УДК 616.13_004.6_085.547_092:615.225

Снисаренко Т.А.[1], Расулов Р.М.[2], Сусова М.И.[2], Расулов М.М.[2]
[1]Московский государственный областной университет
[2]Государственный ордена Трудового Красного Знамени
«ГНИИ химии и технологии элементоорганических соединений» (г. Москва)

ПРОТЕОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И РАЗВИТИЕ БИОИНФОРМАЦИОННЫХ РЕСУРСОВ (ОБЗОР)

Аннотации. В обзорной статье представлены современные сведения о протеомных и биоинформационных технологиях развития биохимии белков. Показано, что кодирующая емкость матричной ДНК не может полностью обеспечить митохондрий в белках. Приведены сведения о том, что существует пять различных механизмов импорта белков в митохондрии. Приведены сведения о том, что существуют ограничения вычислительных технологий, которые заключаются в большом проценте ложноположительных результатов, а также в невозможности обнаружения таргет-сигналов для всего протеома. Показаны преимущества тандемной масс-спектрометрии для проведения такого рода исследований. Также, к успешно применяемым подходам по локализации белков можно отнести методы микроскопии, при которых используется принцип иммунофлуоресценции нативных белков. Приведены данные об основных свойствах протеомных белков.
Ключевые слова: матричная ДНК, белки, митохондрии, протеомы, диагностика.

T. Snisarenko[1], R. Rasulov[2], M. Susova[2], M. Rasulov[2]
[1]Moscow State Regional University
[2]State Scientific Center of the Russian Federation,
Federal State Unitary Enterprise «State Scientific Research Institute
of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds», Moscow

PROTEOMIC TECHNOLOGIES AND DEVELOPMENT BIOINFORMATION RESOURCES

Abstract. In a review modern data on proteomic and bioinformation technologies of development of biochemistry of proteins are presented. It is shown that the coding capacity of matrix DNA cannot provide completely mitochondria's in proteins. Data that there are five various mechanisms of import of proteins in a mitochondrion are given. Data that there are restrictions of computing technologies which consist in big percent of the false positive results, and also in impossibility of detection of target-signals for everything proteom are given. Advantages of tandem mass spectrometry to carrying out such researches are shown. Also, on localization of proteins it is possible to carry microscopy methods at which the principle of immunofluorescence of nature proteins is used to successfully applied approaches. Data on the main properties of proteoms proteins are provided.
Key words: matrix DNA, proteins, mitochondrions, proteoms, diagnostics.

© Снисаренко Т.А., Расулов Р.М., Сусова М.И., Расулов М.М., 2014.

Широкое применение протеомных и биоинформационных технологий для развития биохимии белков в начале XXI века приобрело принципиальное значение [1; 4]. Накапливающиеся результаты представляют собой совокупности взаимосвязанных сведений, которые требуют совместной обработки, и в этой связи рассматриваются как информационные массивы (основу) для формирования различных общих и специализированных баз данных. Среди них большая часть (64,8%) созданных аннотаций нуждается в дополнительных экспериментальных материалах, при получении которых решающую роль могут сыграть протеомные технологии и дальнейшее развитие информационных ресурсов, что свидетельствует о высокой актуальности подобных исследований.

В начале XXI века поступательный импульс получили и протеомные исследования, направленные на выявление полиморфных вариантов белков в различных органах и выяснение роли белкового полиморфизма при различных физиологических и патологических процессах [10; 47]. Особое внимание при этом уделялось аллельным изоформам. Эти изоформы характеризуются единичными аминокислотными заменами в аминокислотных последовательностях, поскольку замены могут приводить к изменениям функциональных свойств белка (от незначительных до полной потери функции) или не оказывать подобного влияния (так называемые «нейтральные» замены). Уже собранная обширная информация о белковом полиморфизме в различных базах данных (например, в UniProt) включает и сведения о большом числе спорных определений отдельных аминокислот в ряде позиций первичной структуры многих белков, так называемых «аминокислотных конфликтов в последовательности» (Sequence conflict). Соответственно, при исследованиях любого белка разрешение «аминокислотного конфликта» в пользу одного из вариантов представляет интерес, поскольку итоговая детализация первичной структуры может оказать влияние на формирование представлений о пространственной упаковке его полипептидной цепи и других свойствах, включая функциональные особенности.

Наряду с изучением разных аспектов белкового полиморфизма и других фундаментальных проблем биохимии белков различных органов протеомные технологии находят все более широкое применение в разработках биомедицинских проблем, ориентированных на решение многих прикладных задач – от выявления потенциальных диагностических белковых биомаркеров, мишеней фармакологических воздействий [37] до создания методов контроля качества пищевых продуктов, изготавливаемых из мышечных тканей животных [3; 48].

