особенности ненасыщенные). Окисляются быстро, может идти цепная реакция. Изменяется структура и текучесть мембран, нарушаются связи с мембранными белками.



- ДНК и хроматин (опасен радикал ОН, обычно репарация невозможна).
- Белки (опасны ОН радикал и супероксид анион; особенно для медленно или необновляющихся белков: коллаген, белки хрусталика глаза и т.д.)

Особенности митохондриальной ДНК:
- не защищена гистонами
- находится в непосредственной близости от источника активных форм кислорода
- при повреждениях репарируется менее эффективно по сравнению с ядерной ДНК
- содержит прямые повторы, что повышает вероятность делеций

Если в митохондрии начинают образовываться активные формы кислорода, то в первую очередь они наносят вред по самой митохондрии; это приводит к повреждениям мембраны, белков дыхательной цепи и мтДНК. Все это приводит к образованию еще большего количества АФК – это называется вызванный активными формами кислорода взрыв активных форм кислорода.

Если смотреть, как меняется экспрессия белков с возрастом, оказывается, что белки дыхательной цепи митохондрий в группу, где их экспрессия значительно снижается с возрастом (рис 6).

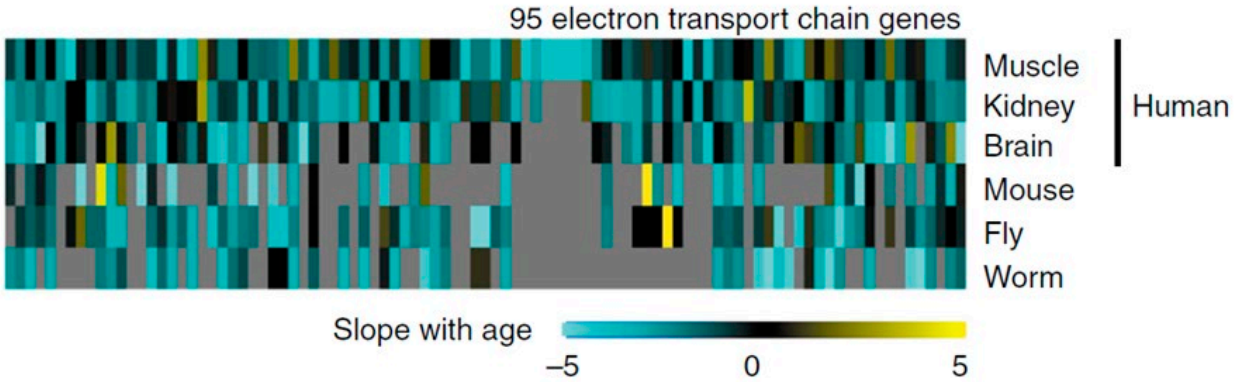


Рис. 6 Изменение экспрессии белков дыхательной цепи с возрастом

Также есть данные, что чем больше АФК генерируют митохондрии, тем меньше длительность жизни организмов, у которых брали образцы для исследований (одно из исключений – голый землекоп) (рис. 7).

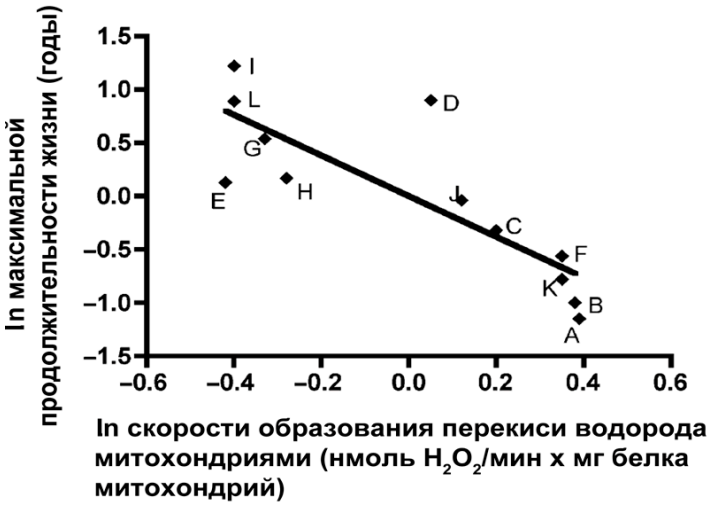


Рис. 7 Связь количества генерируемых АФК и длительности жизни организмов

Системы защиты от АФК

1. SOD – супероксид дисмутаза, один из самых «быстрых ферментов»

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

2. Каталаза

$$2H_2O_2 \xrightarrow[GPx]{Catalase} 2H_2O + O_2$$

3. GPx – глутатион пероксидаза.

4. Пероксиредоксины:

- Тиоловые пероксидазы; реагируют с пероксидами в 10^6 раз быстрее, чем свободный цистеин
- Восстанавливаются тиоредоксином, который в свою очередь восстанавливается глутатионом
- Составляют до 1% цитоплазматического белка
- При окислении второй пары цистеинов инактивируются необратимо, т.е. пероксиредоксиновая «плотина» может выдержать только ограниченное количество АФК.

5. Концентрация свободного железа поддерживается на низком уровне, чтобы избежать реакции Фентона

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$$

Плесневый греб P. Anserine имеет небольшую ограниченную продолжительность жизни. Если инактивировать ген цитохромоксидазы (Cox5), то продолжительность жизни гриба возрастает с 25 дней до более чем 540, при этом снижается кол-во АФК и уменьшается выраженность признаков старения.

Возникает вопрос, в чем причина. Одна из популярных гипотез заключается в том, что в течение жизни в мтДНК накапливаются повреждения, не подвергающиеся репарации. В одной из исследовательских работ была исследована ДНК полимераза-гамма мыши (ядерно кодируемый белок, реплицирует мтДНК), при этом в ней испортили proof-reading домен. При этом значительно увеличивается кол-во ошибок при репликации мтДНК, и оказалось, что гомозиготные мыши с мутантной полимеразой быстрее стареют и умирают (рис. 8).

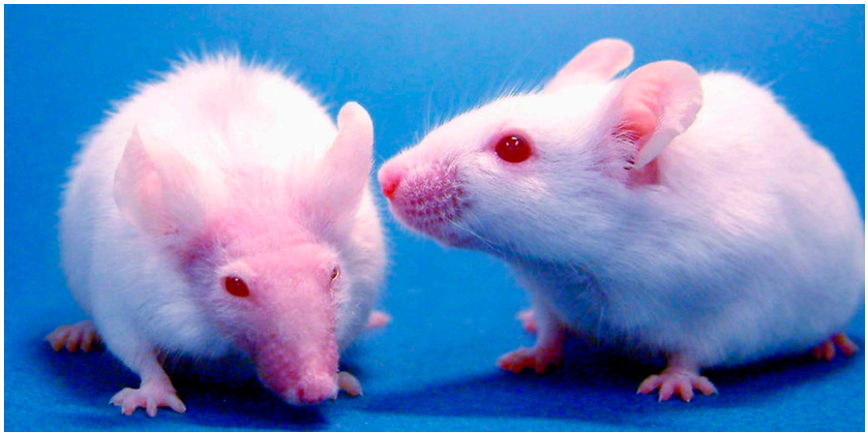


Рис. 8 Слева – мышь с мутантной полимеразой, справа – мышь дикого типа.

В другой работе создали мышей не гомозиготных по данной мутации, а гетерозиготных, и оказалось, что по признакам старения они не отличаются от мышей дикого типа, хотя уже при рождении их мтДНК несла в 30 раз большей мутаций, чем у самых старых мышей дикого типа.

Итого:

1.АФК, генерируемые митохондриями, вероятно, играют важную роль в процессе старения ряда живых организмов.

2. Однако в норме окислительное повреждение биомолекул (в том числе мтДНК) само по себе не является причиной старения.

3. Повреждения ДНК (в том числе из-за повышенного уровня АФК) могут привести к мутациям и раку

4. АФК-индуцированная (и не только!) программируемая клеточная гибель, в которой митохондрии играют ключевую роль, является важным уровнем противораковой защиты организма. Связь АФК и старения имеет промежуточное звено в виде промежуточной клеточной гибели. Большое кол-во АФК приводит к клеточной гибели, что с возрастом приводит к уменьшению клеток организма, из-за чего органы хуже справляются с нагрузкой – один из аспектов старения.

Лекция 9

Апоптоз – особый морфологически отличающийся от других тип регулируемой клеточной смерти. Фундаментальный процесс, обеспечивающий нормальное развитие организмов, поддержание клеточности тканей, селекцию иммунокомпетентных клеток и элиминацию поврежденных, трансформированных и инфицированных клеток.

История изучения апоптоза

Первое упоминание клеточной смерти у жаб встречается в работах знаменитого немецкого биолога Карла Фохта. Далее в 1964 году Ричард Локшин под руководством Кэррола Уилльямса исследовал клеточную смерть на куколках американского шелкопряда, и они ввели термин программируемая гибель клеток для обозначения клеток, которые погибают в процессе развития. В 1972 году Джон Керр с коллегами, изучавшие смерть клеток печени при различных патологиях, увидели много сходного между исследованными случаями программируемой гибели клеток (отличавшейся от также уже известного тогда некроза) у разных организмов и предложили термин «апоптоз». Они предположили, что протекание этого процесса подразумевает наличие некоторой внутренней программы, запускаемой физиологическими и патофизиологическими стимулами. Они описали подробно этапы апоптоза и выделили два основных этапа (рис. 1): собственно гибель клеток и фагоцитоз того, что от них осталось, профессиональными фагоцитами или клетками окружающей ткани.

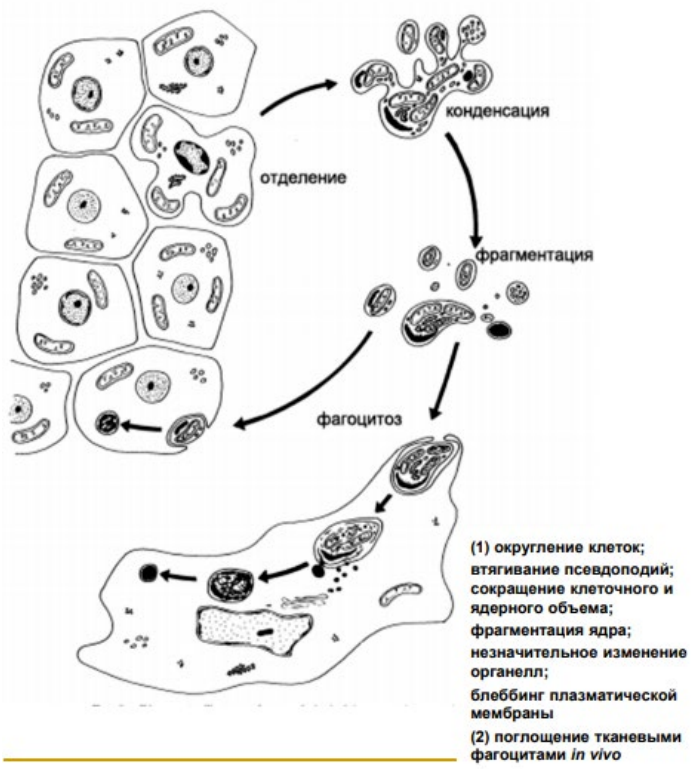


Рис. 1 Основные этапы апоптоза

Было сделано предположение относительно функций апоптоза: о его участии в эмбриогенезе, противоопухолевом иммунитете, а также о его роли во многих патофизиологических процессах, таких как атрофии тканей и органов.

