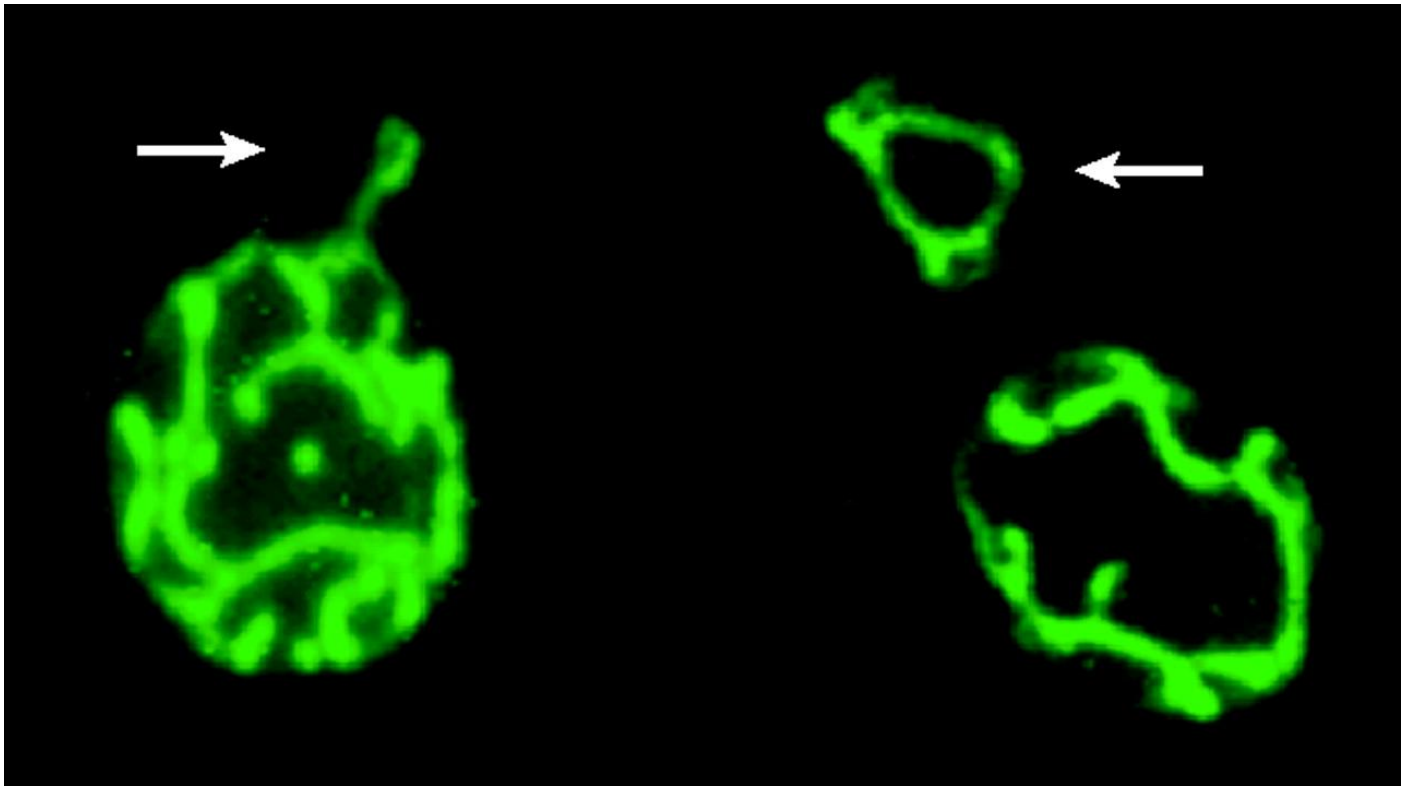
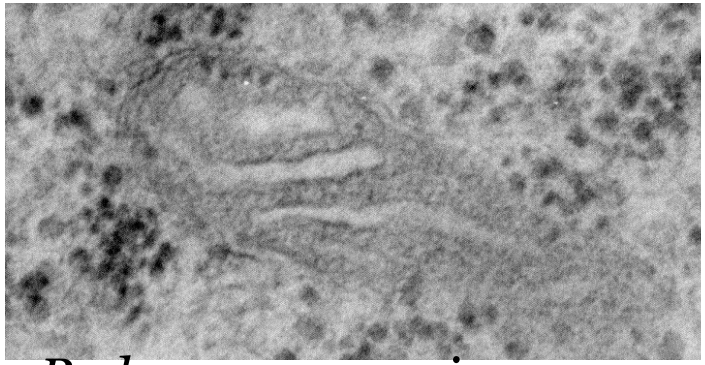
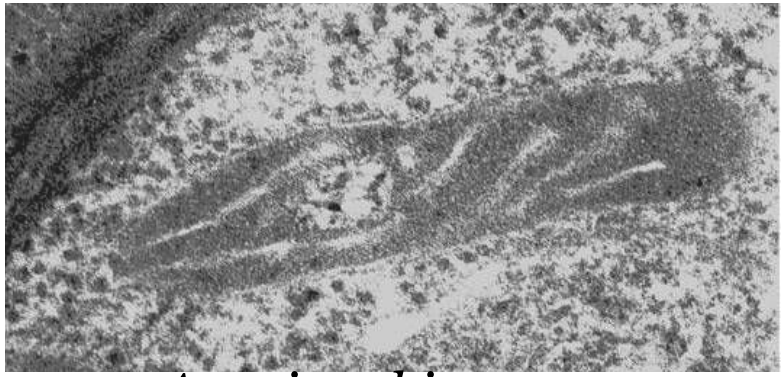
Митохондрии грибов