Определение последовательности митохондриального генома человека (мтДНК) стало важной вехой в истории биологии и митохондриальной медицины. Результатом, опубликованным в 1981 г., стала полная последовательность кольцевой молекулы мтДНК, размером 16569 п.н. [20]. В этом же номере журнала Nature были опубликованы работы, в которых впервые были описаны РНК и белки, кодирующиеся митохондриальным геномом [9; 24]. С тех пор геном митохондрий и его продукты широко

исследуется в различных аспектах, начиная от наследственных патологий и заканчивая миграционными процессами. Эти работы дали начало серии исследований по определению полиморфизмов мтДНК и их роли в патологиях, передающихся по материнской линии, о которых впервые было упомянуто в 1988 г. [8; 33; 39]. К настоящему времени локализованы и функционально охарактеризованы в качестве этиологических факторов патогенеза более 150 мутаций мтДНК [43]. Текущая работа направлена на более глубокую характеристику патогенных и доброкачественных вариантов митохондриального генома [46].

Уже на ранних этапах исследования мтДНК стало понятно, что ее кодирующая емкость не может обеспечить полную потребность митохондрий в белках. Все 13 белков, кодируемых мтДНК млекопитающих, являются компонентами цепи окислительного фосфорилирования, посредством которой осуществляется синтез основной массы АТР в клетке. Оставшиеся 77 субъединиц дыхательной цепи кодируются ядерным геномом, как и все белки, необходимые для транскрипции, трансляции, модификаций, и комплексообразования. Компоненты многих других митохондриальных биохимических каскадов также кодируются ядерной ДНК. Кроме того, в течение десятилетий исследований, после первого секвенирования мтДНК, стало понятно, что митохондриальные болезни, наследуемые по материнской линии, представляют лишь 15-20% от всех митохондриальных нарушений человека.

К концу 1990-х гг. стала более или менее понятна ключевая роль ядерного генома в функционировании митохондрий, однако тогда трудно было представить, какое количество белков, кодируемых ядерной ДНК, импортируются в митохондрии. На полуколичественных двумерных (2D) электрофоретических гелях высокоочищенных митохондрий исследователям удалось выявить около 1500 индивидуальных пятен [37], каждое из которых соответствует определенному белку, что позволило оценить истинный размер митохондриального протеома. Интересно, что геномы альфа- протеобактерий, которые являются ближайшими живыми родственниками современных митохондрий, кодируют всего около 1000 различных белковых продуктов. Суммируя эти факты, можно предположить, что размер митохондриального протеома составляет, приблизительно, 1000–1500 белков. В 2001 г., после завершения амбициозного проекта по определению последовательности ДНК человека, началась систематизация перечня митохондриальных белков. В то время были четко идентифицированы только примерно 350 различных митохондриальных белков человека. С тех пор исследования, ключевыми данными которых являлись последовательности генов, а также результаты масс-спектрометрических исследований позволили продвинуться далеко вперед в каталогизации митохондриальных протеомов различных видов. Эти успехи обусловили и прогресс в понимании этиологии широкого спектра патологий человека.

К митохондриальному протеому относится подмножество полипептидов из 2000 белков (у млекопитающих). Собственно митохондриальными могут называться белки, которые локали-

зованы в митохондриальном матриксе, мембранах или межмембранном пространстве митохондрий. Несмотря на кажущуюся простоту, отнесение того или иного белка к митохондриальному протеому – задача нетривиальная, так как существуют постоянно мигрирующие белки, белки, присутствующие в чрезвычайно малых количествах, и, наконец, белки, которые можно обнаружить только на определенных стадиях клеточного цикла или же в определенных типах клеток. Из этого следует, что нет какого-то одного метода, который бы мог идентифицировать и охарактеризовать весь митохондриальный протеом. Ниже мы рассмотрим самые распространенные методы митохондриальной протеомики.

Технологии исследования протеома митохондрий

С помощью биоинформационных технологий (ИТ), основанных на поиске целевых последовательностей белков – компонентов митохондриального протеома, идентифицировано по крайней мере пять различных механизмов импорта белков в митохондрии [42]. Один из основных путей основан на переносе белков в матрикс с включением дополнительной расщепляемой последовательности пептида, содержащей 15-50 аминокислотных остатков, которые образуют α-спираль из положительно заряженных аминокислот на одной стороне и незаряженных, гидрофобных остатков – на другой. Некоторые из этих белков отсортировываются на внутренней мембране и в межмембранном пространстве на основе чередования пептидных последовательностей. Другой механизм опосредует импорт белков внешней мембраны через карбокситерминальный сигнал. Также существует отдельный механизм импорта гидрофобных белков внутренней мембраны, основанный на формировании конформационной петли с помощью серии несмежных внутренних сигналов ориентации. Некоторые небольшие цистеин-богатые белки межмембранного пространства импортируются с помощью собственного внутреннего сигнала ориентации (например, Tim9 и Tim10 в дрожжах). Наконец, многие белки просто «цепляются» своим гидрофобным хвостом за внешнюю мембрану с помощью α-спиралей. С использованием ИТ были разработаны многие алгоритмы для математического прогноза и определения расщепляемого таргет-сигнала и реализованы в таких программных продуктах, как TargetP, pTARGET [38], PSORT [12], iPSORT [11], Predotar [29], ngLoc, MitPred [41], MitoPred [34], и MitoProt [2; 25].