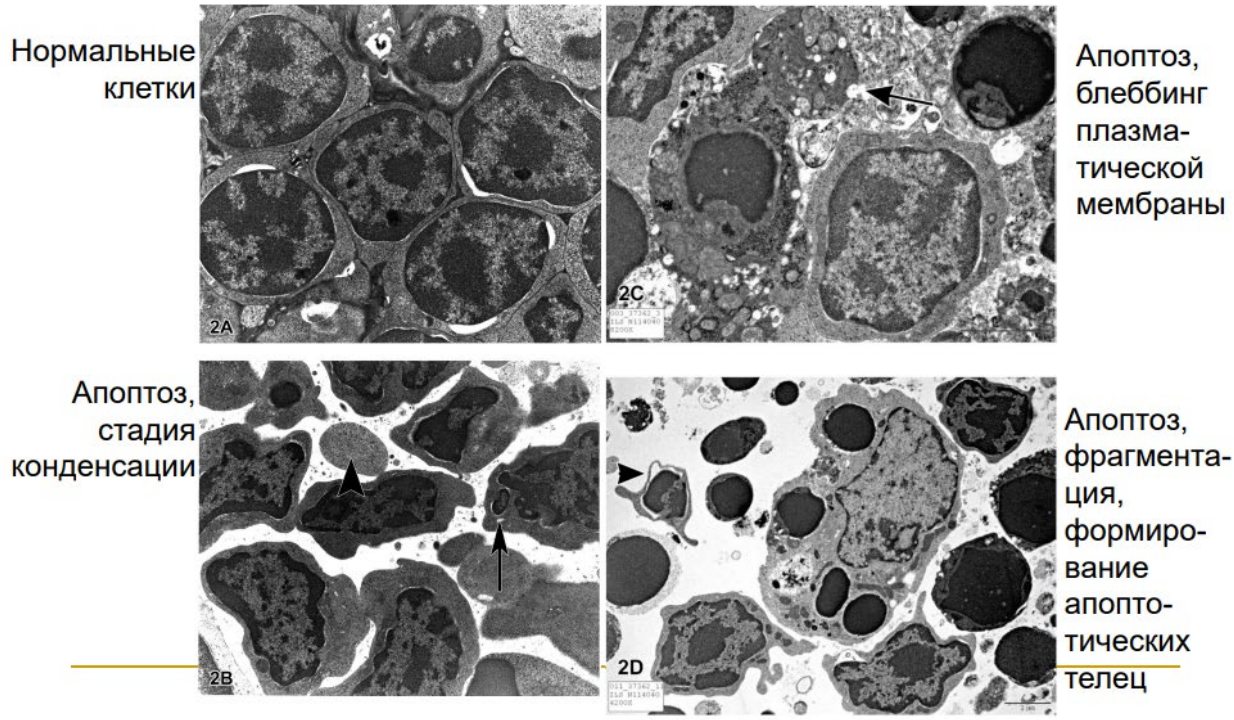


Рис. 2 Электронно-трансмиссионные микрофотографии ультраструктуры тимуса.

Затем уже в 90е годы началось исследование молекулярных процессов апоптоза. Началось это с работ Роберта Хорвица и его коллег, исследовавших клеточную смерть на нематодах C. elegans. Эти нематоды являются удобным модельным объектом, т.к. вскоре после оплодотворения происходит практически одномоментная гибель большого количества клеток, их гибель хорошо видна и ее фиксации не требует какого-то сложного оборудования. В 90е уже были известны методы нокаутирования генов, поэтому удалось идентифицировать ряд белков и генов, вовлеченных в апоптоз.

Ядро программы апоптоза согласно Р. Хорвицу:
EGL-1 ----- CED-9 ----- CED-4 ----- CED-3

Потом были обнаружены соответствующие гены-аналоги у млекопитающих:

EGL-1 – BH3 белок семейства BCL-2
CED-9 – BCL-2–подобный белок
CED-4 – APAF-подобный белок
CED-3 – каспаза

Исследования молекулярных механизмов апоптоза повлекли за собой стремительное обнаружение новых типов регулируемой клеточной смерти и исследование их молекулярных механизмов (рис. 3)

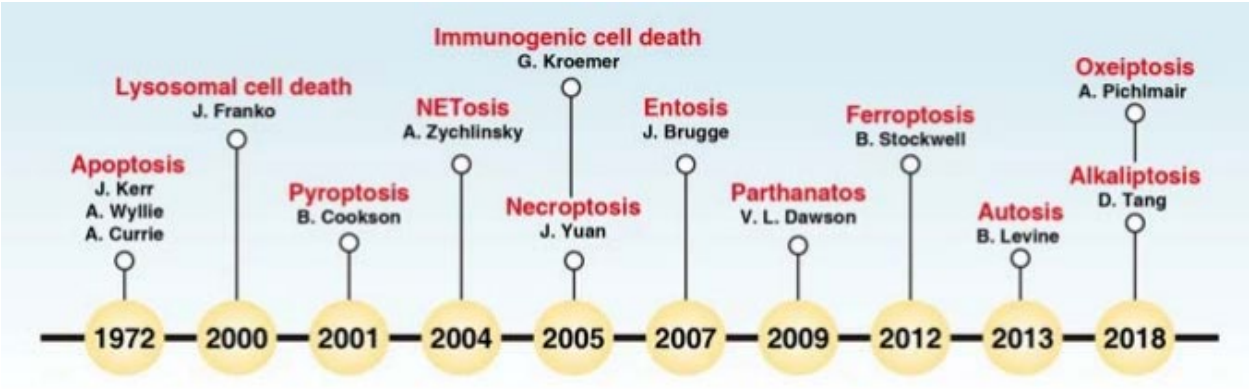


Рис. 3 История открытия новых типов регулируемой клеточной смерти

О классификации клеточных смертей.

Апоптоз долгое время называли также «клеточный суицид» и «программируемая клеточная смерть» противопоставляя его некрозу, который изначально считался не регулируемым процессом.

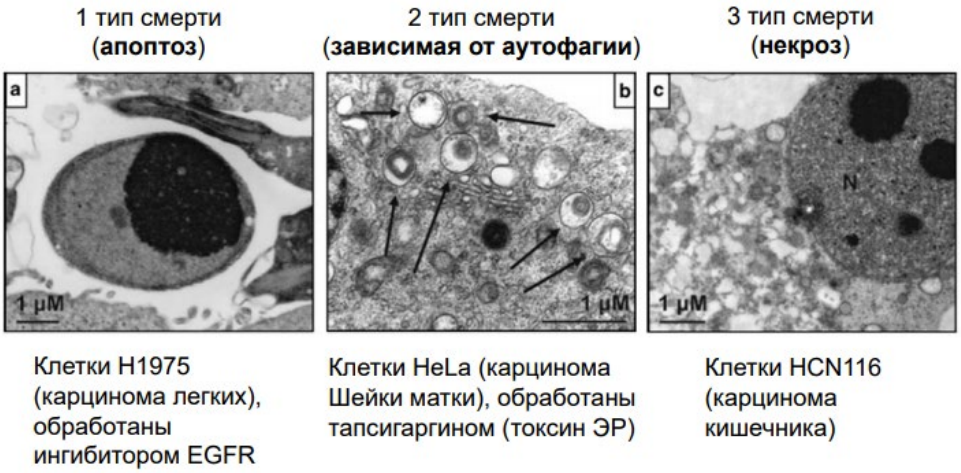


Рис. 4 Ранняя классификация, предложенная в 1973

В настоящее время сформирован комитет - NCCD - Nomenclature Committee on Cell Death – который обновляет классификацию типов клеточной смерти; с 2005 года вышло 5 публикаций, последняя - в 2018 году. Принято разделять клеточные смерти на регулируемые и случайные. Случайная гибель – нерегулируемая, может быть вызвана повреждениями. Регулируемая клеточная гибель (Regulated Cell Death, RCD) - RCD включает точные сигнальные каскады, выполняется набором определенных эффекторных молекул и имеет уникальные биохимические, функциональные и иммунологические последствия. RCD также известная как Programmed Cell Death (PCD), когда onf возникает в физиологических условиях.
На основании своих молекулярных характеристик RCD можно классифицировать на несколько подпрограмм (рис. 5), некоторые из которых имеют четкое физиологическое значение (например, некроптоз и пироптоз, которые наблюдаются во время развития и /

или в контексте вирусных инфекций), в то время как другие (такие как ферроптоз, гибель энтотических клеток, гибель нетотических клеток, партанатоз, гибель клеток, зависимая от лизосом, гибель клеток, зависимая от аутофагии, алкалиптоз и оксеиптоз) менее изучены и могут фактически быть ограниченными клеточными ответами на конкретные токсины, которые не отражают нормальную физиологию.
NCCD придерживаются точки зрения, что гибель клеток включает в себя своего рода «регуляцию» (и может называться RCD), если конкретные генетические или фармакологические манипуляции способны прервать разрушение клеток, вызывающее летальный каскад, в ответ на внешние раздражители.

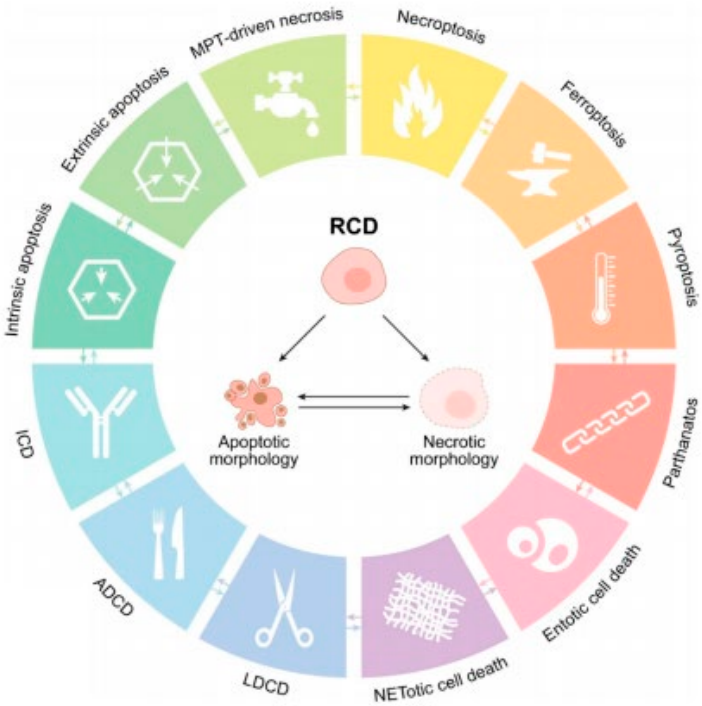


Рис. 5 Виды клеточной гибели

Механизмы апоптоза.

В большинстве случаев в основе молекулярного механизма апоптоза лежит протеолитическое расщепления белков клетки каспазами.
Каспазы (cysteine-dependent aspartatespecific protease) образуют протеолитические каскады и, таким образом, передают различные сигналы (клеточной смерти, а также развития, воспаления, иммунного ответа)

На сегодняшний день выделяют четыре большие группы каспаз:

- Инициаторные (CASP2, CASP8, CASP9 и CASP10); в мышином геноме нет CASP10
- Эффекторные (CASP3, CASP6 и CASP7)

- Воспалительные (CASP1, CASP4, CASP5, CASP11 и CASP12); человеческие CASP4 и CASP5 – функциональные ортологи мышиных CASP11 и CASP12
- Связанная с кератинизацией (CASP14)

Соответственно регулируемая клеточная смерть может быть:

- Каспаз-зависимая (например, апоптоз, пироптоз)
- Каспаз-независимая (например, некроптоз, ферроптоз, партанатоз, алкалиптоз, оксеиптоз)

Активация каспаз.

Существуют инициаторные и эффекторные каспазы (рис. 6). У инициаторных каспаз есть продомен для связывания «платформ», на которых они активируются, а так же есть большая и малая субъединицы. Неактивные инициаторные каспазы являются мономерами; при их активации происходит димеризация или мультимеризация, и затем может происходит их расщепление. Эффекторные каспазы в неактивном состоянии всегда являются димерами, и именно их расщепление является необходимым условием их активации.

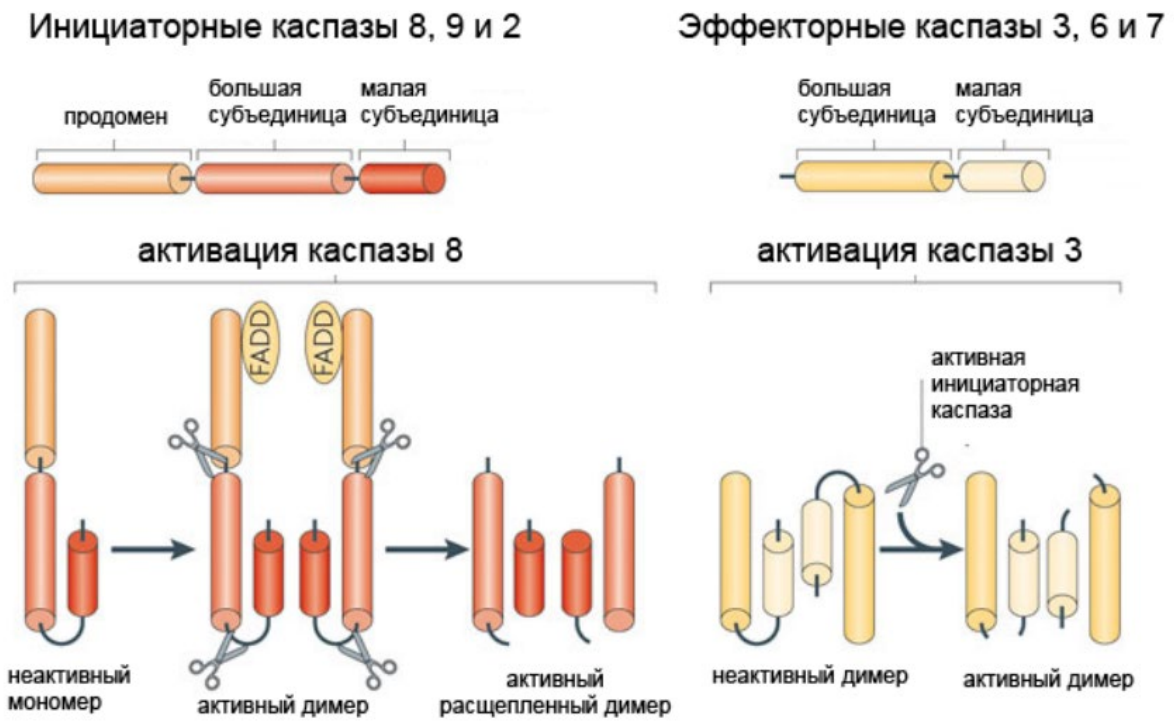


Рис. 6 Инициаторные и эффекторные каспазы

Внутренний сигнальный путь активации апоптоза.

