

НАСЛЕДОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© А. Ю. Физикова

Санкт-Петербургский государственный университет;
электронный адрес: fizikova@gmail.com

В обзоре рассмотрены основные механизмы регуляции наследования митохондрий у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучение генетических механизмов наследования функционально активных митохондрий эукариотических клеток — одна из самых актуальных тем современных исследований. Выявлено множество генетических заболеваний человека, связанных с нарушениями функций митохондрий. Пластичность метаболизма эукариотической клетки в ответ на изменения окружающей среды определяется адекватным функционированием митохондрий, что происходит прежде всего за счет регуляции синтеза АТФ, накопления активных форм кислорода, регуляции апоптоза и является необходимым условием адаптации клетки при стрессорном воздействии физических или химических факторов. Механизмы деления и распределения митохондрий высоко консервативны в ряду от одноклеточных микроорганизмов до человека. Дрожжи *S. cerevisiae* являются идеальным модельным объектом для исследования митохондрий вследствие лабильности энергетического обмена и способности переключаться с аэробного дыхания на брожение, а также жизнеспособности клеток как с мутациями, так и полностью утративших митохондриальную ДНК (мтДНК). Для обеспечения устойчивости клеток к стрессорным воздействиям и выживания дрожжей в постоянно меняющихся условиях окружающей среды необходима коррекция метаболических процессов. Было продемонстрировано влияние дыхательного, углеродного, аминокислотного и фосфатного метаболизма на осуществление функций митохондрий. Высокая степень консервативности механизмов стабилизации функций митохондрий и мтДНК позволяет проецировать полученные закономерности на системы высших эукариот и приближает нас к пониманию этиологии и патогенеза многих заболеваний человека.

Ключевые слова: дрожжи, митохондрия.

Принятые сокращения: АН — адениловые нуклеотиды, МП — мембранный потенциал, мтДНК — митохондриальная ДНК, Φ_n — неорганический фосфат.

Строение и динамика митохондрий в ходе клеточного цикла

Динамично протекающие процессы слияния и деления митохондрий обеспечивают лабильность хондриома и регуляцию функций органелл за счет механизмов генетического контроля структуры и функционирования митохондрий в соответствии с потребностями клетки в АТФ (Bereiter-Nahn, Vöth, 1994). Тонкая структура митохондрий дрожжей принципиально не отличается от органелл высших млекопитающих. Размеры и морфология крист зависят от энергетических потребностей клетки, типа обмена веществ и стадии роста культуры (Raumgard et al., 2002). Размеры и форма митохондрий изменяются в соответствии с условиями в цитоплазме: они могут активно делиться и разветвляться, сливаться или уменьшаться в размере. Ядерные и митохондриальные деления имеют четкую корреляцию, конец делений митохондрий приходится на середину S-фазы. Распределение митохондрий между материнской и дочерней клетками происходит в течение фаз S и G₂, в результате около половины митохондрий наследуется дочерней клеткой (рис. 1).

Основными компонентами слияния и деления митохондрий являются мембранные белки Mmm1, Mdm10,

Mdm12 и Mmm2, образующие структуру мембранного митохора (Burgess et al., 1994; Sogo, Yaffe, 1994). Митохор связывает митохондрии и мтДНК с актиновыми тяжами, что обеспечивает контролируемое передвижение органелл и их ДНК в клетке (Simon et al., 1995). Для образования трубчатых структур митохондрий и наследования мтДНК необходимы также белки внутренней мембраны митохондрий — Mdm31 и Mdm32, которые взаимодействуют с комплексом мембранного митохора через Mmm1p. Делеции *MDM10*, *MDM12*, *MMM1* и *MMM2* летальны на фоне делеций генов *MDM31* и *MDM32*. Делеции генов *mmm1*, *mdm10*, *mdm12* или *mmm2* приводят к характерному изменению морфологии органелл — образованию гигантских круглых деполяризованных митохондрий (Dimmer et al., 2005).

Предложено несколько моделей, объясняющих деление митохондрий, с участием белков Dnm1, Fis1, Mdv1, Caf4 и Mdm33 (Danino, Hinshaw, 2001; Tieu et al., 2002). Первым идентифицированным белком-регулятором деления митохондрий стал динаминоподобный белок с ГТФ-азной активностью Dnm1 (Bleazard et al., 1999). Делеции гена *DNM1* приводят к образованию сложной сети неразделенных митохондрий. Сходным фенотипом обладают и штаммы с делецией гена *FIS1*, кодирующего ин-

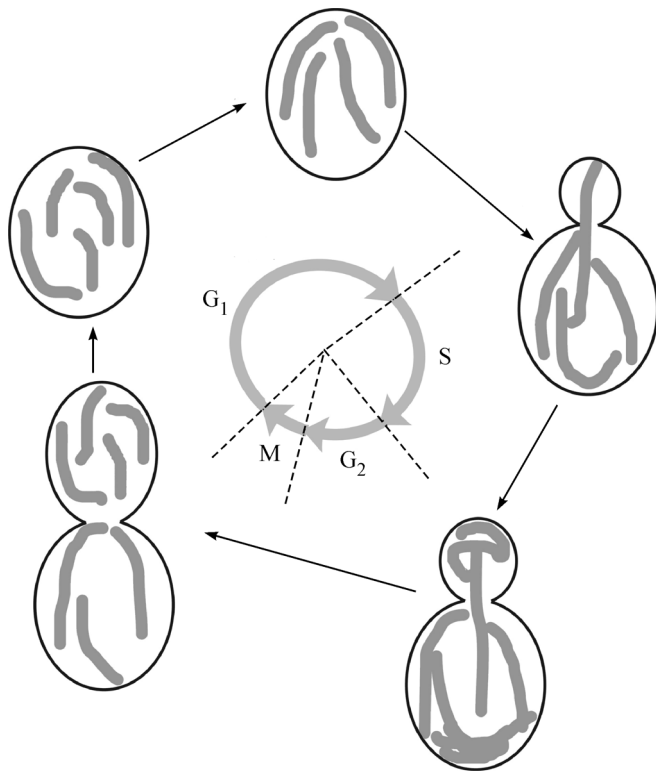


Рис. 1. Распределение митохондрий в ходе клеточного цикла (по: Boldogh et al., 2001, с изменениями).