Основные ограничения вычислительных технологий заключаются в большом проценте ложноположительных результатов, а также в невозможности обнаружения таргет-сигналов для всего протеома, так как дополнительные, внедренные в результате процессинга белков последовательности, представляют лишь один из множества механизмов импорта. Для примера: одна популярная программа (TargetP) обнаруживает сигнал лишь в 60% белков, митохондриальная локализация которых доказана экспериментально. Однако, по другим оценкам, 69% ее

предсказаний являются ложными; при самых «строгих» настройках TargetP выдает 3% ложноположительных результатов, причем обнаруживает таргет-сигналы только у 20% митохондриальных белков [23]. Учитывая приведенные пример низкой чувствительности и специфичности программы, она не может применяться как самостоятельный инструмент в определении таргет-сигналов.

Своеобразным золотым стандартом в идентификации и характеризации митохондриального протеома, как, впрочем, и протеома человека в целом, являются методы масс-спектрометрии (МС). Кажущаяся простой, задача разделения и идентификация митохондриальных белков является, на самом деле, технически сложной, учитывая их количество и широкий динамический диапазон (по массе и изоэлектрическим характеристикам). Пионерские исследования, проведенные в 1998 и 2001 гг., с использованием 2D-электрофореза и МС, позволили определить 46 белков плацентарных митохондрий человека [16] и 80 митохондриальных белков одной линии нейробластомы человека [15]. Преимущества тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) были доказаны в работе, результатом которой стало обнаружение 615 митохондриальных белков сердца человека [19] и 399 белков митохондрий головного мозга, сердца, почек, и печени мышей [26]. Однако тщательный анализ показал, что в этих исследованиях были обнаружены только те белковые молекулы, которые присутствуют в больших количествах [22].

Новые поколения МС/МС технологий более чувствительны и позволяют обнаруживать белки, количество которых не превышает 5 ppb. Например, Кислингер (Kislinger) с коллегами определили 2533 белков из митохондриальных экстрактов мозга, сердца, почек, печени, легких и плаценты мышей [44]. Ряд дополнительных исследований выявили 1130 митохондриальных белков из адипоцитов и клеток линии 3T3-L1 [25]; 1162 – из мозга, печени, сердца, и почек крыс [14]; 689 белков мышц, сердца и печени крыс, и 297 из печени мыши. Pagliarini и др. проанализировали митохондриальные экстракты из 14 разнообразных тканей мышей и обнаружили в общей сложности 3881 белков. При этом важно отметить, что не все белки, обнаруженные в митохондриальных экстрактах в ходе приведенных исследований, являются истинно митохондриальными (по локализации). Эта поправка обусловлена возросшей чувствительностью приборов нового поколения, которые способны обнаруживать крайне малые количества белков, которые попали в митохондриальные экстракты вследствие несовершенства процедур их очистки от компонентов цитозоля клеток. По различным оценкам, таких контаминантов в митохондриальных экстрактах присутствует до 75% от общей массы белков в экстракте.

Сегодня существует один экспериментальный подход, позволяющий отличить истинный митохондриальный белок от контаминантов. Метод заключается в корреляции белковых профилей и основывается на предварительной очистке митохондрий в градиенте сахарозы, с последующим сравнением пептидных профилей различных фракций градиента и вы-

равниванием по маркерным для каждой органеллы белковым профилям. Последующие наложения профилей позволяют исключить совпадающие компоненты и выявить истинно митохондриальные белки. Применение этого метода позволило выявить 1404 белка различных органелл, в том числе 297 митохондриальных. Сравнивая данные, полученные с применением компьютерных технологий и MC/MC, Кислингер с коллегами [25] смогли отнести к митохондриальным только 334 из 2533 белков, обнаруженных вычислительными методами[1].

К успешно применяемым подходам по локализации белков, можно также отнести методы микроскопии, при которых используется принцип иммунофлуоресценции нативных белков при наличии антител к эндогенным эпитопам. В ряде случаев осуществляются подходы, в которых исследуемый белок метится эндогенным маркером, при связанной экспрессии. К сожалению, ограничение иммунологического метода состоит в частом отсутствии высококачественных антител. При исследовании протеома дрожжей успешно применялись технологии мечения эндогенными флуоресцентными белками [22], они же были апробированы на мышах [44], но по различным причинам они не нашли широкого применения. Масштабные усилия в области визуализации белков млекопитающих с использованием микроскопии нашли свое отражение в продолжающимся по сей день проекте «LifeDB» [45] и в уже завершенном проекте[2] «MitoCarta» [6]. К настоящему времени визуализированы 321 и 166 митохондриальных белков человека и мыши, соответственно. Несмотря на то, что микроскопия наилучшим образом позволяет исследовать локализацию белков, ее применение ограничено множеством факторов, начиная от времени затрат на весь процесс, и заканчивая технологическими трудностями в идентификации истинных эпитопов (при применении антител в качестве меток).