Всего выделяют три пути активации апоптоза: 1 и 2 внешние пути и внутренний. С митохондриями связана активация внутреннего пути.

Митохондрии выполняют роль «контрольно-пропускного пункта» апоптотического сигнала. Они принимают сигналы от различных поверхностных рецепторов, рецепторов смерти, сигналы повреждений ДНК, различных стрессов, обратных сигналов от эффекторных каспаз, и после обработки информации принимается решение о выходе про-апоптотических белков из межмембранного пространства митохондрии.

Что это за белки? Первым белком, индуцирующим апоптоз, оказался цитохром С (белок митохондриальной дыхательной цепи). Он связывается с присутствующим в цитоплазме белком APAF (рис. 7).

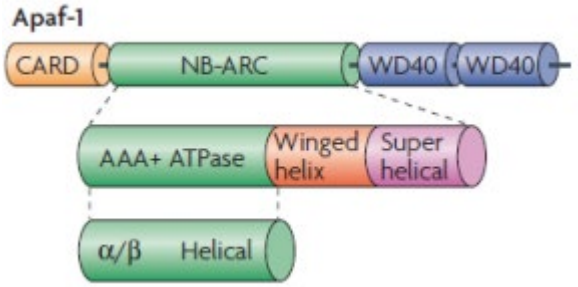


Рис. 7 Строение белка APAF

Белок APAF состоит из нескольких доменов. Есть домен CARD (CAspase-Recruitment Domain) связывает каспазу, домен, связывающий цитохром С и домен, обладающий АТФазной активностью. В норме APAF в клетке присутствует в виде закрытой формы, а присоединение цитохрома С приводит к гидролизу АТФ и формированию частично открытой формы, затем происходит обмен (д)АДФ с (д)АТФ и образование мультимеризованной структуры – апоптосомы (домены CARD направлены внутрь), к которой присоединяются 17 молекул прокаспазы 9, которые там и активируются. Каспаза 9 активирует прокаспазу 3, и каспаза 3 является эффекторной и расщепляет свои субстраты.

Одним из субстратов каспазы 3 является каспаз-зависимая ДНКаза (DFF40), которую она расщепляет, образуется активный димер, и он в свою очередь способен фрагментировать ДНК на большие и маленькие фрагменты.

Какие еще белки выходят из межмембранного пространства митохондрии? На самом деле их довольно много, но функции хорошо охарактеризованы только для некоторых из них. Эндонуклеаза G (действует как DFF40) и AIF (Apoptosis Inducing Factor) – белки, вызывающие фрагментацию хроматина независимо от каспаз. AIF индуцирует только крупноразмерную (50Kb), но не нуклеосомную фрагментацию ДНК и конденсацию, но не фрагментацию хроматина. Smac/Diablo и Omi/HtrA2 – белки, ингибирующие белки семейства IAP (ингибиторы каспаз).

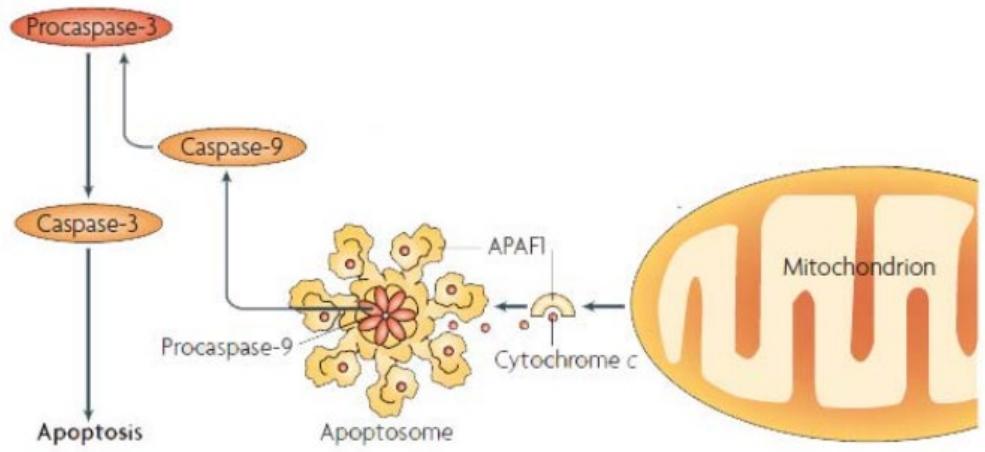


Рис. 8 Схема работы каспаз

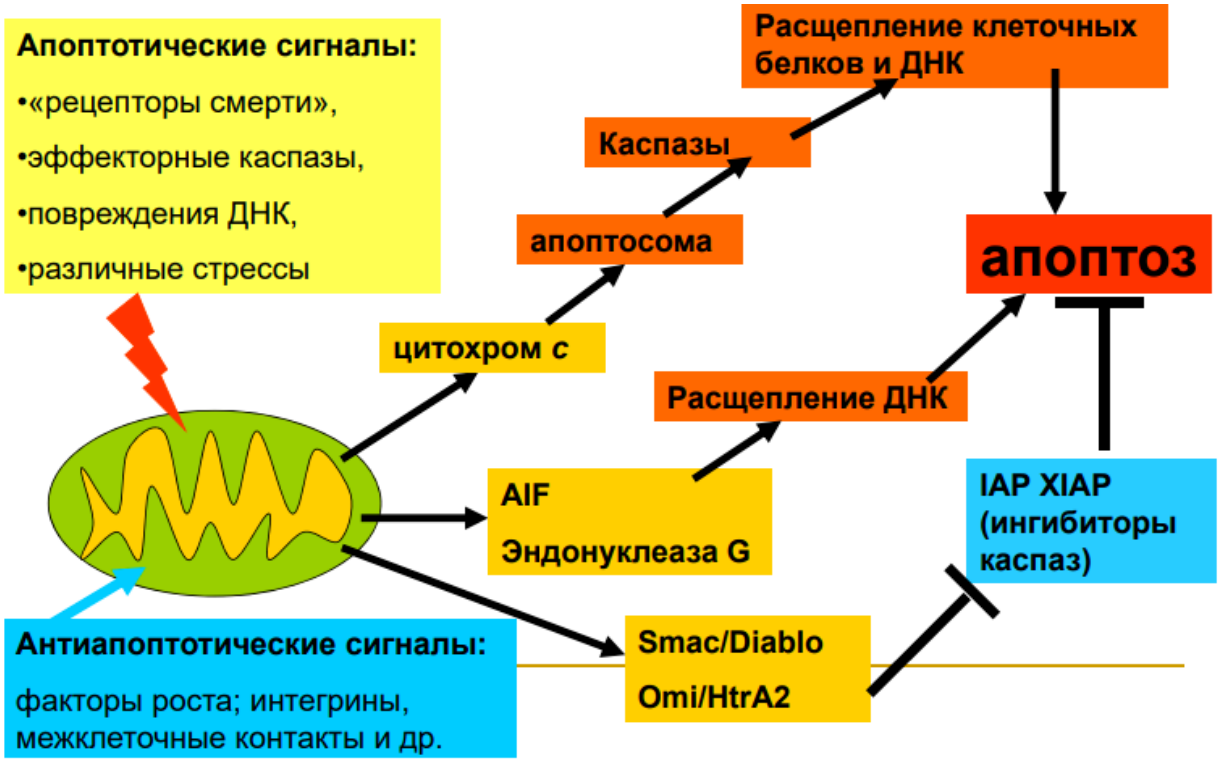


Рис. 9 Схема митохондриального пути активации.

Регуляция выхода про-апоптотических белков из митохондрии:

1. Регуляция открепления цитохрома с и AIF от внутренней мембраны митохондрий
2. Регуляция прохождения белков через внешнюю мембрану митохондрий
3. Реорганизация структуры митохондрий

1. (а) Открепление цитохрома С от внутренней мембраны митохондрий зависит от АФК

Цитохром С утоплен во внутреннюю мембрану митохондрии. Окисление кардиолипина с помощью активных форм кислорода приводит сначала к ослаблению взаимодействия цитохрома С с мембраной, а затем и к полному отсоединению белка с поверхности; в свою очередь свободный цитохром С начинает работать как оксидаза кардиолипина, т.е. наблюдается положительная обратная связь (рис.10). Пока что недостаточно исследовано, насколько этот механизм важен для апоптоза, т.к. и в норме в митохондрии присутствует достаточное кол-во свободного цитохрома С.

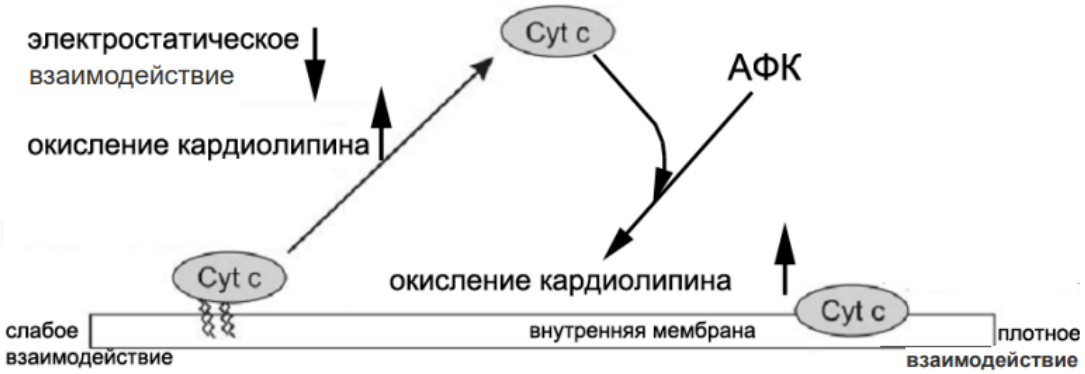


Рис. 10 Открепление цитохрома С от внутренней мембраны

1. (б) Отделение AIF от внутренней мембраны митохондрий регулируется Ca2+ и АФК

Белок AIF является трансмембранным белком, связан с внутренней мембран митохондрии, у него есть сайт окисления и сайт расщепления Ca-зависимой протеазой калпаином 1, причем расщепление происходит быстрее, если сайт окисления окислен. После расщепления белок может выйти наружу (рис. 11).

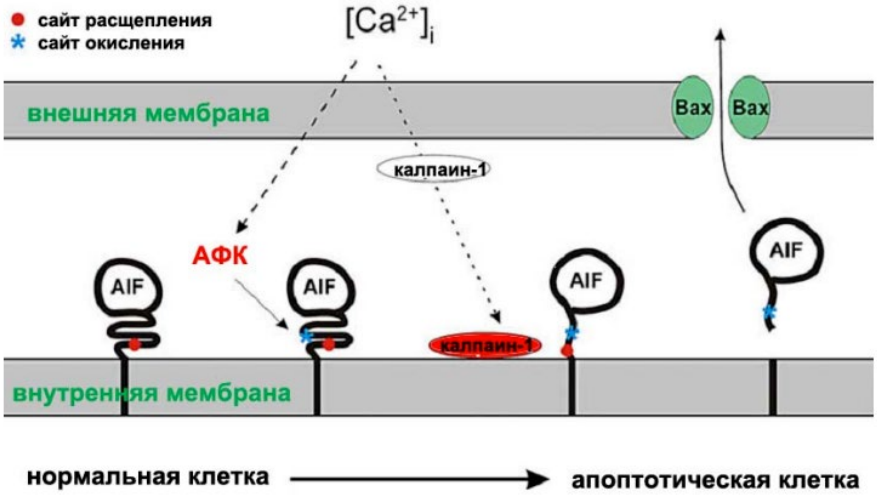


Рис. 11 Отделение AIF от внутренней мембраны

2. Регуляция прохождения белков через внешнюю мембрану митохондрий.

Существует две основные модели, объясняющие выход белков из межмембранного пространства митохондрий.

Согласно первой модели в митохондрии происходит образование пор во внутренней мембране, набухание митохондриального матрикса, и, т.к. в митохондрии большая концентрация белков и солей, разрыв внешней мембраны.

Другая модель связана с формированием пор во внешней мембране, через который проходят проапоптотические белки, и не происходит разрыва митохондрии.

Мегапора (PTP) – это довольно большой комплекс переменного состава; основным элементом является VDAC во внешней мембране митохондрии и ANT во внутренней. VDAC связан с бензодиазепиновым рецептором, ANT – с циклофилином Д. Через такую поры могут проходить небольшие молекулы размером менее 1,5 кДА. Индуцируется открытие поры целым набором внутренних стимулов, среди которых есть проапоптотический белок Bax, АФК, Ca2+ и др.