Podospora anserina



Agaricus bisporus

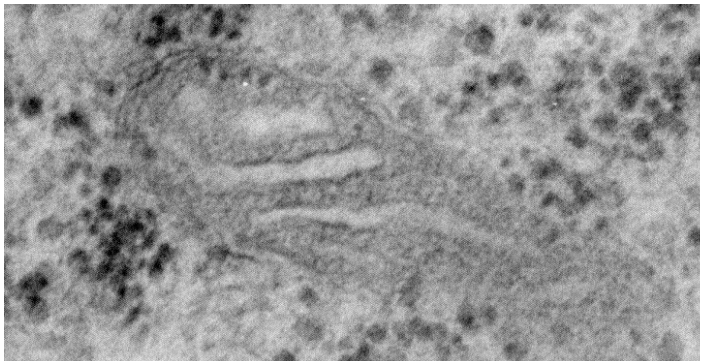
- Митохондрии (от греч. μίτος — нить и χόνδρος — зёрнышко, крупинка) - самовоспроизводящиеся полуавтономные двумембранные органоиды клетки, содержащие собственный геном. Митохондриальный геном в отличие от ядерного представляет собой одну или несколько кольцевых, редко линейных, молекул ДНК (мтДНК).

- Митохондрии характерны за малым исключением для всех эукариотических клеток, как автотрофных (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофных организмов (животные, грибы). Митохондрий нет у некоторых облигатных анаэробных грибов, обитающих в желудке травоядных животных.