Дополнительные данные о митохондриальной локализации белков могут быть получены методами вычислительной и экспериментальной геномики. Экстраполяция гомологии последовательностей с модельного организма на человека представляет чрезвычайно полезный метод для прогноза или же подтверждения локализации того или иного белка. Отлично зарекомендовал себя метод, при котором производится сравнение последовательностей потенциальных митохондриальных белков человека с митохондриальными белками других видов, локализация которых установлена однозначно [7]. Также для локализации белков были успешно применены методы экспериментальной генетики: дрожжи, с редуцированным геномом, выращивали на неферментативном субстрате, в результате чего наблюдали изменение белковых профилей, в том числе и в митохондриях [5; 30; 32]. Приводятся и другие методы, основанные на изменениях функционирования

[1] См. базу данных на MitoCarta: An Inventory of Mammalian Mitochondrial Genes / Broad Institute [сайт]. – URL.: http://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta (дата обращения: 24.03.2014 г.)

[2] См. предыдущую сноску и базу данных на The LIFEdb functional genomics resource / DKFZ: German cancer research center in the Helmholtz Association [сайт] . – URL.: http://www.lifedb.de (дата обращения: 24.03.2014 г.)

геномов. Так, оценка профилей мРНК при индукции или ингибировании митохондриального биогенеза позволяет дать прогноз по изменению белкового профиля, а также по присутствию цис-регуляторных, специфичных для генов митохондриальной системы, мотивов в промоторах [13; 17; 31]. Несмотря на то, что индивидуальные подходы позволяют достигнуть определенных результатов в попытках локализации белков митохондрий, наиболее адекватным можно считать применение ансамблей методов.

Свойства митохондриального протеома

Почти полная «инвентаризация» митохондриального генома позволила ближе подойти к пониманию функционирования митохондрий и их роли в жизнедеятельности клеток. Ниже мы обсудим некоторые детали, касающиеся размера и свойств митохондриального генома, затронем проблемы двойной локализации белков и обсудим роль митохондриального протеома в биохимических процессах, тканевой специфичности, а также в эволюционном разнообразии митохондрий.

Наиболее полный перечень (MitoCarta) содержит около 1100 генных локусов, кодирующих митохондриальные белки [14]. По некоторым оценкам, основанным на Байесовской модели вероятностей, сегодняшние данные представляют лишь 85% аннотаций, с учетом априорной вероятности того, что, в среднем, 7% всех генов млекопитающих – митохондриальные. С учетом априорной вероятности в диапазоне от 5% до 12% Байесовская модель предсказывает, что 1050–1400 генов кодируют митохондриальные белки. Конечно же, каждый ген, с учетом сплайсинга может кодировать несколько белков, которые, в свою очередь, могут подвергаться посттрансляционной модификации. Это, в итоге, приведет к тому, что конечный репертуар белков будет более чем на порядок превышать количество генов, которые их кодируют. Одним из уникальных свойств митохондриального протеома является большой разброс в количествах его компонентов. Так, ранее было сделано наблюдение о расхождении концентраций белков митохондриального протеома на 5 или 6 порядков [14]. По результатам анализов 2D-гелей были определены два белка внешней и внутренней мембраны, представленные в наибольших количествах: VDAC и ANT, соответственно. Недавно проведенный MC/MC анализ подтвердил высокую концентрацию этих белков. На основании грубой оценки количества миотхондриальных белков, в 14 тканях мышей выделено пять наиболее распространенных: ATP5A1, ATP5B, ACO2, ANT1, и ANT2; VDAC1. При этом известно, что белки могут выполнять аналогичные функции в различных компартментах клетки, обладающих различными регуляторными свойствами. Эта кажущаяся избыточность позволяет относительно небольшому числу структурных генов (20000 – 30000) тонко регулировать все клеточные процессы как в пространстве, так и во времени.

Белки с различной локализацией могут продуцироваться и дупликациями гена (например, HMGCS1 и HMGCS2). Однако к белкам двойной

локализации принято относить те, которые кодировались одним генным локусом, но имеют различную локализацию. Двойная локализация может быть достигнута несколькими путями: альтернативным сплайсингом, различными инициирующими кодонами, в результате чего с одного гена получаются два и более белковых продукта, один из которых может содержать митохондриальную таргет-последовательность (например, ISCU и LRPPRC). Белки могут менять свою локализацию под действием экзогенных стимулов (например, проапоптотический белок BID транслоцируется из цитозоля в митохондрии при действии апоптотического стимула). Крупномасштабные исследования локализации компонентов клеточного протеома мышей, проведенные Фостер с коллегами, продемонстрировали, двойную локализацию для 39% всех белков и 16% митохондриальных белков. В дрожжах, Кумар с соавторами, проанализировав 2744 белка, продемонстрировали двойную локализацию для 11% всех белков и 15% митохондриальных белков. Это позволяет предположить, что в совокупности около 15% митохондриальных белков имеют двойную локализацию.