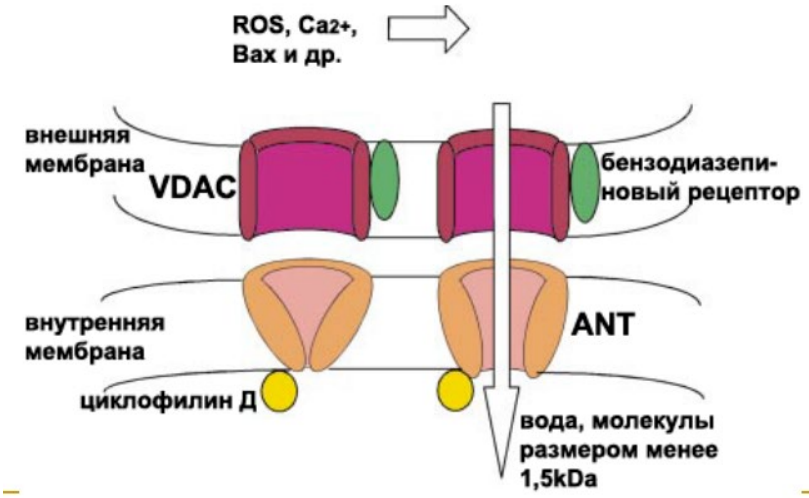


Рис. 12 Мегапора

Поры внешней мембраны.

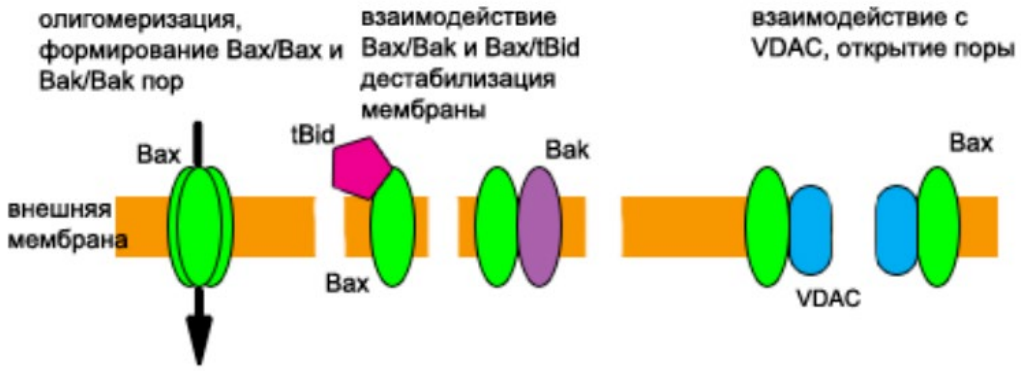


Рис. 13 Возможные механизмы обеспечения проницаемости внешней мембраны Bax/Bak и Bax/tBid

Двойной нокаут Bax и Bak (но не каждого по отдельности) приводит к устойчивости клеток к индукции апоптоза многими «внутренними» стимулами. Исключение составляют случаи направленного воздействия на компоненты PTP.

Белки семейства BCL-2 регулируют проницаемость внешней мембраны митохондрий (рис.14).

Bax и Bak (проапототические) формируют каналы и могут взаимодействовать с другими типами белков Bcl2. Есть BH3 белки, которые являются активирующими (Bim, Bid) и помогают созданию поры. Bcl-XL, Mcl-I (антиапоптотические) взаимодействуют с Bax/Bak и препятствуют формированию поры, и при этом ингибируются вспомогательными BH3 (Bad, Hrk, Bmf, NOXA, Bik). И проапоптотические, и антиапоптотические белки могут взаимодействовать с элементами пор.

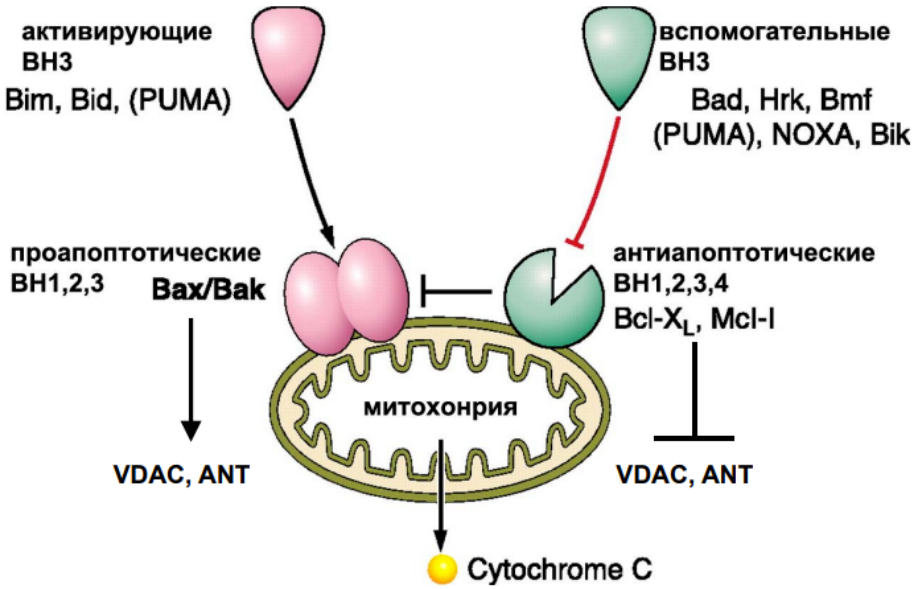


Рис. 14 Регулирующие факторы

Механизмы регуляции функциональной активности белков семейства BCL-2:

- Транскрипция
- Димеризация и взаимодействие с другими белками
- Транслокация в митохондрии
- Фосфорилирование, расщепление и другие пост-трансляционные модификации

> *Примеры регуляции транскрипции генов белков семейства BCL-2*
>
> P53 способен подавлять транскрипцию BCL-2
> P53 способен стимулировать транскрипцию Bax, NOXA, PUMA
> FOXO3A способен стимулировать транскрипцию BIM и PUMA
> NFkB способен стимулировать транскрипцию BCL-2

3. Реорганизация структуры митохондрий.

Во время апоптоза происходит дробление митохондриального ретикулума и выход цитохрома с из него (рис. 15, 16).

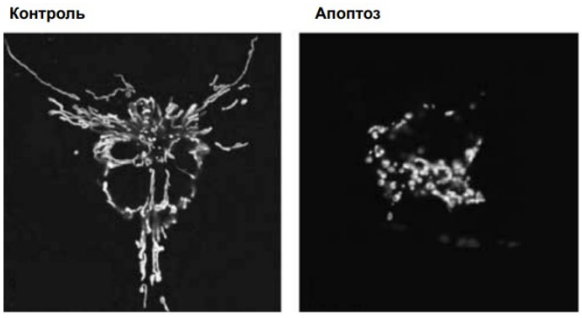


Рис. 15 Дробление митохондриального ретикулума на начальных стадиях апоптоза.

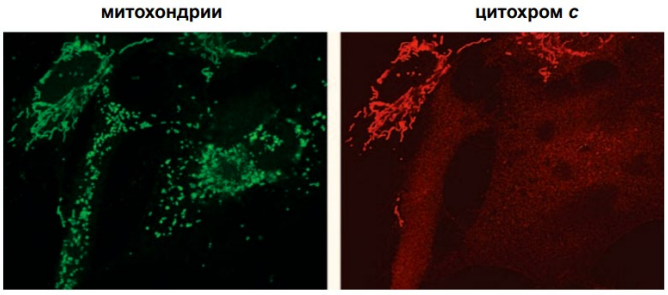


Рис. 16 Выход цитохрома С

Кроме этого, дробление стимулируется разными способами, в т.ч. за счет повышения экспрессии Bax и Bak, а tBid индуцирует перестройку крист. Повышенная экспрессия Bcl-2 приводит к увеличению размеров и интеграции митохондриального ретикулума. Оверэкспрессия Bcl-2 блокирует дробление митохондрий и апоптоз, вызванные подавлением экспрессии Opa1 – это ведет к подавлению апоптоза.

Bax и Bak колокализуются и коприцепетируются с белками, отвечающими за дробление митохондрий, Drp1, Mfn и Bif-1

Как связаны MOMP и дробление митохондрий?

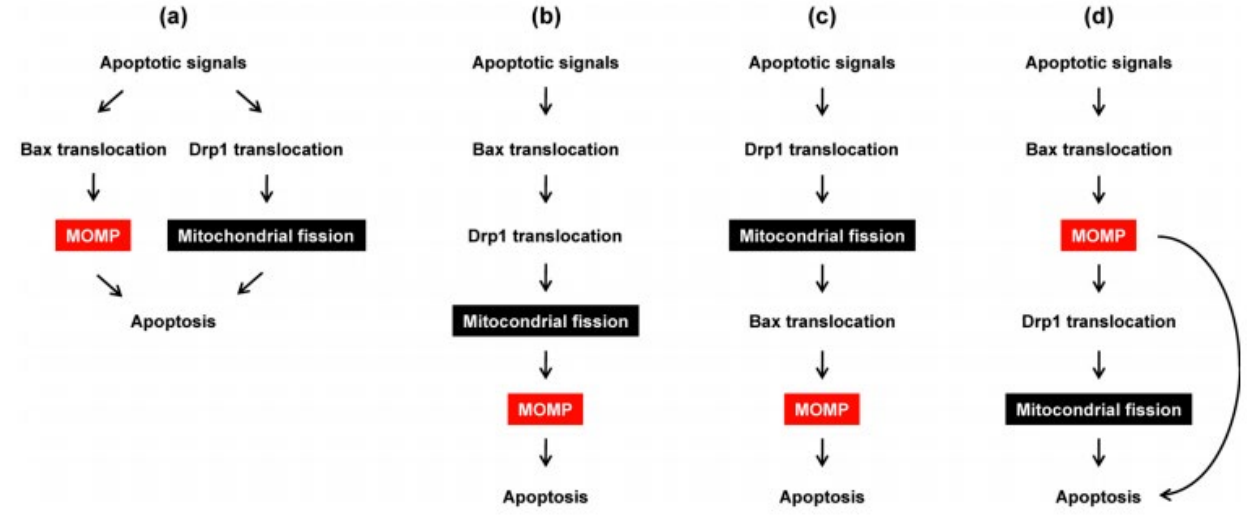


Рис. 17 Теории связи MOMP и дробления митохондрий

Существует несколько предположений. (a) – процессы формирования поры во внешней мембране и дробления – два независимых процесса, совместно приводящих к апоптозу. (b) – переселение Bax способствует транслокации Drp1, дроблению митохондрий, и это

приводит к образованию пор. (c) – наоборот, дробление приводит к транслокации Bax и соответствующему образованию пор. (d) – формирование каналов во внешней мембране способствует как дроблению, так и апоптозу.

Помимо дробления во время апоптоза происходит **перестройка крист**.

Например, из клеток мышей выделены митохондрии двух типов (1 тип – составляет в норме 75-85% от общего количества, 2 тип – 12-20%) (рис. 18). При обработке с помощью tBid количество 1 типа уменьшается до 30-35%, 2 типа увеличивается до 60%. Перестройка крист при апоптозе может быть индуцирована tBid независимо от взаимодействия tBid и BAX. Перестройка крист при апоптозе регулируется белком OPA1 независимо от слияния митохондрий.

С чем это связано? Было показано, что основание крист может «раскрываться», и тогда цитохром С будет выходить из крист в межмембранное пространство(рис.18). На сегодняшний день известно как минимум три комплекса, регулирующих состояние структуры крист (рис. 19). Во-первых, это АТФ-синтаза, находящаяся на концах крист и обеспечивающая кривизну мембраны. Комплекс MICOS локализуется в основании кристы, обеспечивает изгиб, формирует «контакт кристы» в основании, может взаимодействовать с белками внешней мембраны. OPA-1 также формирует контакты в основании кристы.