Функции

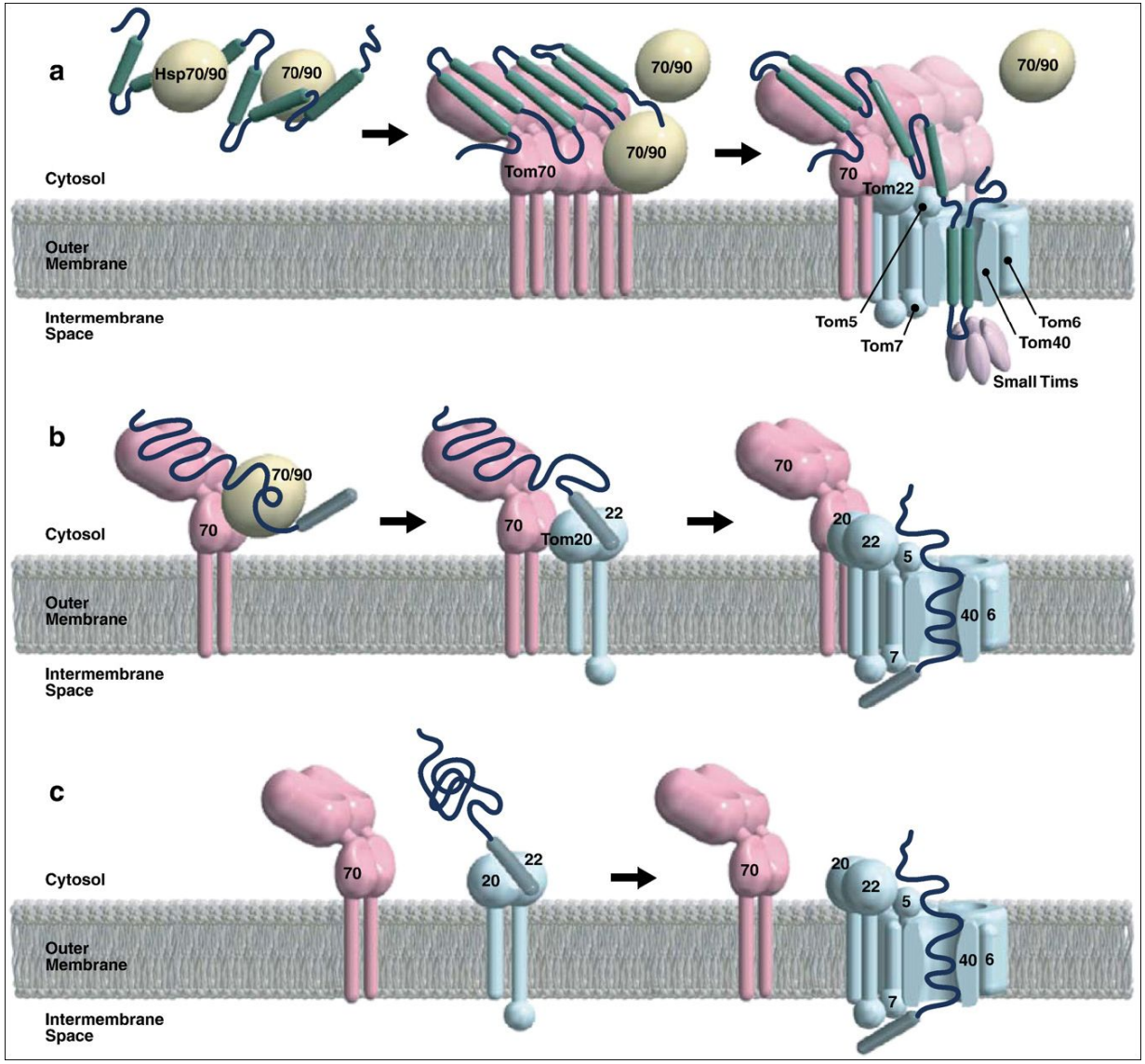
- Митохондрии – это мультифункциональные полиморфные органеллы, выполняющие важнейшие функции в клетках эукариотических организмов.
- Митохондрии осуществляют процесс дыхания, генерируют энергию посредством окислительного фосфорилирования, играют ключевую роль в сборке железо-серных кластеров, участвуют в промежуточном метаболизме, обеспечивают передачу/генерацию кальциевых сигналов и задействованы в *апоптозе*.

- Исследование тонкой структуры митохондрий различных грибов позволило отметить принципиальное сходство с таковой высших организмов. Они окружены двойной мембраной и содержат от 800 (дрожжи) до 1500 (у человека) разных белков. Поверхность внутренней мембраны больше, чем внешней. Существенное увеличение поверхности внутренней мембраны митохондрий связано с наличием впячиваний — *крист,* которые внедрены в матрикс органеллы. У грибов из отделов Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota и Basidiomycota за некоторым исключением кристы пластинчатые, в отличие от высших растений и Oomycota, у которых кристы трубчатые. На внутренней мембране расположены белковые комплексы дыхательной цепи. В матриксе находятся растворимые ферменты (в частности, цикла Кребса, β-окисления жирных кислот, цикла мочевины), митохондриальная ДНК, а также рибосомы и низкомолекулярные полифосфаты. Последние обнаружены у дрожжей *S. cerevisiae* и у мицелиальных базидиомицетов *Agaricus bisporus* и *Pleurotus pulmonarius*. Рибосомы митохондрий по своим свойствам отличны от рибосом остальной цитоплазмы. Так, у дрожжей синтез белка на митохондриальных рибосомах подавляется противобактериальными антибиотиками (например, эритромицином), к которым клетки дрожжей устойчивы.