Функции митохондрий не лимитированы электрон-транспортной цепью и циклом трикарбоновых кислот. Митохондрии осуществляют и ряд других важнейших физиологических функций, среди которых биосинтез гема, окисление жирных кислот и аминокислот, синтез пиримидина, гомеостаз кальция и апоптоз. Из, приблизительно, 1100 предположительно митохондриальных белков, функция более 300 неизвестна, для других 300 известна лишь доменная структура, информация о которой получена при анализе гомологий последовательностей аминокислот [15]. Часть этих белков может принимать участие в уже описанных биохимических каскадах, а может входить в еще не открытые метаболитические пути. Основываясь на анализе коэкспрессии белков, инвентированных в MitoCarta, Нильсон с соавторами смогли идентифицировать новые митохондриальные транспортёры и шапероны, вовлеченные в биосинтез гема. Хьюнен с соавторами, используя несколько иной подход, основанный на анализе функциональных цепей, продемонстрировали связь некоторых белков с рядом митохондриальных функций, часть из которых считалась полностью изученной. Было показано, что митохондрии содержат все необходимые белковые компоненты для синтеза жирных кислот второго типа [13], которые, в свою очередь, могут опосредовать биосинтез липоевой кислоты, а также синтез жирных кислот, инкорпорированных в митохондриальные липиды. Другие крупномасштабные протеомные исследования показали наличие в митохондриях большого количества белков, участвующих в обратимом фосфорилировании и ацетилировании, что свидетельствует о развитой сигнальной сети в митохондриальном матриксе.

Тканеспецифичность митохондрий

Исследования биохимического статуса и ультраструктуры митохондрий проводятся многие годы. Сегодня очевидно, что митохондрии сильно различаются в зависимости от типа клеток, в котором они локализованы. Протеомные исследования внесли свой вклад в понимание молекулярных аспектов тканевой специфичности митохондрий. Сердце, например, содержит приблизительно в 2,5 раза больше митохондрий, чем мозг. Однако различия в митохондриях этих тканей не ограничиваются их количеством, а носят еще и весомый качественный характер. Первые исследования качественных межтканевых различий протеома митохондрий приводит Mootha с соавторами. Показано, что митохондриальные белковые профили различных тканей идентичны примерно на 75%. Эти данные были скорректированы обширными исследованиями. Из 1100 белков, аннотированных в MitoCarta, общими для митохондрий всех тканей является 50%, в то время как другие 50% – тканеспецифичные. Эти же исследования показали, что митохондрии развивающихся тканей обладают более обширным белковым профилем, чем митохондрии дифференцированных тканей [15]. Исследование митохондриального протеома различных тканей приводит к интересным результатам. Так, анализ белкового профиля бурого жира подтвердил предположения о том, что адипоциты происходят от мышечных клеток [13].

В ряде случаев исследование протеомного профиля приводит и к неожиданным результатам. Ожидалось, что субъединицы всех четырех комплексов дыхательной цепи присутствуют в большом количестве во всех типах тканей и клеток. Однако, к примеру, комплекс IV в некоторых тканях несет дополнительные субъединицы. Кроме того, количественное соотношение субъединиц четырех комплексов дыхательной цепи различаются, в зависимости от ткани, в которой они локализованы. В этой связи обращают на себя внимание рибосомы, которые, возможно, обеспечивают избирательный синтез полипептидов в зависимости от типа тканей. Ряд авторов не только охарактеризовали митохондриальный протеом крыс, но и связали его с картами биохимических путей и моделями биосинтетических возможностей различных органов, а используя данные о митохондриальных протеомах, построили модель метаболизма митохондрий сердечной мышцы [18; 21; 31].

Эволюционные аспекты митохондриальных белков

Современные митохондрии представляют собой потомков ранних эндосимбионтов, на роль которых, по разным данным, претендуют альфапротеобактерии [23]. С тех времен эндосимбионты потеряли либо перенесли часть своего генетического материала в ядро клетки хозяина. Более того, белки клетки-хозяина приобрели таргетные сигналы для импорта в органеллы. Лишь около 15-20% белков современных митохондрий берут свое начало у митохондриального предка, т.е. были закодированы в ДНК альфапротеобактерий [40]. Митохондриальные белки млекопитающих наибо-

лее эволюционно консервативны, чем белки других клеточных компонентов. Почти 75% белков митохондрий млекопитающих очевидно бактериального происхождения. Другие компоненты клеток представлены белками бактериального происхождения лишь на 48%. Несмотря на древнее происхождение большинства митохондриальных компонентов, 9% из них имеют гомологи только у многоклеточных животных. Некоторые митохондриальные белки эволюционировали уже в позвоночных линиях, в частности несколько про-апоптотических факторов.

Болезни человека, ассоциированные с митохондриями

Данные о митохондриальном протеоме позволили систематизировать подходы к пониманию митохондриальных патологий. Заболевания дыхательной цепи (ЗДЦ) представлены подмножеством митохондриальных нарушений и характеризуются как биохимические нарушения окислительного фосфорилирования. Частота встречаемости ЗДЦ: 1 на 5000 новорожденных, и в совокупности, из всех болезней обмена веществ, они наиболее распространены [27]. Митохондриальная дыхательная цепь состоит из пяти высокомолекулярных комплексов, субъединицы которых транскрибируются с 13 митохондриальных генов и, приблизительно, 77 ядерных генов. Дефекты в дыхательной цепи приводят к широкому кругу заболеваний, начиная от летальности новорожденных и заканчивая различными нейродегенеративными заболеваниями преклонного возраста.