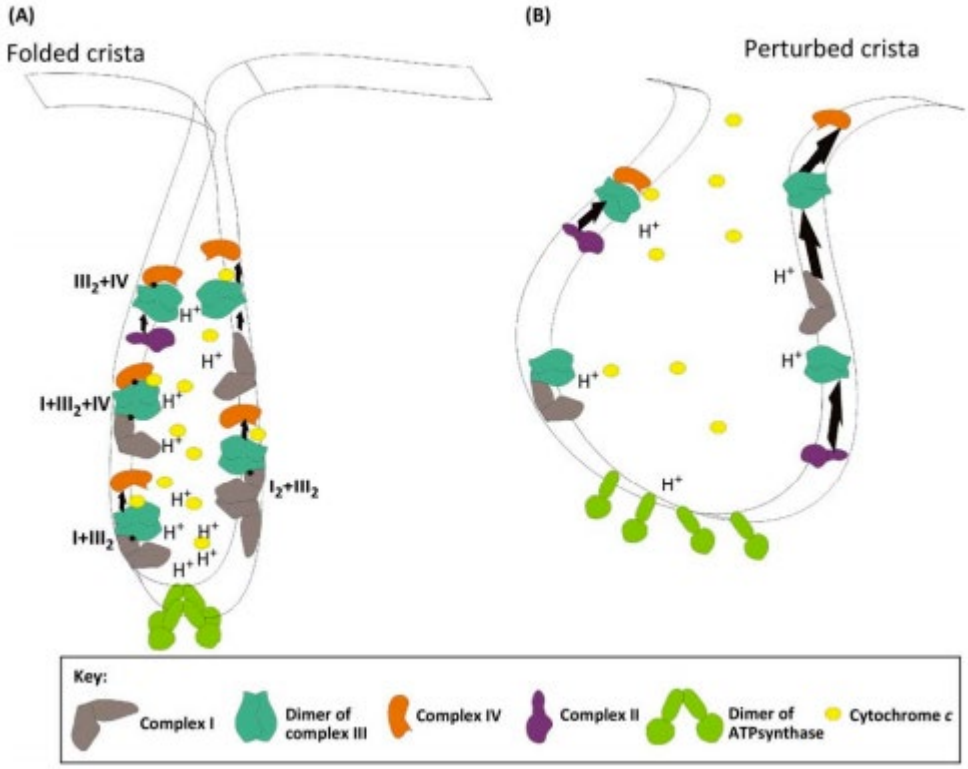


Рис. 18 Белковые комплексы крист и модификации кристы

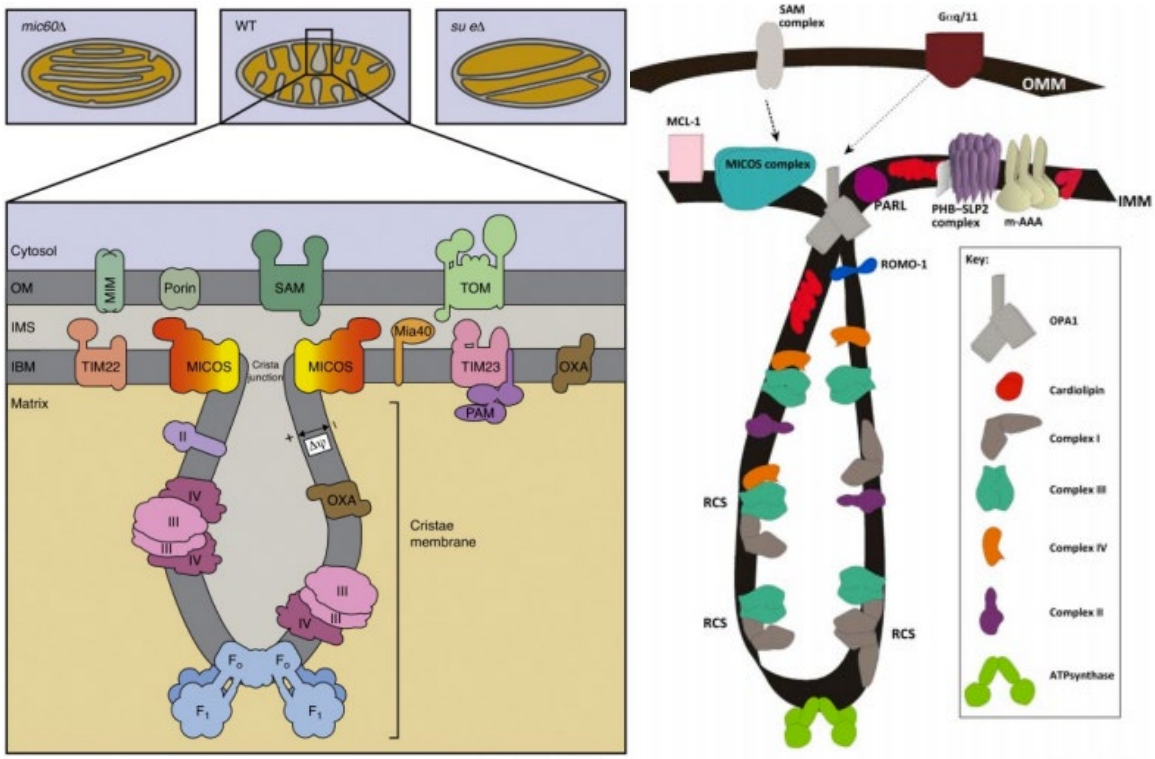


Рис. 19 Белковые комплексы крист

Лекция 10

История изучения врожденного иммунитета.

И.И. Мечников (1845-1916гг) первым открыл фагоцитарный иммунитет (в 1875г). Более чем через 100 лет, благодаря усилиям Чарльза А. Дженуэя (1943-2003гг) и Руслана Меджитова стали известны рецепторы, узнающие «паттерны» патогенов. В отличие от адаптивного иммунитета этих паттернов не очень много, порядка сотен.

Основные особенности врожденного иммунитета:

1) во-первых, это очень древний механизм, предполагается, что некоторым рецепторам около 500 миллионов лет
2) это быстрый ответ, не требуется время для выработки антител
3) стратегия распознавания – всего обычно около 10-100 рецепторов, узнающих «паттерны»
4) отсутствие иммунной памяти

Стоит напомнить некоторые **факты о митохондриях:** это двумембранные органеллы, по большей части в нормальных условиях образуют митохондриальный ретикулум, основной функцией является переработка различных питательных субстратов с получением АТФ в процессе окислительного фосфорилирования (рис. 1).

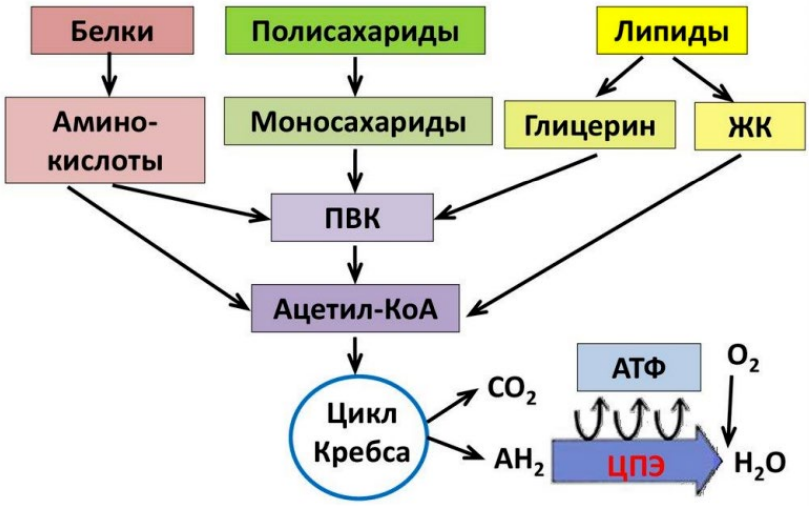


Рис. 1 Катаболизм митохондрий

Также вскоре нам понадобится **цикл Кребса** (рис. 2), так что вспомним его суть: пируват ацетилируется с помощью ацетилкоэнзима А, получается щавелевоуксусная кислота, которая затем превращается в цитрат, и далее в цикле он преобразуется обратно до щавелевоуксусной кислоты, при этом образуются CO2, ГТФ и НАДН. Собственно восстановленный НАДН поступает в **дыхательную цепь митохондрии**, где происходит окислительное фосфорилирование (рис. 3), в ходе которого электроны переносятся на кислород с образованием воды, и создается протонный электрохимический градиент (прямой перенос электронов). Снаружи внутренняя

мембрана положительнее заряжена, а матрикс более щелочной. В определенных условиях (высокий потенциал, наличие достаточного кол-ва сукцината) может идти обратный перенос электронов: электроны с сукцината восстанавливают коэнзим Q, который через первый комплекс восстанавливает НАД+.

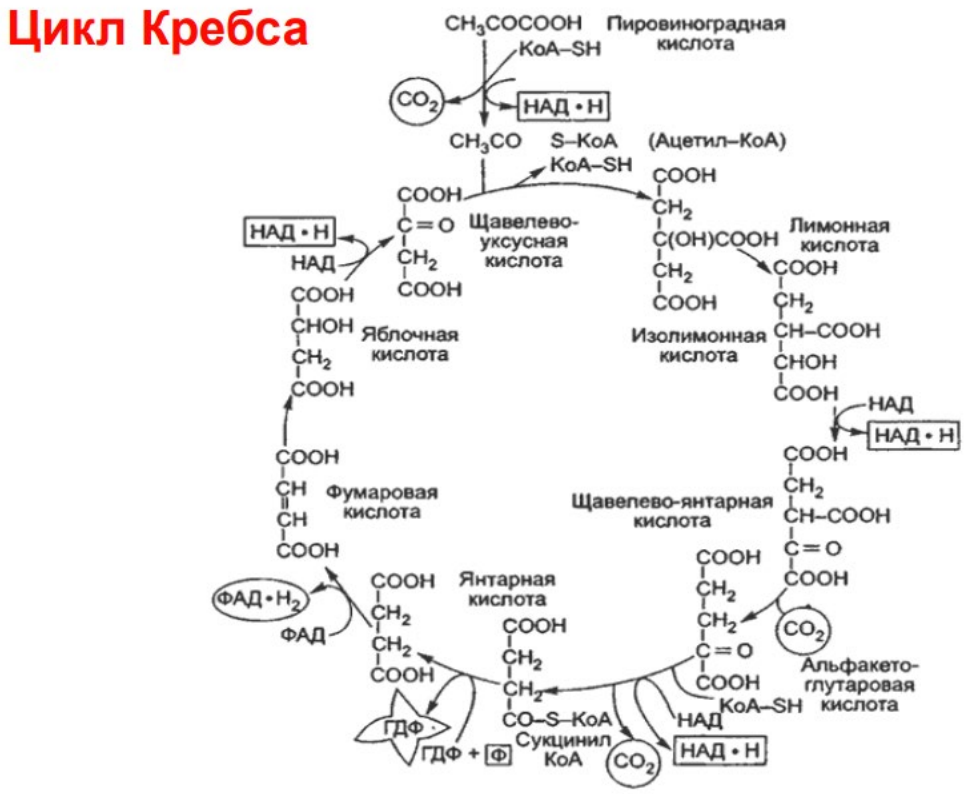


Рис. 2 Цикл Кребса

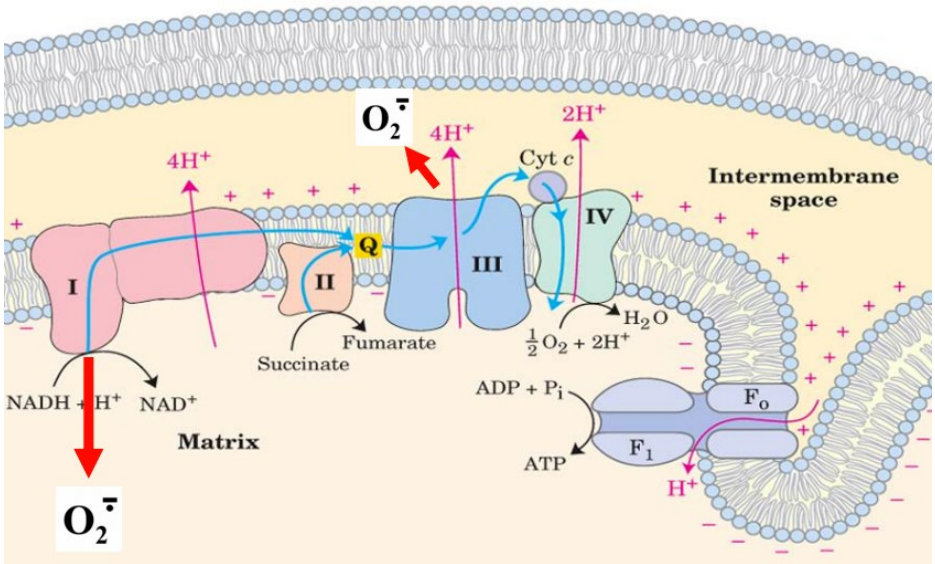


Рис. 3 Дыхательная цепь митохондрии

Активные формы кислорода

На 3м и 1м комплексе дыхательной цепи могут образовываться **активные формы кислорода** – супероксид-анион-радикал. Далее он может превращаться в другие АФК (рис.4). Это может быть дисмутация с образованием перекиси; он может протонироваться и образовывать сильный окислитель – протонированный супероксид; при взаимодействии с NO может образовывать пероксинитрит. Перекись с участием ионов металлов в реакции Фентона может образовывать гидроксил-радикал, который также является мощным окисляющим агентом.