тегральный белок наружной мембраны митохондрий (Mozdy et al., 2000). Штаммы с делециями *mdv1*, *caf4* или *mdm33* имеют измененную структуру митохондрий с нарушенным разделением и наследованием органелл (Tieu, Nunnari, 2000; Griffin et al., 2005). Основными регуляторами слияния митохондрий у дрожжей являются ГТФазы наружной и внутренней мембран митохондрий Fzo1 и Mgm1 соответственно, а также белок наружной мембраны Ugo1 (Shepard, Yaffe, 1999). Белок Mgm1 присутствует в клетке в двух формах: полноразмерный белок интегрирован в мембрану митохондрий, а укороченная форма связывается только с внутренней мембраной. «Длинная» форма белка участвует как в слиянии органелл, так и в тубуляции митохондрий. При этом только «укороченная» форма Mgm1p может взаимодействовать с Ugo1p и Fzo1p (Sesaki et al., 2003). Образование укороченной формы Mgm1p происходит за счет действия протеазного комплекса внутренней мембраны Pcp1p/ Rbd1p/ Ugo2p. Процессинг Mgm1p зависит от мембранного потенциала (МП) митохондрий. Следовательно, на этом уровне морфология органеллы и развитие крист внутренней мембраны могут регулироваться энергетическим состоянием клетки (Herlan et al., 2004).

Процесс слияния митохондрий можно разделить на три этапа — фиксация органелл, слияние наружных и слияние внутренних мембран органелл. За осуществление первого этапа отвечает белок Fzo1, который фиксирует две митохондрии друг относительно друга с помощью биспиральных (coiled-coil) доменов (Koshiba et al., 2004). В месте контакта происходит соприкосновение наружной и внутренней мембран митохондрий в результате связывания белков Fzo1 и Mgm1 белком Ugo1 (Sesaki, Jensen, 2001). Слияние мембран зависит от присутствия ГТФ. Белок Mdm30p контролирует содержание Fzo1p в наружной

мембране. Комплексы инактивированных белков Fzo1 отправляются на убиквитинзависимую протеолитическую деградацию, что ведет к слиянию органелл. Мутации гена, кодирующего необходимую для протеолиза субъединицу протеосомы Rpn1p, приводят к фрагментации митохондрий, что, возможно, происходит за счет нарушения деградации Fzo1p (Sesaki, Jensen, 1999).

Структурную и функциональную организацию ее мембран во многом определяет белковый состав ее мембран. Наибольшее количество белков внутренней мембраны митохондрий представляют компоненты различных транспортных систем.

Транспортные системы митохондрий

Необходимым условием протекания хемиосмотического протонного цикла митохондрий является адекватное функционирование митохондриальных систем транспорта метаболитов. Внутренняя мембрана митохондрий легко проницаема только для некоторых соединений, например для кислорода, углекислого газа и аммиака, поступление других метаболитов из цитоплазмы должно точно регулироваться для поддержания гомеостаза органелл. Среди большого количества идентифицированных транспортных систем митохондрий наиболее изученными являются переносчики адениловых нуклеотидов (АН) и фосфата.

Транспорт адениловых нуклеотидов. Переносчики АН являются избыточными белками внутренней мембраны митохондрий (Klingenberg, 1985). Обмен АТФ/АДФ представляет собой последний этап окислительного фосфорилирования. Блокирование транспорта АН приводит к ингибированию окислительного фосфорилирования, повышению концентрации перекиси водорода и фрагментации мтДНК (Esposito et al., 1999). У дрожжей *S. cerevisiae* переносчики АН кодируют три гена — *AAC1*, *AAC2* и *AAC3* (Lawson, Douglas, 1988). Основным переносчиком является Aac2p, который обладает высоким сродством к АН (Gawaz et al., 1990). Aac1p, Aac2p и Aac3p необходимы только при анаэробном росте, но не в условиях дерепрессии митохондрий (Drgon et al., 1991). *AAC3* экспрессируется исключительно в анаэробных условиях (Kolarov et al., 1990). Ген *AAC1* на средах с глюкозой имеет очень низкий уровень экспрессии, а экспрессия *AAC3* подавлена полностью. Одиночные делеции *aac1* или *aac3* не приводят к каким-либо дефектам роста, тогда как штаммы $\Delta aac2$, $\Delta aac1\Delta aac2$ и $\Delta aac1\Delta aac2\Delta aac3$ дыхательно-некомпетентны (не способны расти на средах, содержащих несбраживаемые источники углерода), при этом $\Delta aac2$ летален для дрожжей в условиях дерепрессии митохондрий.

Следует отметить, что штаммы $\Delta aac1\Delta aac2\Delta aac3$ жизнеспособны на средах с глюкозой, но только в анаэробных условиях (Drgon et al., 1991). Нежизнеспособность штаммов $\Delta aac2$ супрессируется при сверхэкспрессии гена *SAL1*, но при этом не происходит восстановления роста штаммов на неферментируемых источниках углерода. Ген *SAL1* кодирует еще один митохондриальный переносчик АТФ (АТФ-Mg/Ф_n). Экспрессия гена *SAL1* конститутивна и не зависит от источника углерода (Kucejova et al., 2008). Было показано, что данная система транспорта зависит от кальция и либо переносит АТФ совместно с катионами магния, либо осуществляет антипорт АТФ, АДФ с фосфатами митохондрий (Traba et al.,

2008), т. е. белок Sal1 дублирует функцию транспорта АН Аас2р, хотя при этом механизмы транспорта различаются. Переносчики Аас1р, Аас2р и Аас3р катализируют некомпенсированный по заряду обмен АН, их активность регулируется трансмембранным потенциалом таким образом, что они преимущественно катализируют обмен АДФ цитоплазмы на АДФ митохондрий, а не наоборот. Система транспорта АДФ-Mg/ Φ_n , напротив, осуществляет электротранспортный обмен (Fiermonte et al., 2004).

Транспорт фосфата. Среди транспортных систем митохондрий первой была идентифицирована и охарактеризована система переноса фосфата (Chappell, Crofts, 1965). Функции переносчика фосфата в митохондриях дрожжей *S. cerevisiae* выполняет бифункциональный белок Mir1р (Murakami et al., 1990). Помимо транспорта фосфата в митохондрии Mir1р опосредованно влияет на транспорт белков в органеллу, регулируя МП митохондрий. У штаммов $\Delta mir1$ нарушен транспорт фосфата и предшественников митохондриальных белков из цитоплазмы, снижен МП. Мутанты *mir1* имеют дыхательно-некомпетентный фенотип из-за частой потери мтДНК. Искусственное восстановление МП митохондрий добавлением 5 мМ АДФ приводит к возобновлению нормального транспорта белков, но не фосфата (Zara et al., 1996). Интересно, что добавление специфического ингибитора переносчиков фосфата мерсалила предотвращает формирование МП в митохондриях дрожжей, что говорит о непосредственной участии этой системы транспорта в поддержании МП (De Chateaubodeau et al., 1974). Транспорт Φ_n в митохондрии осуществляет также белок Dic1, но основная его функция в клетке заключается в транспорте сукцинатов глиоксилатного шунта в митохондрии для дальнейшего их преобразования в цикле Кребса, при этом и осуществляется антипорт Φ_n (Kakhniashvili et al., 1997).