- Наружная мембрана митохондрий содержит белки-порины, гомологичные бактериальным, и проницаема для небольших молекул. Содержание белков в мембранах митохондрий – до 80%. Внутренняя мембрана энергизована и практически непроницаема для ионов и органических молекул. На ее долю приходится более 90 % всех митохондриальных липидов. Внутренняя митохондриальная мембрана способна в зависимости от напряженности энергетического обмена образовывать большее или меньшее число складок - *крист*, которые увеличивают ее активную поверхность. Транспорт через внутреннюю и наружную мембраны осуществляется белками-переносчиками (транспортерами) или через специальные каналы.

Перенос предшественников белков через комплекс TOM40.



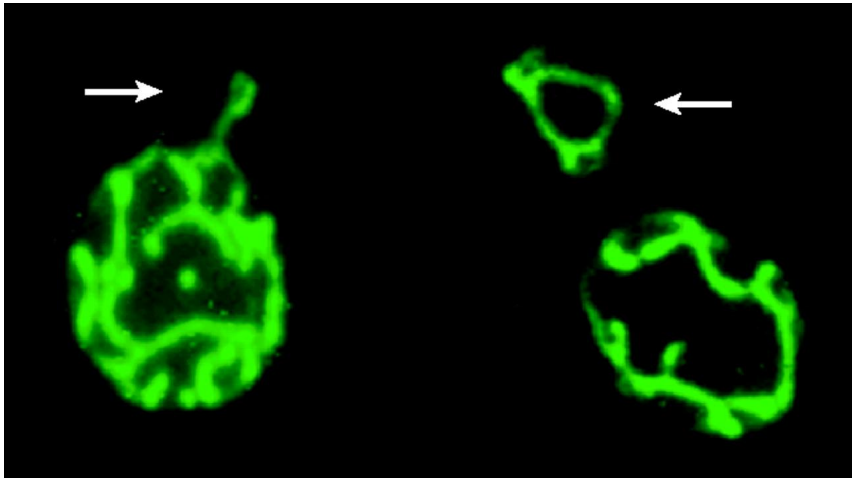
- Перенос предшественников белков через комплекс TOM40.
- (а) при участии белка Tom70. Транспорт многих предшественников белков, включая белки перевозчика связаны с белками теплового шока Бтш70/Hsp90. Предшественники связываются с Бтш70/Hsp90 и передаются на Tom70, далее переходят к каналу Tom40 через Tom22 и Tom5. После переноса через канал TOM40 в цикле конформации предшественник белка связываются с небольшим Тим белком в ИМС.
- (б) при участии белка Tom70. Tom20 и Tom22 узнают сигнальную последовательность. Тогда белок-предшественника переходит к вероятным канал TOM40 через Tom5. Внутренняя стенка канала TOM40 может воспринимать зрелую часть белка-предшественника, в то время как N-конец привязывается к транс комплексу TOM40.
- (с) без участи Tom70 белка-предшественника. Многие белки узнаются Tom20 и Tom22 и через их взаимодействие проходят через комплекс TOM40.

Биогенез

- В то время как большинство митохондриальных белков кодируется в ядре и посттрансляционно импортируется в органеллу, небольшая часть белков кодируется митохондриаьным геномом (например, часть субъединиц цитохромоксидазы). Митохондрии не могут быть синтезированы *de novo*, они размножаются делением. У многих эукариотических типов клеток митохондрии двигаются вдоль цитоскелетных путей и часто сливаются и делятся. Динамика изменения морфологии митохондрий позволяет адаптировать их активность к потребностям клеток.