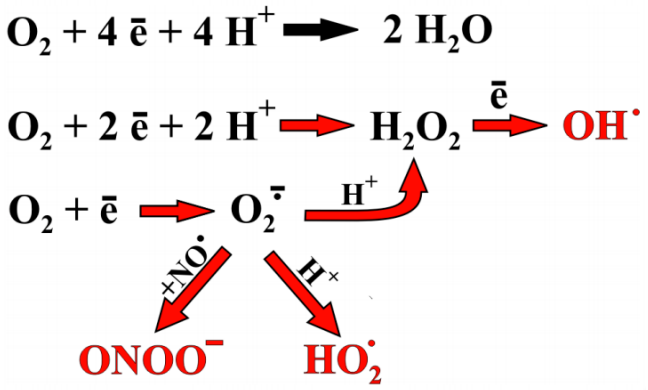


Рис. 4 Образование АФК (активные формы кислорода, Reactive Oxygen Species, ROS)

Основными мишенями этих АФК-окислителей являются липиды. Процесс окисления представляет собой цепную реакцию (рис. 5), в ходе которой образуются последовательно липидный радикал и пероксидный радикал, и затем круг замыкается. Процесс может приводить к значительным повреждениям липидной мембраны.

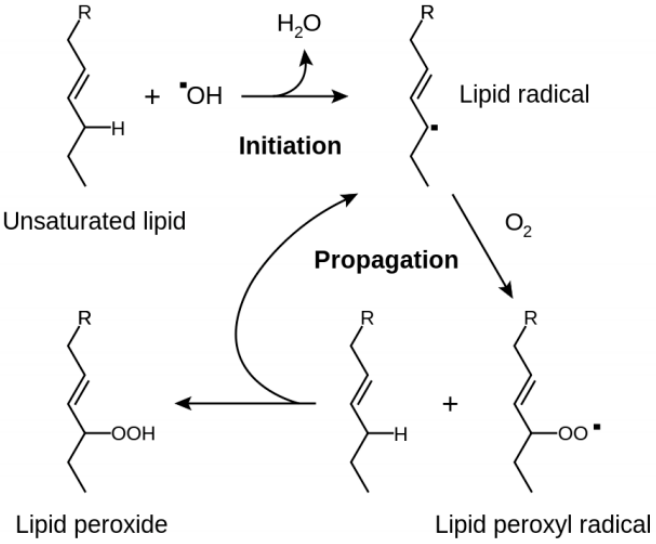


Рис. 5 Перекисное окисление липидов

Митохондриальные DAMP (damage associated molecular patterns)

Врожденный иммунитет узнает не только патогены, но и компоненты клеток, которые в норме скрыты от компонентов иммунитета. Появление таких паттернов (damage associated molecular patterns) происходит прежде всего при массированных травмах, заболеваниях. Значительная часть DAMP принадлежит именно митохондриям.

DAMP:

- N-формилированные пептиды
- TFAM (mitochondrial transcription factor A)
- Кардиолипин (специфический липид внутренней мембраны митохондрии)
- АТФ
- (роль ДНК как DAMP в настоящее время вызывает большие сомнения)

Участие митохондрий в сигнальных путях врожденного иммунитета.

По-видимому, митохондрии участвуют как в антибактериальном, так и антивирусном иммунном ответе. Устроены эти ответы по-разному и соответственно отличается участие митохондрий в них.

Что касается антивирусного ответа (рис. 6 a), то важную роль в нем играет молекулы, которая называется MAVS (mitochondrial antiviral signalling), находится на поверхности митохондрии и служит платформой для сбора компонентов (адаптерные белки, запускают сигнальные пути) иммунного ответа, прежде всего связанного с продукцией интерферонов и активацией воспалительных путей (рис. 7). АФК, появляющиеся в митохондрии, доподлинно не изученным пока способом моделируют активность MAVS. Для узнавания вирусных РНК существуют специальные адаптерные молекулы: RIG-1 – распознает короткие dsRNA, MDA5 – длинные dsRNA.
Что касается антибактериального ответа (рис. 6 b), то предполагается несколько вариантов. Возможно, АФК могут непосредственно участвовать в уничтожении фагоцитированной бактерии.

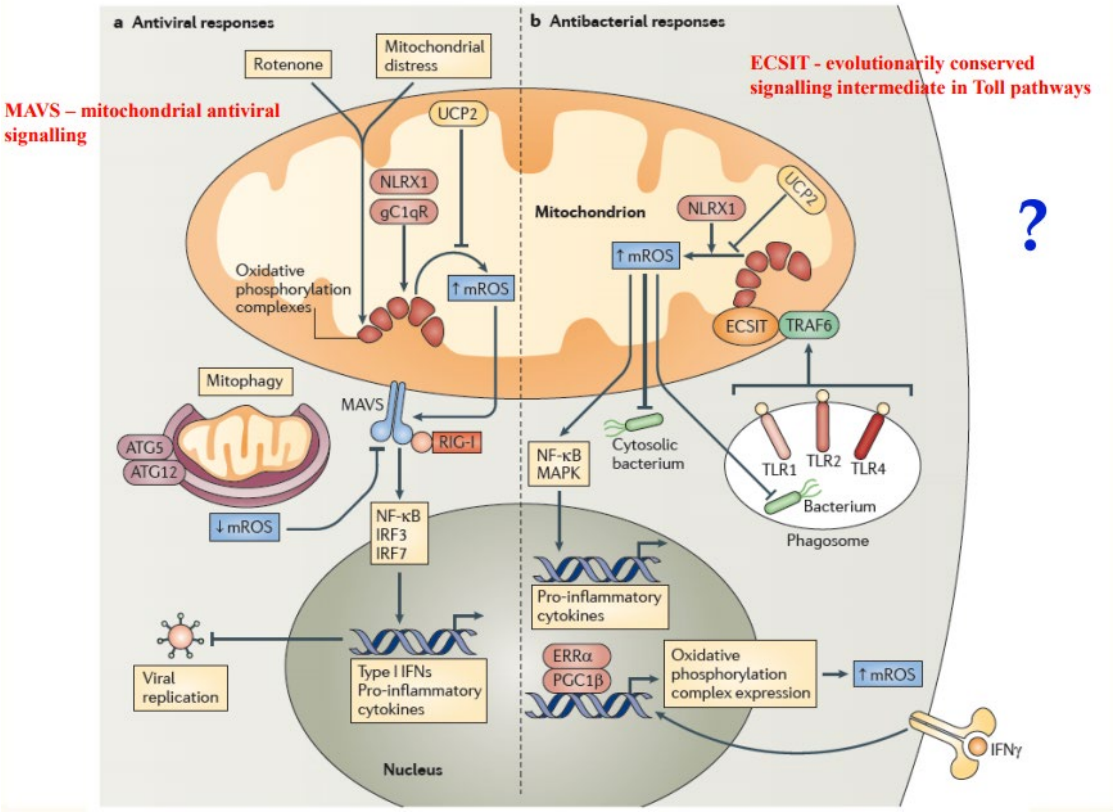


Рис. 6 Схемы антивирусного (a) и антибактериального (b) ответа.

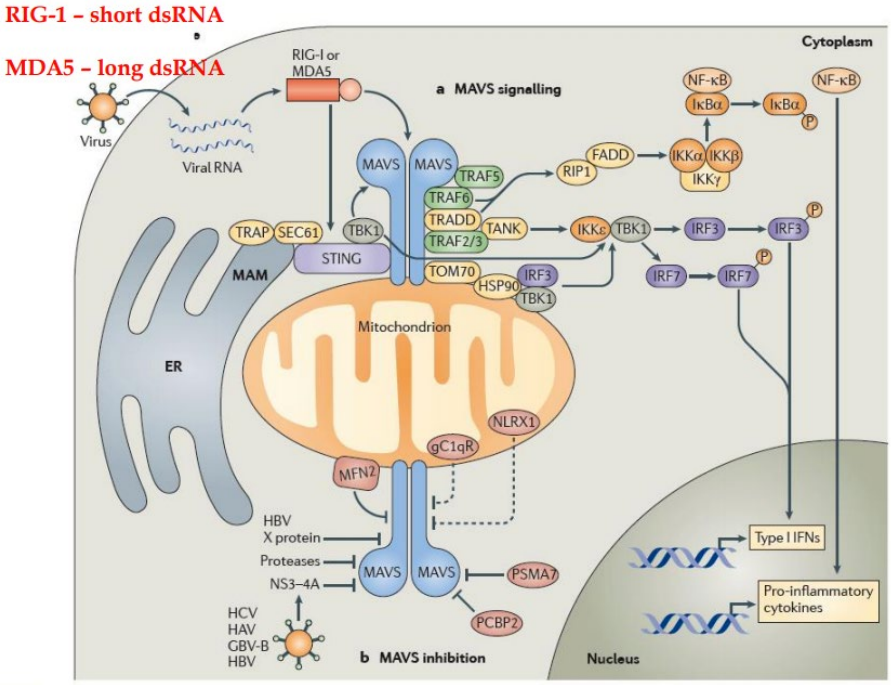


Рис. 7 MAVS-комплекс митохондрии

Все эти белковые комплексы располагаются в области между митохондрией и эндоплазматическим ретикулумом, получившим название **MAM (mitochondrial**

associated membranes). В обычном состоянии митохондрии также представляют собой ретикулум, и это позволяет им «приклеиваться» к ЭПР. Если митохондриальная сеть дробится, то отдельные митохондрии «отлипают», MAM перестает существовать, белковые комплексы иммунного ответа разрушаются. Этим пользуются вирусы, индуцируя дробление митохондриальной сети, что приводит к инактивации MAVS и их комплексов, или, в более тяжелых случаях, к митофагии.

Антибактериальный ответ на сегодняшний день представляется следующим образом (рис.8): бактерия, оказавшаяся в фагосоме, активирует Toll-like рецепторы (TLR1, TLR2, TLR4), и одним из последствий является активация убиквитинлигазы TRAF6, которая убиквитинирует белок ECSIT (находится во внутренней мембране, участвует в сборке дыхательной цепи). Когда ECSIT деградирует, работа дыхательной цепи становится менее качественной – увеличивается кол-во АФК, которые в свою очередь участвуют в уничтожении бактерии.

Одно из проблем теории: АФК плохо перемещаются через цитозоль, т.к. в нем содержится большое количество антиоксидантов. Можно предположить, что митохондрии с помощью цитоскелета и киназ (Mst1, Mst2) «подтягиваются» ближе к фагосоме, что уменьшает расстояние, необходимое АФК для преодоления.

Недавно был предложен другой механизм антибактериального ответа митохондрий (рис. 9): от митохондрии отделяются везикулы, содержащие либо сами АФК, либо фрагменты дыхательной цепи, производящие их.

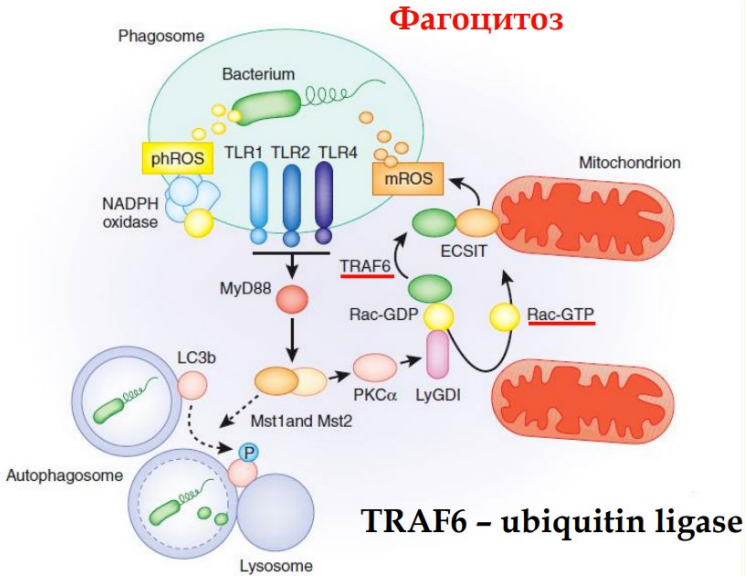


Рис. 8 Антибактериальный ответ

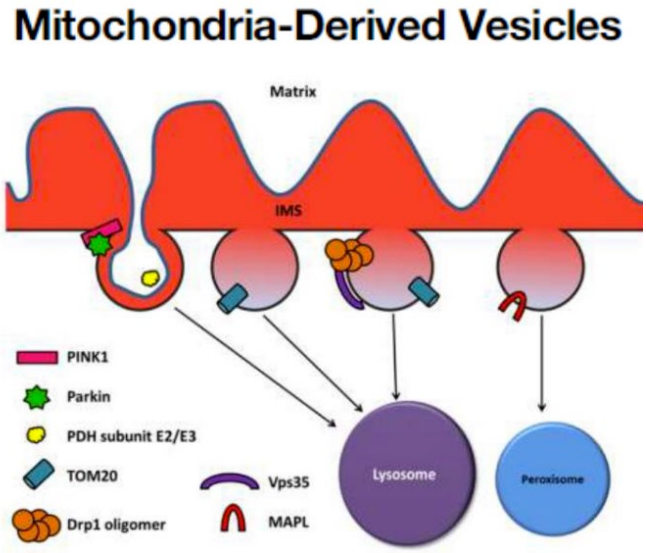


Рис. 9 Отщепление везикул от митохондрии

Роль митохондрий в активации макрофагов.