Все системы транспорта митохондрий тесно взаимодействуют друг с другом и регулируют гомеостаз органеллы и стрессоустойчивость клеток, регулируя не только химический состав матрикса митохондрий, но и опосредованно влияя на стабильность мтДНК. Так, была продемонстрирована зависимость наследования мтДНК от концентрации фосфата в цитоплазме клетки (Физикова и др., 2009). Многофункциональная протеинкиназа Pho85р участвует в регуляции как прохождения клетки через фазу G₁/S клеточного цикла, так и в контроле полярности клеток, экспрессии генов метаболизма фосфата и сигнальной трансдукции. Штаммы с делецией *pho85* характеризуются рядом плейотропных эффектов, таких как конститутивный синтез репрессибельной кислой фосфатазы, медленный рост с задержкой в фазе G₁, измененная морфология клеток, дефекты споруляции, нарушения полярности клеток, обусловленные нерегулярными делениями, деполаризацией и изменением структуры актинового цитоскелета, дефектами эндоцитоза, а также наблюдается частое возникновение дыхательно-некомпетентных клонов (Cargoll, O'Shea, 2002; Самбук и др., 2005).

При отсутствии Pho85р транскрипционный фактор Pho4р постоянно находится в ядре и активирует транскрипцию генов *PHO* регулона, в том числе и пермеаз Φ_n , в результате чего в клетке повышается концентрация Φ_n . Для обеспечения потребностей клетки достаточно миллимолярных концентраций Φ_n , повышение его уровня может приводить к ряду негативных для клетки эффектов, таких как изменение электрохимического градиента плазматической и митохондриальной мембран (Fristedt et al.,

1996), активация сигнального пути ПКА (Giots et al., 2003) и пр.

Варьирование уровня Φ_n в среде ведет к изменениям физиологии клетки, влияет на синтез АДФ, репликацию ДНК, секвестрирование и хранение катионов, формирование мембранных каналов, регуляцию активности многих генов и ферментов. На фоне дизрупции гена *PHO85* в процессе митотических делений постепенно снижается количество мтДНК в дочерних клетках, что не обеспечивает полноценного роста клеток на среде с глицерином. При возникновении у штаммов *pho85* компенсаторных мутаций в генах, влияющих на транспорт фосфата (*PHO84* и *PHO87*), и в генах, регулирующих их транскрипцию (*PHO81* и *PHO4*), происходят снижение концентрации Φ_n в цитоплазме, восстановление способности роста клеток на среде с глицерином и стабилизация мтДНК (Физикова и др., 2009).

Мембранный потенциал митохондрий

Для выживания клеток дрожжей необходимы только пять белков митохондрий, кодируемых ядерными генами. Все эти белки являются ключевыми регуляторами митохондриальных транспортных систем (Baker, Schatz, 1991). Для нормального функционирования транспортных систем митохондрий необходимым условием является наличие МП и некоторого количества АДФ в матриксе митохондрий. В аэробных условиях МП митохондрий формируется в результате симпорта протонов в межмембранное пространство в процессе передачи электронов по компонентам электронно-транспортной цепи (по трем липопротеидным комплексам). У дрожжей нет аналогичного млекопитающим комплекса I (НАД⁺-убихинон-редуктазы), и НАД⁺ окисляется НАД⁺-дегидрогеназами. Протонными помпами служат только комплексы III (убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктазы) и IV (цитохромоксидазы). Возвращение протонов в матрикс митохондрий происходит за счет F₀F₁H⁺-АДФ-синтетазы, после чего АДФ транспортируется в цитоплазму через переносчики АДФ/АТФ в обмен на АДФ или Φ_n (в зависимости от системы транспорта). Так как свободная форма АДФ несет четыре отрицательных заряда, а АДФ — три, экспорт АДФ более предпочтителен для сохранения МП митохондрий (рис. 2, а).

В анаэробных условиях (рис. 2, б) дыхание невозможно, и включаются другие механизмы — как получения АДФ, так и обеспечения МП. АДФ, синтезируемая в результате гликолиза, поступает из цитоплазмы с помощью переносчика АДФ/АТФ, после чего гидролизует F₀F₁H⁺-АДФ-синтетазой. Гидролиз АДФ сопровождается выходом протонов в межмембранное пространство. Подобным образом МП поддерживается и в случае аэробного роста на глюкозе, когда импорт АДФ происходит за счет функционирования АДФ-Mg/ Φ_n -переносчика, который обменивает фосфат митохондрий на АДФ цитоплазмы (Aprille, 1993). Функционирование переносчика АДФ-Mg/ Φ_n не вносит вклада в образование МП в отличие от переносчика АДФ/АТФ. Субъединицы 6, 8 и 9 F₀ фактора F₀F₁H⁺-АТФазы кодируются мтДНК, поэтому в случае потери мтДНК (рис. 2, в) гидролиз АДФ F₁ фактором F₀F₁H⁺-АТФазы не сопровождается транспортом протонов в матрикс митохондрий. Отсутствие активности F₁H⁺-АТФазы приводит к потере МП и блокированию роста и деления клеток (Giraud, Velours, 1997).