Происхождение

- Из имеющихся данных по определению нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов был сделан вывод о *монофилетическом* (то есть от одного предка) происхождении митохондрий. Митохондрии по современным данным произошли в результате эндосимбиоза от древних пурпурных фотосинтетических грамотрицательных бактерий. Некоторые авторы, правда, выводят митохондрии от другого предка - риккетсий. Эти патогенные микроорганизмы содержат ферменты цикла Кребса и электрон-транспортной цепи, но не содержат ферментов гликолиза, что роднит их с митохондриями. Кроме того, они содержат гены белков-транслокаторов (переносчиков через мембрану) адениновых нуклеотидов, что позволяет им использовать АДФ и АТФ клетки-хозяина для своих нужд.
- Предшественниками клетки-хозяина (эукариотической клетки) могли быть при этом организмы, родственные архебактериям. Они имеют генетическую систему, сходную в некоторых чертах с эукариотической. В них присутствуют, например, *интроны* - нуклеотидные последовательности, которые вырезаются в процессе *сплайсинга* (созревания матричной РНК).



Методы наблюдения митохондрий у грибов

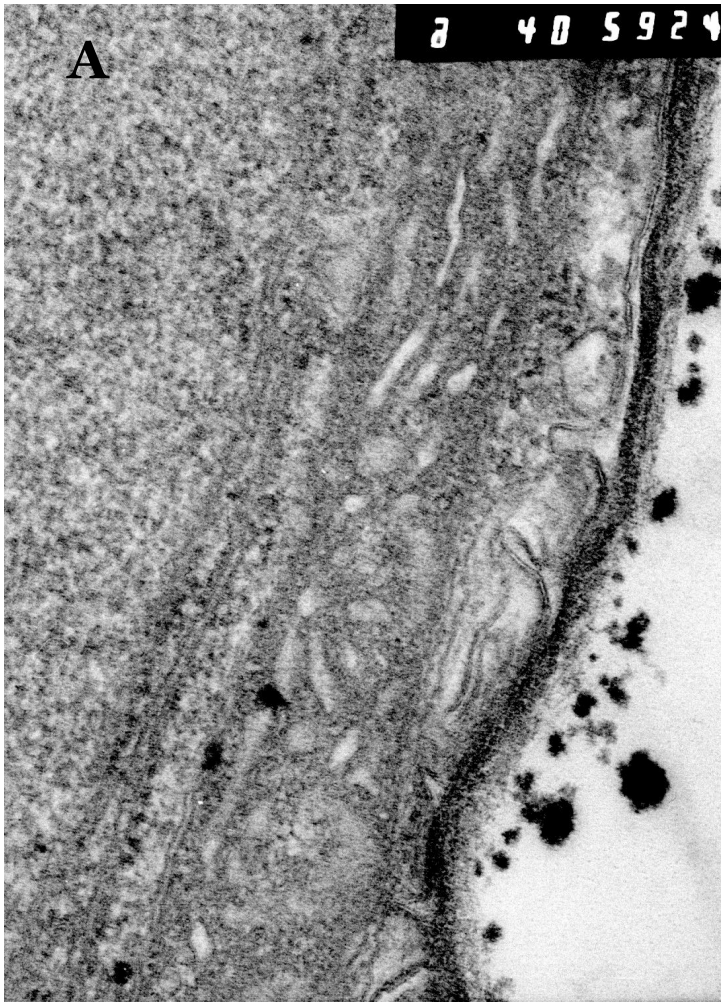
- Флуоресцентные (потенциалзависимые красители или встраивание GFP плазмиды в геном митохондрий)
- Методы иммуноцитохимии с последующим наблюдением в световом или электронном микроскопе