Макрофаги являются одними из основных компонентов системы врожденного иммунитета и существуют в двух состояниях M1 и M2 (рис. 10). В состоянии M1 они активированы на провоспалительные процессы, прежде всего вырабатывают IL-1b (провоспалительный цитокин), TNFa, у них активирована NO-синтаза и т.д.. В состоянии M2 они склонны вырабатывать антивоспалительные цитокины – IL-10, и это состояние возникает, например, при уничтожении апоптозных клеток. Переход между формами M1 и M2 сильно зависит от митохондриального метаболизма и АФК (АФК способствуют переходу в M1)

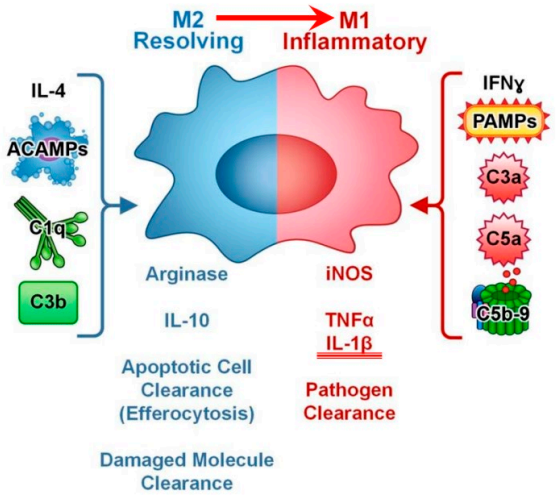


Рис. 10 Макрофаги

Важным компонентом перехода макрофагов в M2 состояние является накопление в них сукцината. Это один из метаболитов цикла Кребса, и в норме его содержание в клетке невелико. Как именно происходит резкое увеличение концентрации сукцината непонятно, и, по-видимому, существует несколько механизмов. Один из главных состоит в том, что под действием факторов стимулируется метаболизм глутамина (рис. 11), запускается GABA-шунт.

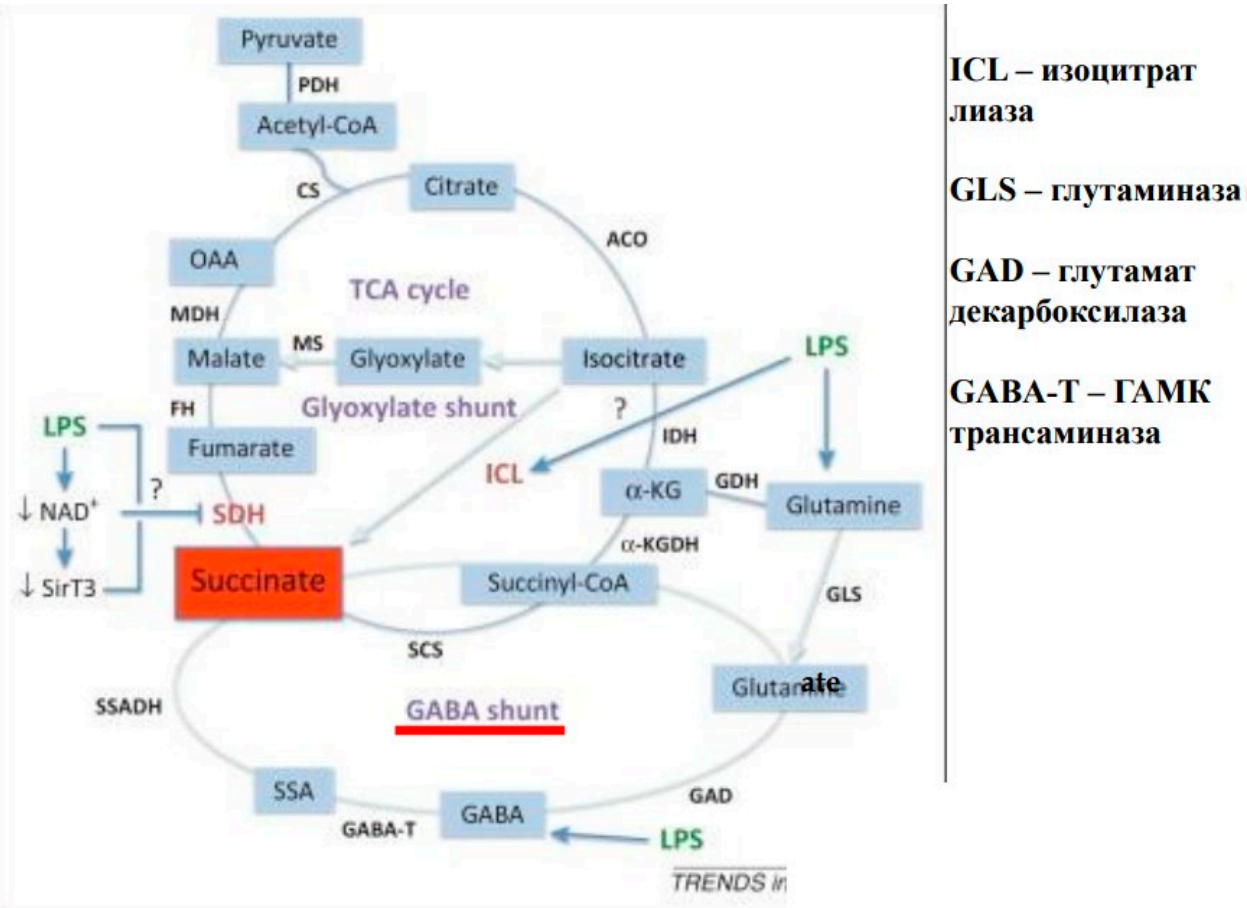


Рис. 11 Механизмы, участвующие в накоплении сукцината

Что делает сукцинат? При достаточном мембранном потенциале избыток сукцината приводит к обратному переносу электронов и избыточной продукции АФК. Как будет показано далее, такая продукция радикалов приводит к активации системы получения зрелого IL-1beta, кроме того и супероксиды, и сам сукцинат могут участвовать в активации факторов транскрипции HIF1alpha, который играет большую роль в ответе клетки на гипоксию и в иммунном ответе.

В основном HIF1 регулируется за счет деградации (рис. 12). Деградация зависит от гидроксилирования (за счет пролингидроксилазы) пролинов в этом белке. Гидроксилированные пролины узнаются убиквитинлигазой, далее происходит деградация фактора в протеасоме. Пролинигдроксилаза в качестве субстрата использует альфа кетоглуторат, а сукцинат является продуктом. И фермент устроен так, что сам сукцинат является мощным его ингибитором. Таким образом, при избытке

сукцината HIF 1 не деградирует, накапливается, переносится в ядро и запускает экспрессию многих генов, участвующих в иммунном ответе.

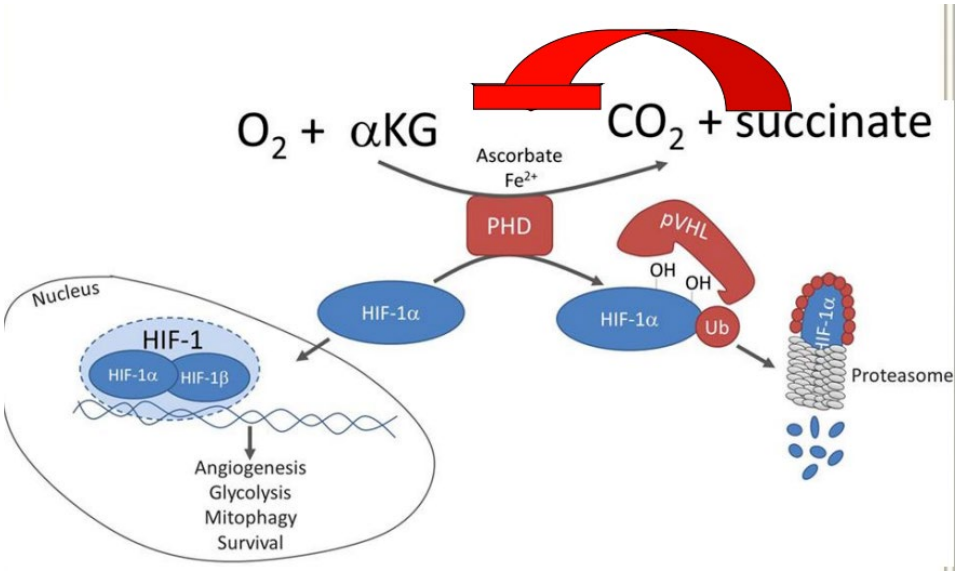


Рис. 12 Регуляция накопления HIF1alpha

Другим ответвлением цикла Кребса, участвующим в активации макрофагов, является превращение цитрата в итаконат (рис. 13). Итаконат не является интермедиатом цикла Кребса, а получается в побочной реакции . В отличие от сукцината, итаконат обладает выраженным противовоспалительным действием.

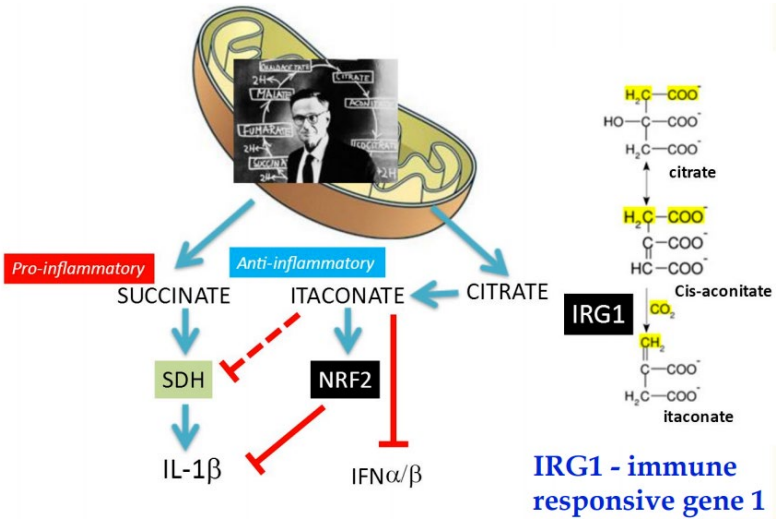


Рис. 13 Превращение цитрата в итаконат

Инфламмасомы.

Инфламмасомы являются одним из важнейших компонентов активации макрофагов. Их существует несколько видов, но далее будет рассказывать об одном из них –

NLRP3. . Суть деятельности всех инфламмасом состоит в том, чтобы проактивировать IL-1beta. Этот интерлейкин синтезируется в неактивном состоянии, активация происходит путем расщепления каспазой1. Чтобы процесс запустился, макрофаг должен получить 2 сигнала. 1 – активируются TLR, NF-kB (рис. 14), синтезируется интерлейкин. А вот для активации и выхода интерлейкина из клетки нужен второй сигнал. Механизмы этого сигнала еще достоверно не изучены, известно только то, что в итоге получается активная каспаза-1, и что первыми компонентами могут быть различные вещества – кристаллы мочевой кислоты (как в случае подагры), АТФ (воспалительные процессы) и т.д. Инфламмасомы также расположены в районе контактов митохондрий и ЭПР – области МАМ.

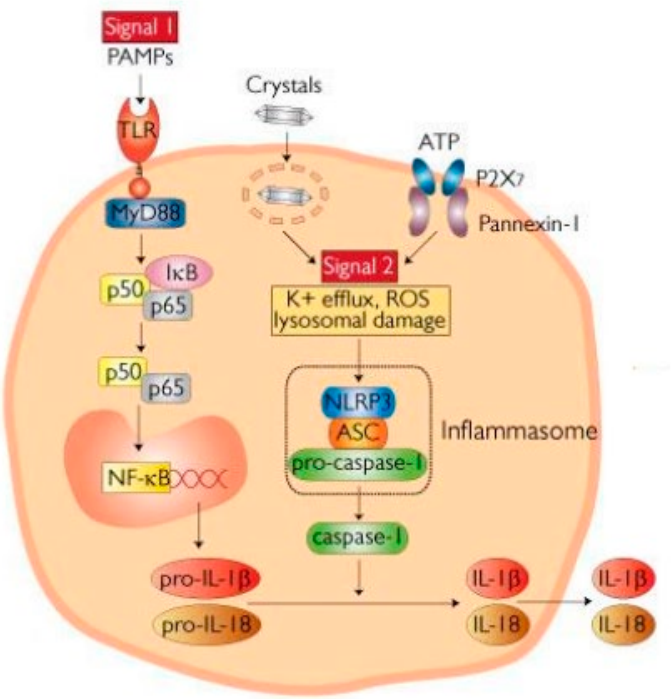


Рис. 14 Схема работы инфламмасомы

Роль кардиолипина в активации инфламмасом.