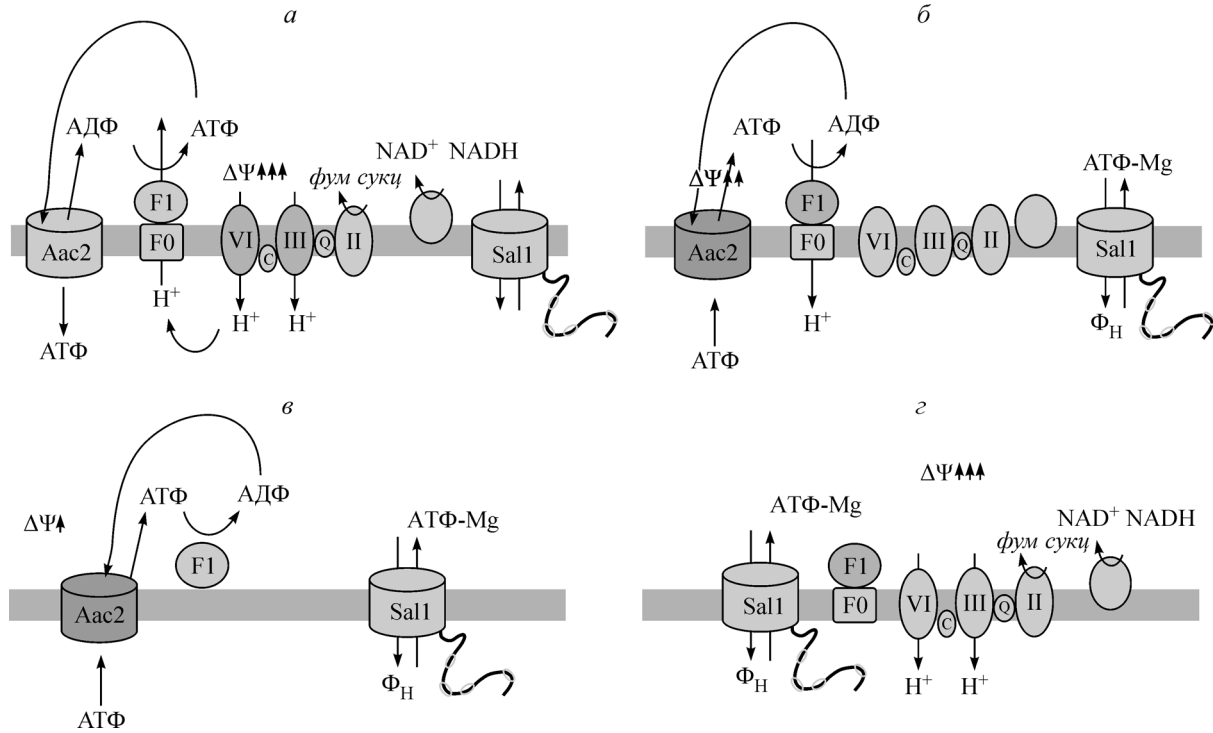


Рис. 2. Регуляция мембранного потенциала и концентрации АТФ в митохондриях у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (по: Traba et al., 2009, с изменениями).

a — дыхание, *б* — брожение, *в* — отсутствие мтДНК, *г* — отсутствие АДФ/АТФ-транспортеров ($\Delta aac2$). Используются общепринятые сокращения, а также: *фум* — фумарат; *сукц* — сукцинат; $\Delta\Psi$ — изменение мембранного потенциала; *стрелками* показаны транспортные потоки.

Так, многие *petite*-негативные виды дрожжей, например *Kluyveromyces lactis*, характеризуются меньшим средством фактора F_1H^+ -АТФазы к АТФ (Clark-Walker, 2003), т. е. F_1H^+ -АТФаза и переносчик АДФ/АТФ играют ключевую роль в образовании МП клеток без мтДНК. В отсутствие переносчика АДФ/АТФ ($\Delta aac2$) АТФ попадает в митохондрии только за счет Sal1p, а МП должен поддерживаться протонными помпами дыхательных комплексов, при этом оба процесса становятся жизненно необходимыми (Kucejova et al., 2008) (рис. 2, г).

Таким образом, строгая регуляция и функционирование митохондриального транспорта являются необходимым условием сохранения МП и как следствие — обеспечения стабильности мтДНК, структуры и функций митохондрий, жизнеспособности клетки.

Механизмы распределения митохондрий между материнской и дочерней клетками

Митохондрии не могут быть синтезированы *de novo* и передаются от материнской клетки дочерней, поэтому особое значение приобретают механизмы равномерного распределения и наследования в ходе клеточного цикла как самих органелл, так и их генетического материала (Yang et al., 1999). Ключевую роль в наследовании митохондрий играет структура актинового цитоскелета. Актиновый цитоскелет чрезвычайно динамичен и состоит из структурных и регуляторных элементов. К основным структурным компонентам актинового цитоскелета дрожжей относятся актин, тропомиозин, фимбрин и профилин (Young et al., 2004). Фундаментальные процессы динамики и регуляции актинового цитоскелета сходны у всех эукариотических организмов.

Дестабилизация актинового цитоскелета дрожжей мутациями гена *ACT1*, кодирующего актин, или обработкой ингибитором полимеризации актина латрункулином А приводит к накоплению клеток с дефектами морфологии и транспорта митохондрий (Simon et al., 1995). Тропомиозин представляет собой интегральный компонент цитоскелета клеток, стабилизирующий структуры актиновых тяжей и узлов. У *S. cerevisiae* идентифицированы два гена, кодирующих тропомиозин: *TPM1* и *TPM2* (Backer, Foury, 1985). Большая часть тропомиозина клетки является продуктом гена *TPM1*, мутации в котором приводят к нарушению сборки актиновых тяжей, а также к дефектам почкования и деления клетки (Drees et al., 1995). Мутации в гене *TPM1* повышают частоту появления дыхательно-некомпетентных клеток. Взаимодействие тропомиозина и F-актина осуществляется при помощи белка Mdm20, который влияет на ацетилирование N-конца Trpm1p ацетилтрансферазой NatB (Polevoda et al., 2003). Мобильность структуры актиновых тяжей обеспечивается взаимодействием с тропомиозинами комплекса кофилинов Cof1p (Iida et al., 1993). Белок профилин Pfy1 катализирует полимеризацию актина (Naager et al., 1996).

В состав актинового цитоскелета дрожжей входят по крайней мере 103 белка, формирующих структуры, функционально и морфологически существенно отличающиеся друг от друга: кортикальные бляшки, актиновые тяжи, цитокинетическое (актомиозиновое) кольцо и кэп (Chant, Pringle, 1995; Lew, Reed, 1995). Каждая из структур выполняет различные функции. Так, актиновые бляшки связаны с инвагинациями плазматической мембраны и содержат множество белков, вовлеченных в эндоцитоз (Mulholland et al., 1994). Актиновые бляшки служат посредниками между структурами плазматической мембраны и экстраклеточным материалом, а актиновые тяжи