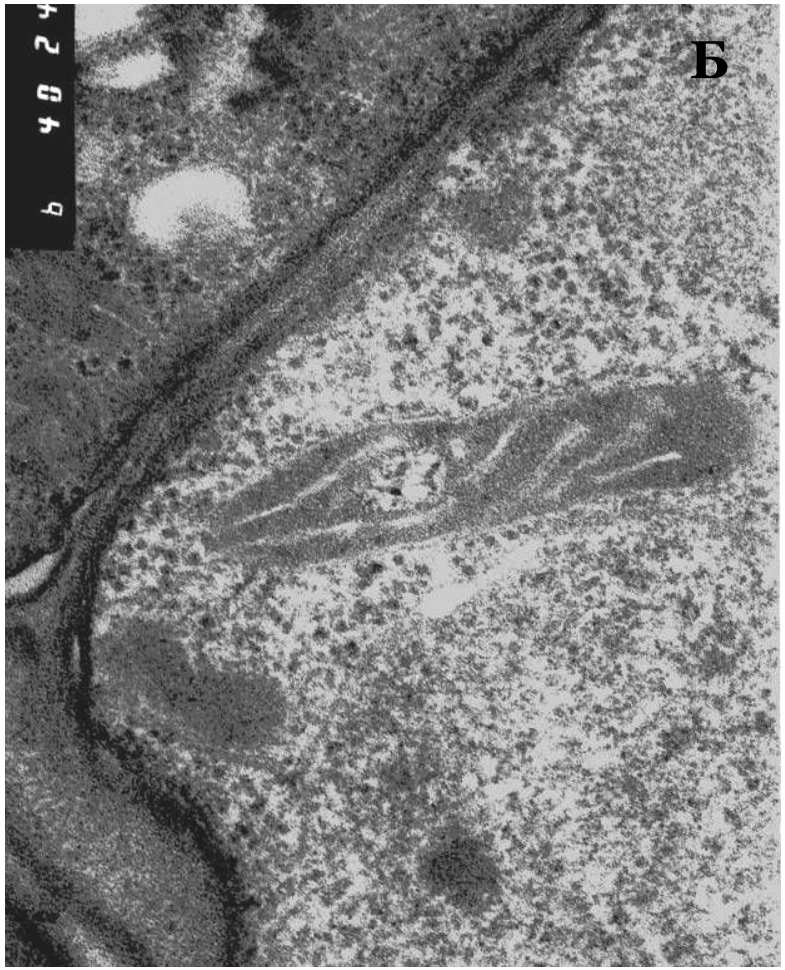
- Первые наблюдения митохондрий у гриба *Pustularia versispora (Tarzetta catinus)* относятся к 1911 году, несколько позже описаны митохондрии у дрожжей. С 1938 года по 1950 год в печати вышла серия работ русского ученого М.Н. Мейселя по изучению функциональной морфологии дрожжевых организмов, в которых большое внимание было уделено структуре и функциям митохондрий.

Размеры митохондрий

- Совокупность митохондрий в клетке называют хондриом.
- Размеры митохондрий непостоянны у разных видов. Обычно митохондрии представляют собой мелкие (длина 0.5-3 мкм, редко до 25 мкм и толщина до 0.5 мкм) внутриклеточные гранулярные или нитевидные, иногда ветвящиеся образования, располагающиеся в тех местах клетки, где необходимо использовать энергию для любых жизненных процессов (Weber et al., 1998).

Ультраструктура митохондрий
в клетках поверхностно растущего вегетативного мицелия (А) и субгимения (Б) *Agaricus bisporus*





Морфология и распределение хондриома в клетке определяется следующими факторами:

- положением клеток в колонии
- условиями роста
- стадией жизненного цикла

и др.