Клиническая картина заболеваний, вызванных дефектами дыхательной цепи, может быть различна, однако неизменным для всех остается вовлеченность в патогенез большинства органов и систем организма. Так, наиболее частыми клиническими признаками большинства подобных заболеваний являются миопатии скелетных мышц, кардиомиопатии, припадки, инсульты, атаксия, периферическая невропатия, слепота, глухота, нарушения моторики, печеночная и почечная недостаточность, дисфункция костного мозга, а также эндокринная и экзокринная дисфункции [27]. С точки зрения типов наследования, данные заболевания являются гетерогенными и могут наследоваться аутосомно-доминантно, аутосомно-рецессивно, сцеплено с Х-хромосомой и по материнской линии. Отмечены также спорадические случаи манифестации. Расчеты показывают, что 15-20% ЗДЦ вызваны мутациями в мтДНК, остальные, по-видимому, являются причиной полиморфизма ядерных генов. Из-за сильной генетической гетерогенности и плейотропности генетических локусов, связанных с патогенезом, дифференциальная диагностика заболеваний ЗДЦ крайне осложнена. При этом важно отметить, что количество данных о ядерных генах, вовлеченных в ЗДЦ, в последнее время значительно возросло, благодаря работам в области геномики и протеомики митохондрий.

Типичными подходами в аннотировании функций генов, лежащих в основе патогенеза ЗДЦ, является кандидатный анализ, анализ сцепления и картирование гомозигот. Однако мето-

ды, основанные на картировании, как правило, позволяют анализировать лишь достаточно протяженные участки хромосом и не дают информации о причинной мутации. Поскольку гены, кодирующие компоненты дыхательной цепи являются кандидатными, информация об их структуре, основанная на данных митохондриального протеома позволяет сильно сузить поиск полиморфизмов – этиологических факторов патогенеза. Первые результаты, основанные на крупномасштабных геномных и протеомных исследованиях, позволили картировать полиморфизмы в локусе LRPPRC, которые лежат в основе патогенеза франко-канадского варианта синдрома Лея. Аналогичный подход впоследствии был использован для выявления генов ETHE1, как этиологических факторов этилмалоновой энцефалопатии.

Постоянно увеличивающийся список генов, вовлеченных в функцию дыхательной цепи, позволяет глубже понять молекулярную природу патогенеза ЗДЦ. На сегодняшний день выявлены 92 белок – кодирующих гена, мутации в которых приводят к ЗДЦ. Кирби с коллегами систематизировали указанные гены и обозначили пять основных путей молекулярной этиологии ЗДЦ. Во-первых, в основе ЗДЦ могут лежать изменения любого из 13 кодирующих белок генов мтДНК, а также изменения в генах тРНК и рРНК [18]. Во-вторых, повреждения ядерных генов, кодирующих субъединицы любого из 5 комплексов дыхательный цепи, могут являться причиной ЗДЦ. В-третьих, мутации в генах, кодирующих факторы импорта митохондриальных белков и факторы «сборки» дыхательной цепи. В-четвертых, факторы, обеспечивающие динамику мембран митохондрий. И, наконец – белки, которые обеспечивают биогенез мтДНК, также могут являться причиной ЗДЦ. Ряд генов невозможно отнести к той или иной классификации, вследствие неопределенности их функции (например, MPV17 и FASTKD2), или же по причине неполного понимания патогенеза заболевания.

Традиционно, митохондриальные патологии связывают с нарушением в функционировании дыхательной цепи и синтеза АТФ. Однако в последнее время стало появляться все больше данных о наличии дополнительных фенотипов митохондрий, связанных, к примеру, с опухолями мягких тканей и сахарным диабетом. Работы в этом направлении интенсифицируются и это дает свои результаты. Недавно были обнаружены мутации в генах митохондриальных белков PYCR1, которые лежат в основе преждевременного старения и генерализованного эластозиса (неизлечимое заболевание кожи) [40], а также в генах белков DHODH, которые опосредуют такую тяжелую патологию, как синдром Миллера, характеризующийся микрогнатией, заячьей губой и гипоплазией конечностей [27]. В сумме, с белками митохондриальной локализации сегодня связывают более 150 различных заболеваний. Таким образом, применяя различные подходы прослеживания всех изменений от фенотипа к генотипу, можно достаточно точно аннотировать изменения в основном метаболизме, происходящие при патогенезе различных заболеваний. На основе исследований [35] создана база данных, в которую сегодня входят 502 клинических фенотипа, ассоциированные со 174 дефек-

тами белков митохондриальной локализации (http://www.mitophenome.org). Эта база является пока неполной (отсутствует примерно половина известных белков, вовлечённых в ЗДЦ), а также в нее включены белки, которые, основной массой, не локализуются в митохондриальном матриксе (например, p53 и WFS1) [28]. Несмотря на это, данные, приведенные в базе, могут быть использованы для начальной привязки клинического фенотипа к биохимическим путям и генам. Ресурс позволяет провести количественное отождествление различных симптомокоплексов. Например, используя базу, легко рассчитать, что неврологические симптомы встречаются в 89% случаях при мутациях в генах, ассоциированных с митохондриями, в то время как комбинированный симтомокомплекс, затрагивающий нервную, сердечнососудистую системы, ЖКТ и метаболические пути, встречается в 57% случаев. Ресурс также позволяет строить биологические связи между генами и специфическим фенотипом и многое другое. Несмотря на то, что указанный ресурс и подобные ему находятся в самом начале развития, уже сегодня возникло обоснованное понимание того, что системные знания в области протеомики и геномики митохондрий позволят более точно диагностировать и осуществлять направленное лечение многих заболеваний человека. Этот фактор и даёт основание для неуклонного увеличения перечня митохондриальных заболеваний.