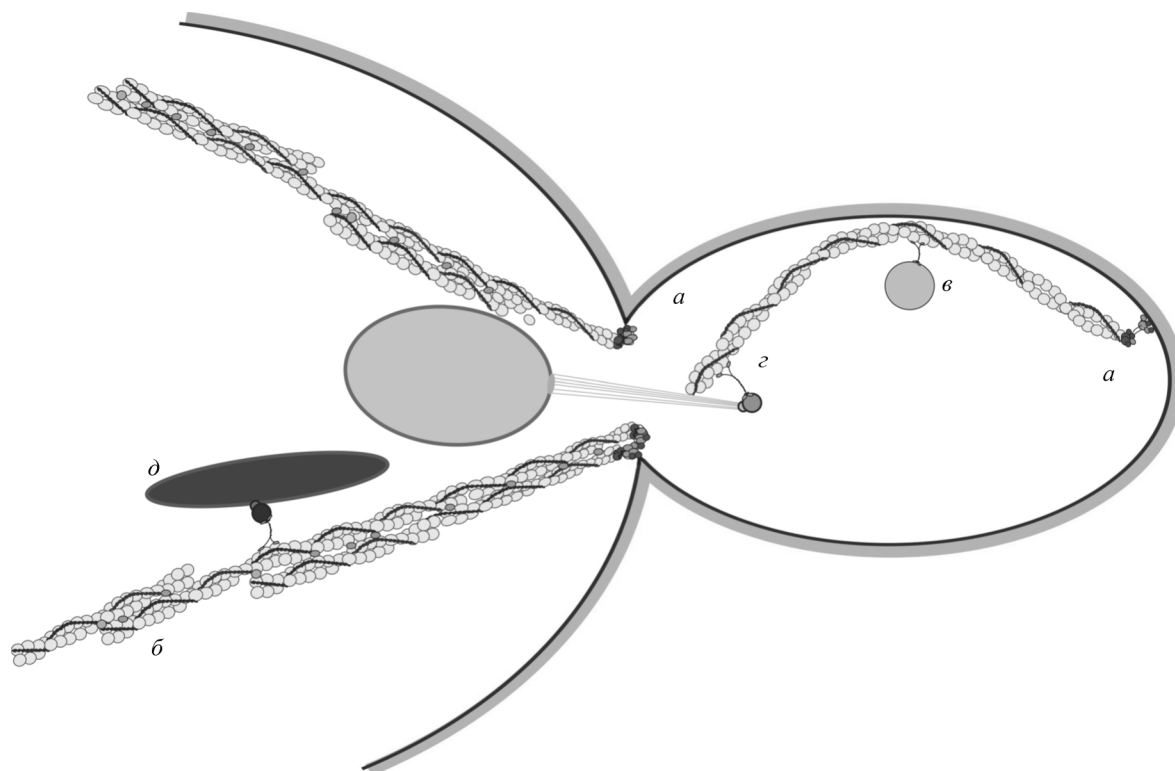


Рис. 3. Основные компоненты актинового цитоскелета, участвующие в транспорте органелл дрожжей (по: Evangelista et al., 2003, с изменениями).

a — формы Vni1p, Vnr1p и комплекс Arp2/3p, отвечающие за сборку и поляризацию актиновых тяжей и локализованные на кончике и шейке почки; *b* — актиновые тяжи стабилизированы тропомиозином и фибрином; *c* — Myo2p транспортирует секреторную везикулу от аппарата Гольджи в почку; *d* — Myo2p-зависимая поляризация ядра между материнской и дочерними клетками; *δ* — Mmm1p и Mdm10p транспортируют митохондрии от материнской клетки к дочерней при помощи моторных белков.

отвечают за внутриклеточную динамику, например транспорт и экзоцитоз везикул, а также определяют направление транспорта органелл (Hwang et al., 2003). Формирование актиновых бляшек тесно связано с регуляцией полимеризации актина комплексом нуклеации актина Arp2p/3p и белками Cap1/2, которые фиксируют «острый» конец филаментов и препятствуют дальнейшей полимеризации актина (Amatruda et al., 1990).

В среднем актиновая бляшка содержит 85 филаментов актина (Young et al., 2004). Актиновые бляшки располагаются в районах экзоцитоза в растущих клетках и необходимы для нормального роста и поляризации клеток (Carlsson et al., 2002).

Актомиозиновое кольцо формируется в шейке почки и играет ключевую роль в процессе отпочковывания. Основными компонентами кольца являются F-актин, миозин II и формины (Pruyne et al., 2002). Локализация актомиозинового кольца зависит от организации белков септинов вокруг сайта почкования (Roh et al., 2002; Norden et al., 2004).

Актиновые тяжи и кэп отвечают за большинство событий поляризации в клетке, включая наследование органелл и ориентацию митотического веретена. Митохондрии также мигрируют по актиновым тяжам и используют в качестве мотора белки немиозиновой природы. Митохондрии соединяются с моторным белком посредством промежуточных белков Mmm1p и Mdm10p (Simon et al., 1995; Catlett, Weisman, 1998) (рис. 3).

Нарушение регуляции и структуры актинового цитоскелета прежде всего негативно сказывается на поляризации клетки. Нарушения поляризации клеток у дрожжей

можно разделить на три класса. К первому классу нарушения относится секреторный блок, в результате которого нарушаются рост и синтез клеточной стенки. Ко второму — дефекты тяжей актина, ведущие к неправильной ориентации везикул, изотропному росту и синтезу клеточной стенки. Таким фенотипом обладают штаммы с мутациями *myo2*, *tpm1* или Δ *tpm2*, а также *cdc42* и *cdc24*, что свидетельствует в пользу участия продуктов этих генов в регуляции актинового цитоскелета (Pruyne et al., 2004). Так, ген *CDC42* кодирует ГТФазу, отсутствие которой в клетке приводит к дефектам организации актина и септинов, а *Cdc24p* служит ГДФ-освобождающим фактором для ГТФазы *Cdc41p* (Pruyne, Bretscher, 2000). Третий класс нарушений — это дефекты актиновых бляшек, которые обычно приводят к блоку эндоцитоза. У мутантов Δ *myo3*, Δ *myo5* и Δ *sla2* скопление факторов синтеза клеточной стенки приводит к формированию многослойной клеточной стенки у материнской клетки (Pruyne, Bretscher, 2000). При таких нарушениях клетка, как правило, становится осмочувствительной. Трансмембранный актинсвязывающий белок *Slal* представляет собой адаптер между актином и клатрином (рис. 4).

Формирование различных структур цитоскелета в дрожжевых клетках контролируется внутри- и внеклеточными сигналами и координируется в соответствии со стадией клеточного цикла: на ранней стадии G_1 актиновые бляшки равномерно распределены по всему кортексу непляризованных клеток, а на стадии G_2 они локализируются у шейки и в самой почке (Norden et al., 2004). Важную роль в регуляции динамики цитоскелета могут играть процессы фосфорилирования—дефосфорилирования бел-

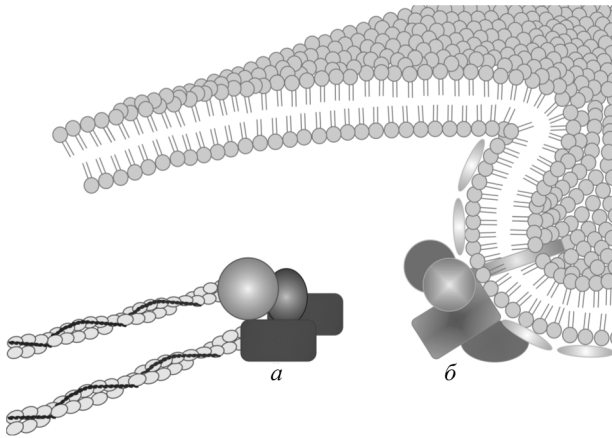


Рис. 4. Схема строения цитоскелета при эндоцитозе (по: Smythe, Ayscough, 2003, с изменениями).