Кардиолипин является специфическим липидом внутренних мембран митохондрий. Но в связи с некоторыми условиями, в т.ч. окислением, он может оказаться на внешней мембране, что является довольно многоплановым сигналом. В частности, это является сигналом к сборке инфламмасом.
Одновременно кардиолипин во внешней мембране является сигналом к митофагии, что ведет к подавлению сборки инфламмасом.

Роль митохондриальной ДНК в активации инфламмасом.

Было показано, что для активации инфламмасом существенную роль играет фермент нуклеозид монофосфат киназа, которая участвует в биосинтезе мтДНК. И

высказывается предположение, что нужен биосинтез и выход ДНК из митохондрии, окисление ее каким-то способом, и что такая окисленная ДНК является мощным вторым сигналом для инфламмасомы.

Итого, существует множество вариантов возможных механизмов митоАФК-зависимой активации NLRP3:

- NFkB-зависимая экспрессия
- Кардиолипин-зависимое связывание с митохондриями
- Редокс чувствительный консервативный дисульфид Cys8 - Cys108 в PYD домене
- Окисление тиоредоксина и освобождение ингибиторного белка TXNIP (thioredoxin-interacting protein)
- Деглютатионилирование NLRP3
- Активация киназы NEK7
- Окисление и выброс митоДНК.

Нейтрофилы.

Основные способы работы нейтрофилов: фагоцитоз, дегрануляция (выброс специфических гранул с ферментами, в т.ч. производящими радикалы → окислительный взрыв), NETs (нетоз, выброс хроматина из клетки для создания ловушки с ферментами).

Роль митохондрий в активации нейтрофилов.

Нейтрофилы имеют собственную чрезвычайно мощную систему продукции радикалов. Это система НАДФН-оксидазы, окисляющей НАДФН с образование супероксида. НАДФН-оксидаза – сложный, многосубъединичный фермент, в покое находящийся в разобранном состоянии. Часть субъединиц находится в гранулах, часть – в цитоплазме. При получении сигналов «тревоги» фермент собирается сначала на мембране везикул, затем переносится на плазматическую мембрану, где и происходит продукция радикалов. Оказалось, что именно под действием митохондриальных радикалов происходит активация сборки этого фермента. Митохондриальные радикалы также участвуют и в активации процессов нетоза. Более того, существует предположение (еще достоверно не подтвержденное), что существует альтернативный тип нетоза, при котором происходит выброс только митохондриальной ДНК, клетка при этом не погибает.

Митохондриально-направленные антиоксиданты.

Проникающие ионы.
Мембрана митохондрии практически непроницаема для ионов, но можно создать ион (предпочтительно – катион, т.к. изнутри митохондрия заряжена отрицательно), окруженный гидрофобными хвостами (например, фенильные радикалы), который хорошо проходит через митохондриальную мембрану с большим потенциалом накопления (рис.15). Такие ионы могут использоваться для доставки в митохондрию

антиоксидантов. Так, соединили через линкер трифенилфосфоний с хиноном – это соединение проходит в митохондрию, накапливается, и «многоразово» работает – окисляется и восстанавливается, так что для активного действия вещества в митохондрии достаточно небольшого его количества. Конечно, есть и недостатки: этот хинон при определенных условиях из антиоксиданта превращается в прооксидант и стимулирует выработку радикалов. Для улучшения системы на основе ионов Скулачева были разработаны новые антиоксиданты: вместо убихонона стали использовать пластохинон. (рис. 16)

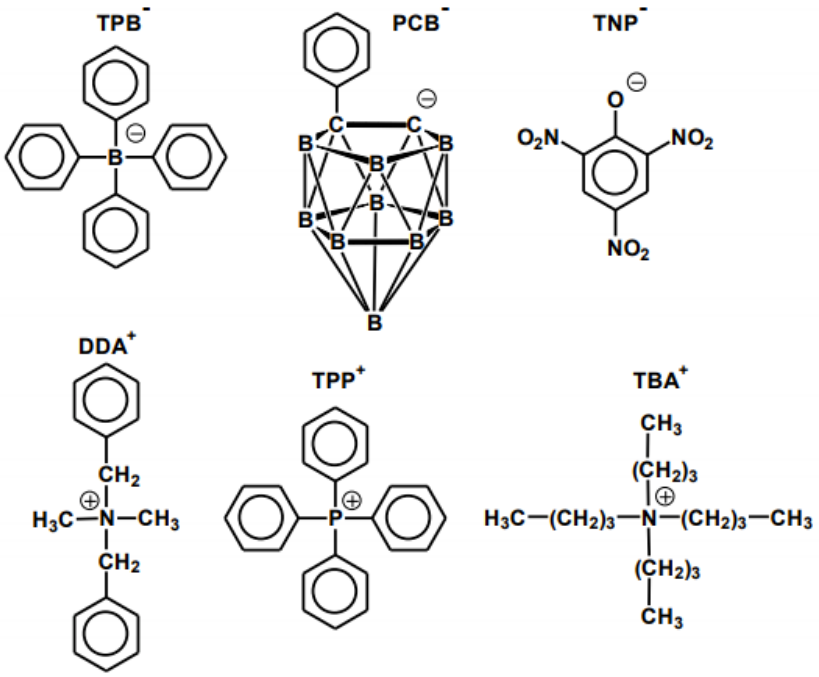


Рис. 15 Ионы Скулачева

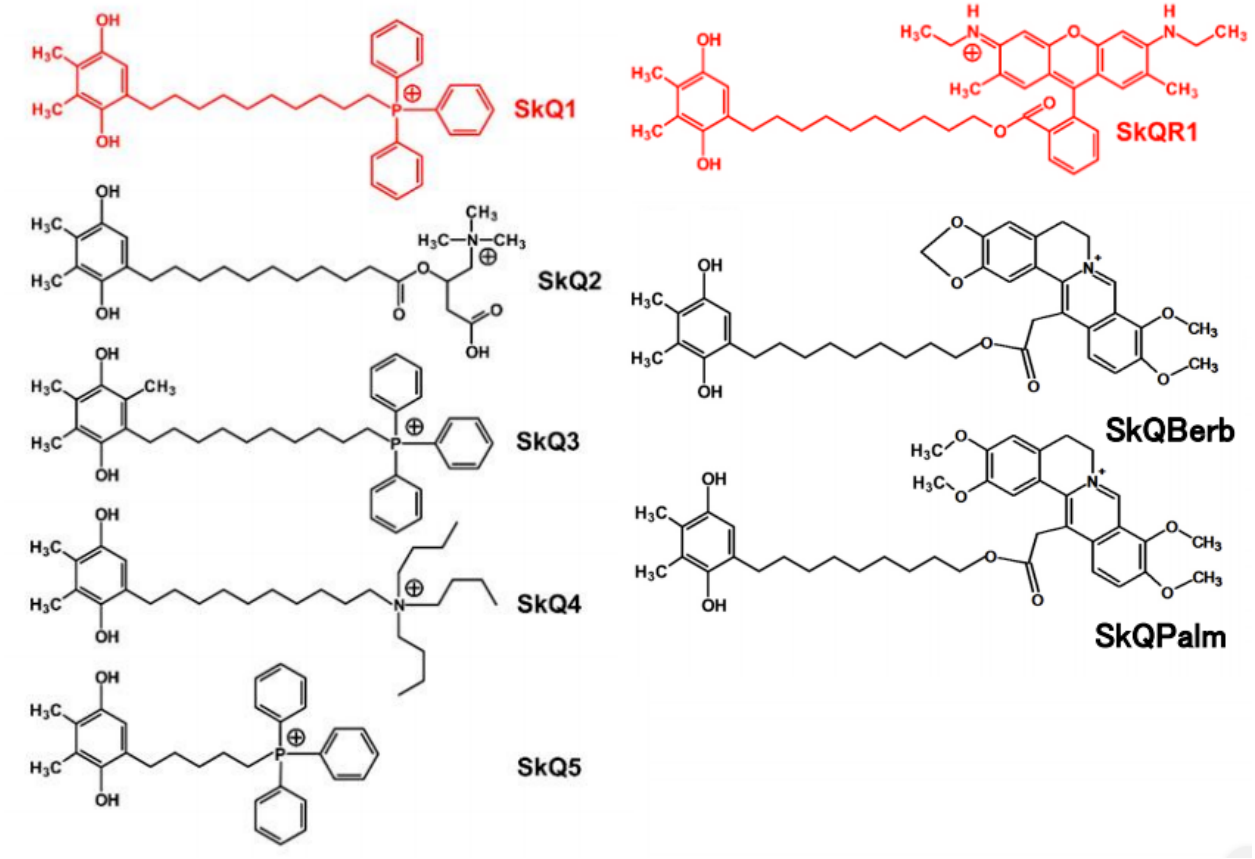


Рис. 16 Антиоксиданты на основе ионов Скулачева нового поколения

Как на моделях, так и в исследованиях in vitro, на клетках, показано, что такие антиоксиданты эффективно защищают от окисления кардиолипин, хорошо накапливается в митохондриях, предотвращает вызванную перекисью фрагментацию митохондриального ретикулума, защищает клетку от гибели, вызванной перекисью. Проводятся клинические испытания.

Противовоспалительное действие SkQ.

У молодых мышей очень большая скорость заживления покровных ран, однако она довольно сильно снижается с возрастом. Если взять старых 2х-летних мышей и некоторое время поить их раствором с низкими дозами SkQ, то скорость регенерации ран становится почти такой же, как в молодости (рис. 17). Оказалось, что по крайней мере одной из причин является подавление избыточного воспаления в области раны.

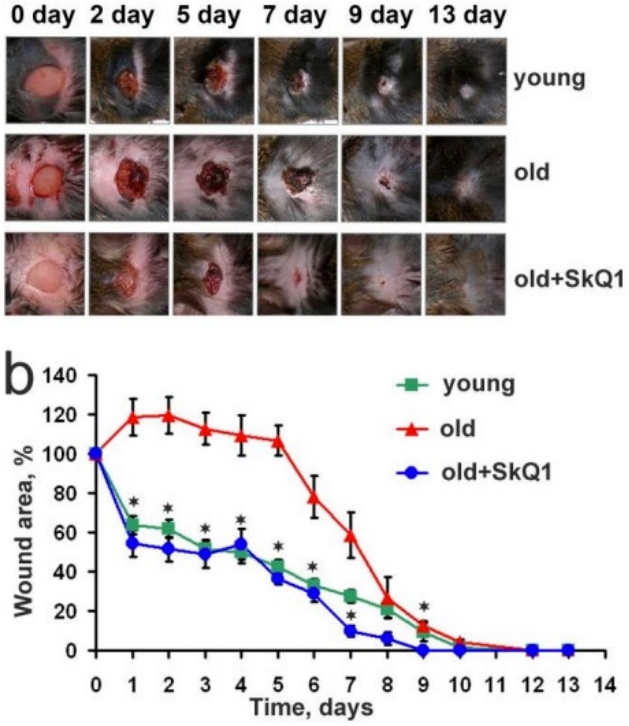


Рис. 17 Влияние SkQ на заживление ран у мышей

Еще одной важной частью системы воспаления и иммунитета является эндотелий сосудов. Для возникновения воспаления, например клетки лейкоциты из крови должны попасть в ткань из крови, преодолев эндотелиальный барьер. На поверхности эндотелия активируются молекулы адгезии, их несколько типов: один из них приводит к тому, что лейкоциты, в частности нейтрофилы, прилипают к эндотелию неплотно и начинают «роллинг», встречают молекулы адгезии другого типа и прилипают плотно, и затем с помощью специальных белков начинают проникновение через эндотелий. Кроме того, сами клетки эндотелия сами образуют провоспалительные цитокины. В ходе исследований выявили, что у старых мышей повышен уровень молекул адгезии эндотелия и продукция провоспалительных цитокинов эндотелия, защищая также и адгезионные контакты клеток эндотелия от разборки. SkQ снимает эти признаки воспаления у старых мышей, при этом не затрагивая уровень воспалительных цитокинов в крови, т.е. по крайней мере в данной модели основной мишенью SkQ являются не иммунные клетки, а клетки эндотелия. Основным механизмом защиты кадгериновых межклеточных контактов эндотелия является подавление с помощью SkQ экспрессии металлопротеазы, осуществляющей их разборку.

Патологии, связанные с избыточным воспалением:

- Воспалительные заболевания кишечника (IBD), легких, почек, суставов и т.д..
- Ишемические повреждения сердца, мозга, почек и т.д.
- Рак
- Рассеянный склероз и нейродегенеративные заболевания

- Глазные болезни (катаракта, глаукома и др.)
- Диабет
- Старение

В итоге, подавление воспаления и иммуноактивации может помочь в борьбе с самыми различными заболеваниями.

ФАКУЛЬТЕТ
БИОИНЖЕНЕРИИ И
БИОИНФОРМАТИКИ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