В заключение обзора представляется целесообразным особо выделить несколько положений. Во-первых, митохондриальный протеом человека включает 1100-1400 различных белков, из которых только 13 кодируются митохондриальной ДНК. Для их идентификации применялись методы высокопроизводительной протеомики, геномики, микроскопии и компьютерного анализа. При этом около 75% митохондриально протемома имеет гомологию с бактериальным протеомом, в то время как для клетки в целом процент гомологии не превышает 48. Во-вторых, около 15% митохондриальных белков имеют двойную локализацию. В-третьих, ансамбли митохондриальных белков тканеспецифичны. Приблизительно 50% митохондриальных белков являются общими для всех тканей, оставшиеся – специфичны для определенного типа. Особой тканеспецифичностью обладают митохондриальные рибосомы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Примроуз С., Твайме Р. Геномика: роль в медицине. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2008. – 277 с.
2. Adachi J. In-depth analysis of the adipocyte proteome by mass spectrometry and bioinformatics / J. Adachi, C. Kumar, Y. Zhang et al. // Mol. Cell Proteomics. – 2007. – V. 6. – P. 1257–1273.
3. de Almeida A.M., Bendixen E. Pig proteomics: a review of a species in the crossroad between biomedical and food sciences // J. Proteomics. – 2012. – V. 75 (№ 14). – P. 4296–4314.
4. Anderson N.G., Matheson A., Anderson N.L. Back to the future: the human protein index (HPI) and the agenda for post-proteomic biology // Proteomics. – 2001. – V. 1 (№ 1). – P. 3–12.
5. Banci L. MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria / L. Banci, I. Bertini, C. Cefaro et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2009. – V. 16. – P. 198–206.
6. Brustovetsky N., Dubinsky J.M. Dual re-

sponses of CNS mitochondria to elevated calcium // J. Neurosci. – 2000. – V. 20 (№ 1). – P. 103–113.
7. Chacinska A. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms / A. Chacinska, C.M. Koehler, D. Milenkovic et al. // Cell. – 2009. – V. 138. – P. 628–644.
8. Chou A.P. Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition / A.P. Chou, S. Li, A.G. Fitzmaurice et al. // Neurotoxicology. – 2010. – V. 31 (№ 4). – P. 367–372.
9. Costa C. Electrophysiology and pharmacology of striatal neuronal dysfunction induced by mitochondrial complex I inhibition / C. Costa, V. Belcastro, A. Tozzi et al. // J. Neurosci. – 2008. – V. 28 (№ 32). – P. 8040–52.
10. David F.P., Yip Y.L. SSMap: a new UniProt-PDB mapping resource for the curation of structural-related information in the UniProt/Swiss-Prot Knowledgebase // BMC Bioinformatics. – 2008. – 9:391. – 12 p.
11. DiMauro S., Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease // Ann. Med. – 2005. – V. 37. – P. 222–232.
12. DiMauro S., Schon E.A. Mitochondrial respiratory-chain diseases // N. Engl. J. Med. – V. 348 (№ 26). – P. 2656–2668.
13. Falkenberg M. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA / M. Falkenberg, M. Gaspari, A. Rantanen et al. // Nat. Genet. – 2002. – V. 31 (№ 3). – P. 289–294.
14. Fernández-Vizarra E. Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis / E. Fernández-Vizarra, J.A. Enríquez, A. Pérez-Martos et al. // Mitochondrion. – 2011. – V. 11 (№ 1). – P. 207–213.
15. Foster L.J. A mammalian organelle map by protein correlation profiling / L.J. Foster, C.L. de Hoog, Y. Zhang et al. // Cell. – 2006. – 125. – P. 187–199.
16. Forner F. Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver / F. Forner, L.J. Foster, S. Campanaro et al. // Mol. Cell Proteomics. – 2006. – V. 5. – P. 608–619.
17. Gleyzer N., Vercauteren K., Scarpulla R.C. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators // Mol. Cell. Biol. – 2005. –V. 25 (№ 4). – P. 1354–1366.
18. Gordon J.W. Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle // J. Appl. Physiol. – 2001. – V. 90 (№1). – P. 389–396.
19. Huh W.K. Global analysis of protein localization in budding yeast / W.K. Huh, J.V. Falvo, C.L. Gerke et al. // Nature. – 2003. – V. 425. – P. 686–691.
20. Human physiology / ed. R.F. Schmidt, G. Thews G. – 2-nd ed. – New York: Springer, 2001. – 643 p.
21. Jänsch L. Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants / L. Jänsch, V. Kruft, U.K. Schmitz et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273 (№27). – P. 17251-7.
22. Johnson D.T. Functional consequences of mitochondrial pro- teome heterogeneity / D.T. Johnson, R.A. Harris, P.V. Blair et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2007. – V. 292. – P. 698–707.
23. Johnson D.T. Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome / D.T. Johnson, R.A. Harris, S. French et al. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2007. – V. 292. – P. 689–697.
24. Kilbride S.M. Partial inhibition of complex I activity increases Ca-independent glutamate release rates from depolarized synaptosomes / S.M. Kilbride, J.E. Telford, K.F. Tipton et al. // Neurochem. – 2008. – V. 106 (№ 2). – P. 826–834.
25. Kislinger T. Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcriptomic profiling / T. Kislinger, B. Cox, A. Kannan