а — регуляторные белки цитоскелета комплекс Arp2/3, Las17, Abp1 и киназа Prk1p; *б* — компоненты эндоцитоза, белки Sla1p, Sla2p, Pan1p, End3p; узкие овалы — клатрин, стержень — «груз».

ков, входящих в его состав. Например, киназы Prk1p, Ark1p и Akl1p участвуют в регуляции кортикального цитоскелета, регулируя его динамику при эндоцитозе (Zeng et al., 2001). Мутации в гене *PTC1*, структурном гене серин-треониновой киназы, приводят к задержке переноса митохондрий в дочернюю почку (Roeder et al., 1998). Киназа Tor2 участвует в регуляции поляризации актинового цитоскелета при росте и делении клеток (Schmidt et al., 1998). Циклинзависимые протеинкиназы Pho85 и Cdc28 также участвуют в поляризации клетки. Отсутствие протеинкиназы Pho85 сопровождается изменением спектра термостабильной фракции белков цитоскелета, что приводит к увеличению числа актиновых бляшек (Самбук и др., 2005; Физикова и др., 2009). Клетки мутантов *cdc28* и *pho85* характеризуются разнообразными дефектами морфологии: нарушением отпочковывания дочерних клеток, образованием удлинённых почек и крупных круглых деполаризованных клеток. Такой фенотип может быть следствием отсутствия фосфорилирования как общих, так и уникальных субстратов каждой из протеинкиназ. К общим субстратам, которые участвуют в поляризации клетки, принадлежат, например, Cdc24p, ГТФаза Rga2p, регуляторные белки Voi1, Voi2, септин Shs1p и белок шейки почки Vni4 (Bose et al., 2001; McCusker et al., 2007). Кроме того, возможно осуществление поляризации через

уникальные субстраты для каждой из киназ. Для Pho85р такими субстратами являются белки-гомологи амфифизинов млекопитающих Rvs161 и Rvs167. Белки Rvs167p и Rvs161p участвуют в регуляции актинового цитоскелета посредством блокирования активатора комплекса Arp2/3, белка Las17p (Floyd et al., 2001).

Движение митохондрий по актиновому цитоскелету

Механизм передвижения митохондрий по актиновому цитоскелету имеет много общих черт с механизмом передвижения бактериального патогена *Listeria monocytogenes* в цитоплазме инфицированной клетки. Как и митохондрии дрожжей, листерия передвигается по цитоплазме при помощи комплекса нуклеации актинового цитоскелета Arp2/3. Но в отличие от случайно-направленных движений листерии митохондрии передвигаются четко по поляризованному относительно оси почкования цитоскелету. Направленная поляризация цитоскелета достигается за счет белков формин, которые локализуются в почке и служат платформой для сборки актиновых тяжей по направлению к материнской клетке. При делении клеток митохондрии используют актиновый цитоскелет и для anterograde, и для retrograde передвижения (Boldogh, Pon, 2006). Если retrograde транспорт к материнской клетке осуществляется пассивно, то для anterograde транспорта к почке требуется энергия для преодоления retrograde потока (Fehrenbacher et al., 2004). Для обеспечения энергией процесса транспорта таких мембранных органелл, как пероксисомы, вакуоли, везикулы аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума, используются моторные белки Myo2. Для обеспечения anterograde транспорта митохондрий необходимо участие нескольких моторных белков — Myo2, комплекса Arp2/3 и Rho-ГТФазы Gem1 (Fransson et al., 2003; Boldogh et al., 2005; Frederick, Shaw, 2007). В отличие от всех остальных моторных белков комплекс Arp2/3 определяет подвижность органеллы, а не направленность ее транспорта. Направленность транспорта обеспечивает присоединение митохондрий к актиновому цитоскелету через моторный комплекс Myo2p/Myo4p и мембранный митохондриальный белок Puf3 (Garcia-Rodriguez et al., 2007) (рис. 5).

Таким образом, в ходе клеточного цикла актиновые структуры определяют точки почкования, участвуют в

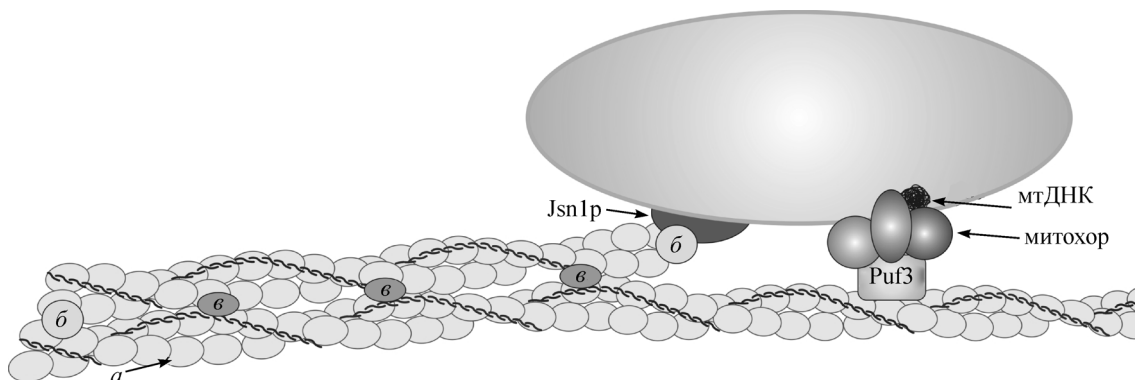


Рис. 5. Модель прикрепления митохондрий к актиновым тяжам.

а — актиновые тяжи, стабилизированные тропомиозином; *б* — комплекс Arp2/3, *в* — фибрин. Jsn1p, Puf3p — адаптерные белки.

процессе поляризационного роста, регулируют направление митотического веретена, образуют актомиозиновое кольцо, играющее важную роль в процессе цитокинеза, отвечают за распределение и наследование ряда клеточных органелл, таких как вакуоли и митохондрии, а также участвуют в регуляции наследования мтДНК (Singer et al., 2000). Избыточность регуляторных систем транспорта митохондрий повышает вероятность передачи дочерней клетке этих жизненно необходимых органелл.