Распределение и морфология митохондрий у мицелиальных грибов

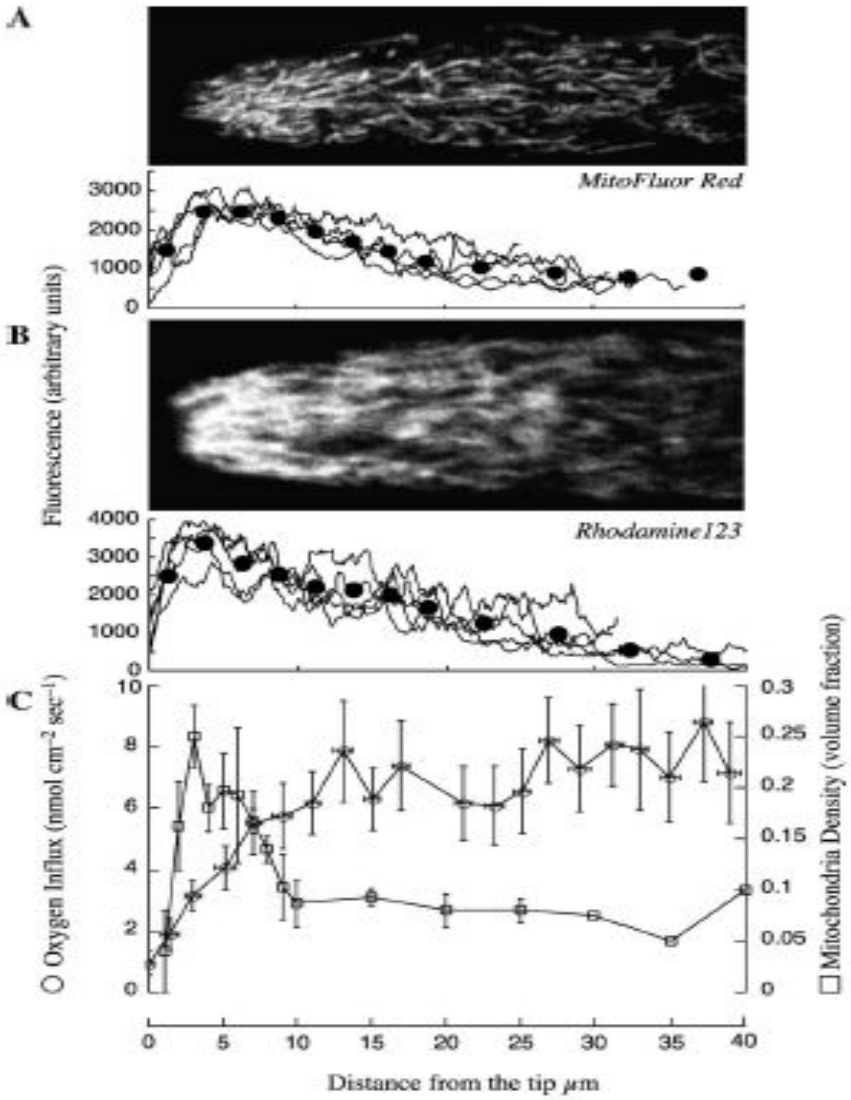


Fig. 1. Tip-localized mitochondria and respiratory activity along growir hyphae. (A) MitoFluor Red fluorescence imaging of mitochondria in growing hyphae and quantitative fluorescence intensity transects (see Se tion 2.6). (B) Rhodamine 123 fluorescence imaging of mitochondria in growing hyphae and quantitative fluorescence intensity transects. (Mitochondrial densities from electron micrographs (squares) and oxyge influx measurements (circles) to show that the tip-localized mitochondr do not respire (data are re-drawn from Lew, 1999 and Lew and Levin 2004).

Положение хондриома в апексе у ***Neurospora crassa***

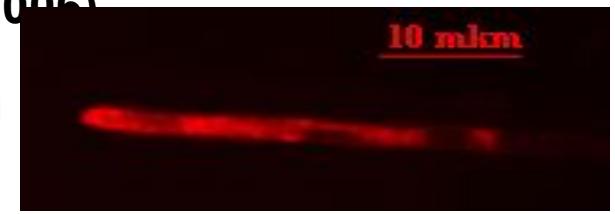
Локализованные в апикальном кончике мицелия митохондрии (до 50 мкм) у ***Neurospora crassa*** возможно участвуют в устранении излишних ионов Ca^{2+},

они не обладают дыхательной активностью и не образуют АТФ. При этом они связываются с флуорохромами специфичными к кальцию (Levina, Lew, 2005)

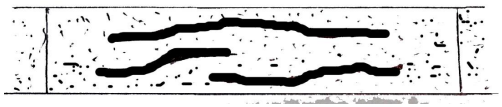
Типы распределения хондриома в клетках мицелия штаммов рода *Agaricus* (Матросова, 2006)