et al. // Cell. – 2006. – V. 125. – P. 173–186.
26. Kumar A. Subcellular localization of the yeast proteome / A. Kumar, S. Agarwal, J.A. Heyman et al. // Genes Dev. – 2002. – V. 16. – P. 707–719.
27. Larsson N.G. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice / N.G. Larsson, J. Wang, H. Wilhelmsson et al. // Nat. Genet. – 1998. – V. 18 (№ 3). – P. 231–236.
28. Longley M.J. The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276 (№ 42). – 38555–62.
29. Lopez M.F. High-throughput pro- filing of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation / M.F. Lopez, B.S. Kristal, E. Chernokalskaya et al. // Electrophoresis. – 2000. – V. 21. – 3427–40.
30. MacKenzie J.A., Payne R.M. Mitochondrial Protein Import and Human Health and Disease // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – № 5. – P. 509–523.
31. McCulloch V., Seidel-Rogol B.L., Shadel G.S. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine // Mol. Cell. Biol. – 2002. – V. 22. – P. 1116–1125.
32. Milenkovic D. Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria / D. Milenkovic, T. Ramming, J.M. Muller, et al. // Mol. Biol. Cell. – 2009. – 20:2530–39.
33. Miyadera H. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) / H. Miyadera, K. Shiomi, H. Ui et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100. –P. 473–477.
34. Mootha V.K. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria / V.K. Mootha, J. Bunkenborg, J.V. Olsen et al. // Cell. – 2003. – V. 115. – P. 629–640.
35. Nicholls D.G. Forty years of Mitchell's proton circuit: From little grey books to littlegrey cells // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – V. 1777. – P. 550–556.
36. Principe S. Identification of prostate-enriched proteins by in-depth proteomic analyses of expressed prostatic secretions in urine / S. Principe, Y. Kim, S. Fontana et al. // J. Proteome Res. – 2012. – V. 11 (№ 4). – P. 2386–2396.
37. Rajapakse N. Isolation and characterization of intact mitochondria from neonatal rat brain / N. Rajapakse, K. Shimizu, M. Payne et al. // Brain Res. Protoc. – 2001. – V. 8 (№ 3). – P. 176–183.
38. Ruiz-Pesini E. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny / E. Ruiz-Pesini, M.T. Lott, V. Procaccio et al. // Nucleic Acids Res. – 2007. – V. 35. – P. 823–828.
39. Sun F. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II / F. Sun, X. Huo, Y. Zhai et al. // Cell. – 2005. – V. 121. – P. 1043–1057.
40. Takamatsu C. Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein / C. Takamatsu, S. Umeda, T. Ohsato et al. // EMBO Rep. – 2002. – V. 3 (№ 5). – P. 451–456.
41. Taylor S.W. Characterization of the human heart mitochondrial proteome / S.W. Taylor, E. Fahy, B. Zhang et al. // Nat. Biotechnol. – 2003. – V. 21. – P. 281–286.
42. Taylor R.W. Molecular basis for treatment of mitochondrial myopathies / R.W. Taylor, T.M. Wardell, R.N. Lightowlers et al. // Neurol. Sci. – 2000. – V. 21. – P. 909–912.
43. Theodossiou T.A. Papakyriakou A., Hothersall J.S. Molecular modeling and experimental evidence for hypericin as a substrate for mitochondrial complex III; mitochondrial photodamage as demonstrated using specific inhibitors // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – V. 45 (№11). – P. 1581–1590.
44. Thiele I. Candidate metabolic network states in human mito- chondria / I. Thiele,

N.D. Price, T.D. Vo et al. // J. Biol. Chem. [Impact of diabetes, ischemia, and diet]. – 2005. – V. 280. – 11683–95.

45. Vo T.D., Greenberg H.J., Palsson B.O. Reconstruction and functional characterization of the human mitochondrial metabolic network based on proteomic and biochemical data // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – 39532–40.
46. Wharton D.C., Tzagoloff A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. Methods Enzymol. – 1967. – V. 10. – P. 245–250.
47. Yip Y.L. Annotating single amino acid polymorphisms in the UniProt/Swiss-Prot knowledgebase / Y.L. Yip, M. Famiglietti, A. Gos et al. // Hum. Mutat. – 2008. – V. 29 (№ 3). – P. 361–366.
48. Zapata I., Zerby H.N., Wick M. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential // J. Agric. Food Chem. – 2009. – V. 10. – V. 57 (№ 11). – P. 4956–63.