Список литературы

- Самбук Е. В., Физикова А. Ю., Захарова К. В., Смирнов А. М., Падкина М. В. 2005. Отсутствие циклинзависимой фосфопротениназы Pho85p приводит к нарушению распределения митохондриальных нуклеотидов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Цитология. 47 (10) : 917—924.
- Физикова А. Ю., Падкина М. В., Самбук Е. В. 2009. Отсутствие циклинзависимой протениназы Pho85 влияет на стабильность митохондриальной ДНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Генетика. 45(6) : 745—752.
- Amatruda J. F., Cannon J. F., Tatchell K., Hug C., Cooper J. A. 1990. Disruption of the actin cytoskeleton in yeast capping protein mutants. Nature. 344 : 352—354.
- Aprille J. R. 1993. Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/P(i) carrier. J. Bioenerg. Biomembr. 25 : 473—481.
- Backer J., Foury F. 1985. Repair properties in yeast mitochondrial DNA mutators. Curr. Genet. 10 : 7—13.
- Baker K., Schatz G. 1991. Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria. Nature. 349 : 205—208.
- Bereiter-Hahn J., Vöth M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. Microsc. Res. Tech. 27 : 198—219.
- Bleazard W., McCaffery J. M., King E. J., Bale S., Mozdy A., Tieu Q., Nunnari J., Shaw J. M. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. Nat. Cell Biol. 1 : 298—304.
- Boldogh I. R., Fehrenbacher K. L., Yang H. C., Pon L. A. 2005. Mitochondrial movement and inheritance in budding yeast. Gene. 354 : 28—36.
- Boldogh I. R., Nowakowski D. W., Yang H. C., Chung H., Karmon S., Royes P., Pon L. A. 2003. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. Mol. Biol. Cell. 14 : 4618—4627.
- Boldogh I. R., Pon L. A. 2006. Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. Biochim. biophys. acta. 1763 : 450—462.
- Bose I., Irazoqui J. E., Moskow J. J., Bardes E. S., Zyla T. R., Lew D. J. 2001. Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. J. Biol. Chem. 276 : 7176—7186.
- Burgess S. M., Delannoy M., Jensen R. E. 1994. MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. J. Cell Biol. 126 : 1375—1391.
- Carlsson A. E., Shah A. D., Elking D., Karpova T. S., Cooper J. A. 2002. Quantitative analysis of actin patch movement in yeast. Biophys. J. 82 : 2333—2343.
- Carroll A. S., O'Shea E. K. 2002. Pho85 and signaling environmental conditions. Trends Biochem. Sci. 27 : 87—93.
- Catlett N. L., Weisman L. S. 1998. The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 14799—14804.
- Chant J., Pringle J. R. 1995. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 129 : 751—765.
- Chappell J. B., Crofts A. R. 1965. Gramicidin and ion transport in isolated liver mitochondria. Biochem. J. 95 : 393—402.
- Clark-Walker G. D. 2003. Kinetic properties of F1-ATPase influence the ability of yeasts to grow in anoxia or absence of mtDNA. Mitochondrion. 2 : 257—265.
- Danino D., Hinshaw J. E. 2001. Dynamin family of mechanoenzymes. Curr. Opin. Cell Biol. 13 : 454—460.
- De Chateaubodeau G., Guerin M., Guerin B. 1974. Studies on anionic transport in yeast mitochondria and promitochondria. Swelling in ammonium phosphate, glutamate, succinate and fumarate solutions. FEBS Lett. 46 : 184—187.
- Dimmer K. S., Jakobs S., Vogel F., Altmann K., Westermann B. 2005. Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. J. Cell Biol. 168 : 103—115.
- Drees B., Brown C., Barrell B. G., Bretscher A. 1995. Tropomyosin is essential in yeast, yet the TPM1 and TPM2 products perform distinct functions. J. Cell Biol. 128 : 383—392.
- Drgon T., Sabova L., Nelson N., Kolarov J. 1991. ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 289 : 159—162.
- Esposito L. A., Melov S., Panov A., Cottrell B. A., Wallace D. C. 1999. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 4820—4825.
- Evangelista M., Zigmond S., Boone C. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. J. Cell Sci. 116 : 2603—11.
- Fehrenbacher K. L., Yang H. C., Gay A. C., Huckaba T. M., Pon L. A. 2004. Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. Curr. Biol. 14 : 1996—2004.
- Fiermonte G., De Leonardis F., Todisco S., Palmieri L., Lasorsa F. M., Palmieri F. 2004. Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. J. Biol. Chem. 279 : 30722—30730.
- Floyd S. R., Porro E. B., Slepnev I., Ochoa G. C., Tsai L. H., De Camilli P. 2001. Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2. J. Biol. Chem. 276 : 8104—8110.
- Fransson A., Ruusala A., Aspenstrom P. 2003. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. J. Biol. Chem. 278 : 6495—6502.
- Frederick R. L., Shaw J. M. 2007. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. Traffic. 8 : 1668—1675.
- Fristedt U., Berhe A., Ensler K., Norling A., Persson B. L. 1996. Isolation and characterization of membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae* harboring the high-affinity phosphate transporter. Arch. Biochem. Biophys. 330 : 133—141.
- García-Rodríguez L. J., Gay A. C., Pon L. A. 2007. Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. J. Cell Biol. 176 : 197—207.
- Gawaz M., Douglas M. G., Klingenberg M. 1990. Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast. J. Biol. Chem. 265 : 14 202—14 208.
- Giots F., Donaton M. C., Thevelein J. M. 2003. Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 47 : 1163—1181.
- Giraud M. F., Velours J. 1997. The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho⁻ yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1. Eur. J. Biochem. 245 : 813—818.
- Griffin E. E., Graumann J., Chan D. C. 2005. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. J. Cell Biol. 170 : 237—248.
- Haarer B. K., Corbett A., Kweon Y., Petzold A. S., Silver P., Brown S. S. 1996. SEC3 mutations are synthetically lethal with pro-

filin mutations and cause defects in diploid-specific bud-site selection. *Genetics*. 144 : 495—510.

Herlan M., Bornhövd C., Hell K., Neupert W., Reichert A. S. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J. Cell Biol.* 165 : 167—173.

Hwang E., Kusch J., Barral Y., Huffaker T. C. 2003. Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J. Cell Biol.* 161 : 483—488.

Iida K., Moriyama K., Matsumoto S., Kawasaki H., Nishida E., Yahara I. 1993. Isolation of a yeast essential gene, *COF1*, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-M(r) actin-binding and depolymerizing protein. *Gene*. 124 : 115—120.

Kakhniashvili D., Mayor J. A., Gremse D. A., Xu Y., Kaplan R. S. 1997. Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product. *J. Biol. Chem.* 272 : 4516—4521.

Klingenberg M. 1985. Principles of carrier catalysis elucidated by comparing two similar membrane translocators from mitochondria, the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 456 : 279—288.

Kolarov J., Kolarova N., Nelson N. 1990. A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J. Biol. Chem.* 265 : 12711—12716.

Koshiba T., Detmer S. A., Kaiser J. T., Chen H., McCaffery J. M., Chan D. C. 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*. 305 : 858—862.

Kucejova B., Li L., Wang X., Giannattasio S., Chen X. J. 2008. Pleiotropic effects of the yeast *Sall1* and *Aac2* carriers on mitochondrial function via an activity distinct from adenine nucleotide transport. *Mol. Genet. Genomics*. 280 : 25—39.

Lawson J. E., Douglas M. G. 1988. Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of *AAC2*. *J. Biol. Chem.* 263 : 14812—14818.

Lew D. J., Reed S. 1995. I. A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J. Cell Biol.* 129 : 739—749.

McCusker D., Denison C., Anderson S., Egelhofer T. A., Yates J. R. 3rd, Gygi S. P., Kellogg D. R. 2007. Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* 9 : 506—515.

Mozdy A. D., McCaffery J. M., Shaw J. M. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151 : 367—380.

Mulholland J., Preuss D., Moon A., Wong A., Drubin D., Bostein D. 1994. Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 125 : 381—391.

Murakami H., Blobel G., Pain D. 1990. Isolation and characterization of the gene for a yeast mitochondrial import receptor. *Nature*. 347 : 488—491.

Norden C., Liakopoulos D., Barral Y. 2004. Dissection of septin actin interactions using actin overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 53 : 469—483.

Paumard P., Vaillier J., Coulary B., Schaeffer J., Soubannier V., Mueller D. M., Brèthes D., Di Rago J. P., Velours J. 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21 : 221—230.

Polevoda B., Cardillo T. S., Doyle T. C., Bedi G. S., Sherman F. 2003. Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB Nalpha-terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. *J. Biol. Chem.* 278 : 30 686—30 697.

Pruyne D., Bretscher A. 2000. Polarization of cell growth in yeast. *J. Cell Sci.* 113 : 571—585.

Pruyne D., Evangelista M., Yang C., Bi E., Zigmund S., Bretscher A., Boone C. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*. 297 : 612—615.

Pruyne D., Legesse-Miller A., Gao L., Dong Y., Bretscher A. 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. De Cell. De Biol.* 20 : 559—591.

Roeder A. D., Hermann G. J., Keegan B. R., Thatcher S. A., Shaw J. M. 1998. Mitochondrial inheritance is delayed in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the serine/threonine phosphatase *PTC1*. *Mol. Biol. Cell.* 9 : 917—930.

Roh D. H., Bowers B., Schmidt M., Cabib E. 2002. The septation apparatus, an autonomous system in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 2747—2759.

Schmidt A., Beck T., Koller A., Kunz J., Hall M. N. 1998. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.* 17 : 6924—6931.

Sesaki H., Jensen R. E. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147 : 699—706.

Sesaki H., Jensen R. E. 2001. *UGO1* encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 152 : 1123—1134.

Sesaki H., Southard S. M., Hobbs A. E., Jensen R. E. 2003. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 : 276—283.

Shepard K. A., Yaffe M. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* 144 : 711—720.

Simon R., Swayne T. C., Pon L. A. 1995. Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biol.* 130 : 345—354.

Singer J. M., Hermann G. J., Shaw J. M. 2000. Suppressors of *mdm20* in yeast identify new alleles of *ACT1* and *TPM1* predicted to enhance actin-tropomyosin interactions. *Genetics*. 156 : 523—534.

Smythe E., Ayscough K. R. 2003. The Ark1/Prk1 family of protein kinases. Regulators of endocytosis and the actin skeleton. *EMBO Rep.* 4 : 246—251.

Sogo L. F., Yaffe M. 1994. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 126 : 1361—1373.

Tieu Q., Nunnari J. 2000. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 151 : 353—366.

Tieu Q., Okreglak V., Naylor K., Nunnari J. 2002. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* 158 : 445—452.

Traba J., Froschauer E. M., Wiesenberger G., Satrustegui J., Del Arco A. 2008. Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi carrier Sallp, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose. *Mol. Microbiol.* 69 : 570—585.

Traba J., Satrustegui J., del Arco A. 2009. Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/Pi carrier. *Mitochondrion*. 9 : 79—85.

Yang H. C., Palazzo A., Swayne T. C., Pon L. A. 1999. A retention mechanism for distribution of mitochondria during cell division in budding yeast. *Curr. Biol.* 9 : 1111—1114.

Young M. E., Cooper J. A., Bridgman P. C. 2004. Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *J. Cell Biol.* 166 : 629—635.

Zara V., Dietmeier K., Palmisano A., Voza A., Rassow J., Palmieri F., Pfanner N. 1996. Yeast mitochondria lacking the phosphate carrier/p32 are blocked in phosphate transport but can import preproteins after regeneration of a membrane potential. *Mol. Cell Biol.* 16 : 6524—6531.

Zeng G., Yu X., Cai M. 2001. Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 3759—3773.

MITOCHONDRIA INHERITANCE IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE**A. Yu. Fizikova*St. Petersburg State University;
e-mail: fizikova@gmail.com

The review is devoted to the main mechanisms of mitochondria inheritance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The genetic mechanisms of functionally active mitochondria inheritance in eukaryotic cells is one of the most relevant in modern researches. A great number of genetic diseases are associated with mitochondria dysfunction. Plasticity of eukaryotic cell metabolism according to the environmental changes is ensured by adequate mitochondria functioning by means of ATP synthesis coordination, reactive oxygen species accumulation, apoptosis regulation and is an important factor of cell adaptation to stress. Mitochondria participation in important for cell vitality processes masters the presence of accurate mechanisms of mitochondria functions regulation according to environment fluctuations. The mechanisms of mitochondria division and distribution are highly conserved. Baker yeast *S. cerevisiae* is an ideal model object for mitochondria researches due to energetic metabolism lability, ability to switch over respiration to fermentation, and petite-positive phenotype. Correction of metabolism according to the environmental changes is necessary for cell vitality. The influence of respiratory, carbon, amino acid and phosphate metabolism on mitochondria functions was shown. As far as the mechanisms that stabilize functions of mitochondria and mtDNA are highly conserve, we can project yeast regularities on higher eukaryotes systems. This makes it possible to approximate understanding the etiology and pathogenesis of a great number of human diseases.

Key words: yeast, mitochondria.