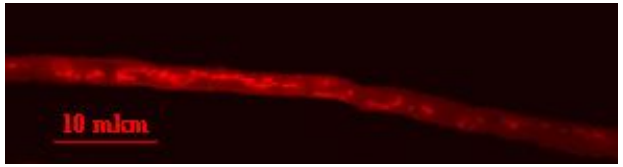
Тип 1.
Характерен для:
- Мицелия возрастом 7 суток на средах СА и КГА;
- Глубинного мицелия штаммов вида *A. bitorquis*

Зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика)

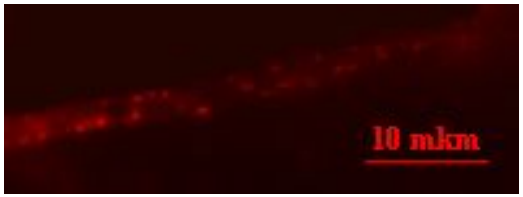


Зона 2 (30-100 мкм от апикального кончика)



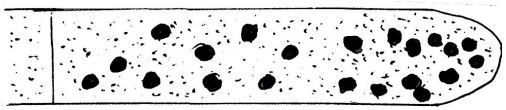


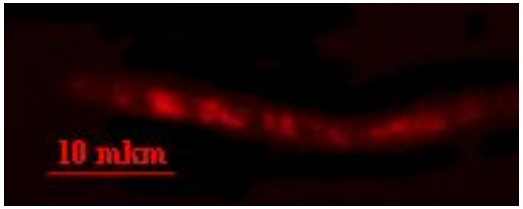
Зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика)



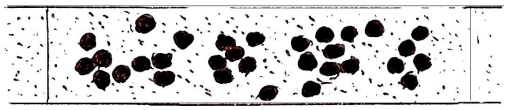
Тип 2.
Характерен для:
- Мицелия возрастом 28 суток на средах СА и КГА;
- Мицелия возрастом 7 и более суток на среде ГА;
- Мицелия возрастом 7 и более суток на СА при повышенной температуре (33±1°С);
-Глубинного мицелия возрастом 7 и более суток
- Мицелия гомокарионов

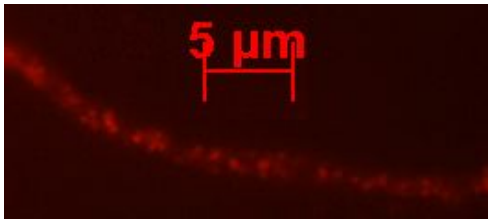
Зона 1 (до 30 мкм от апикального кончика)



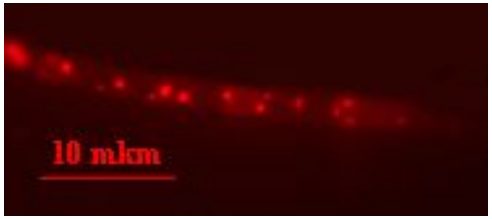


Зона 2 (30-100 мкм от апикального кончика)

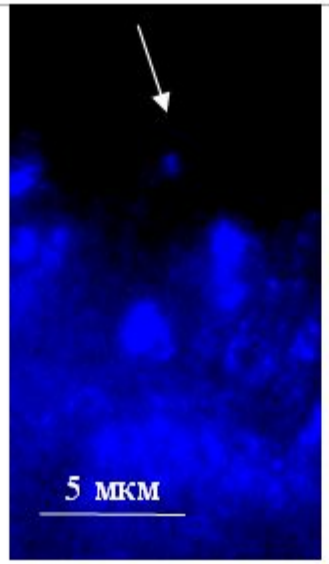
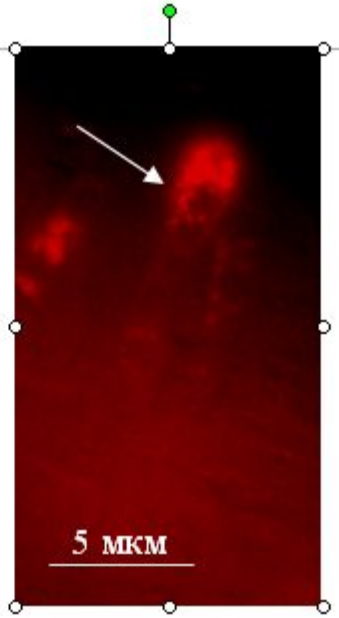




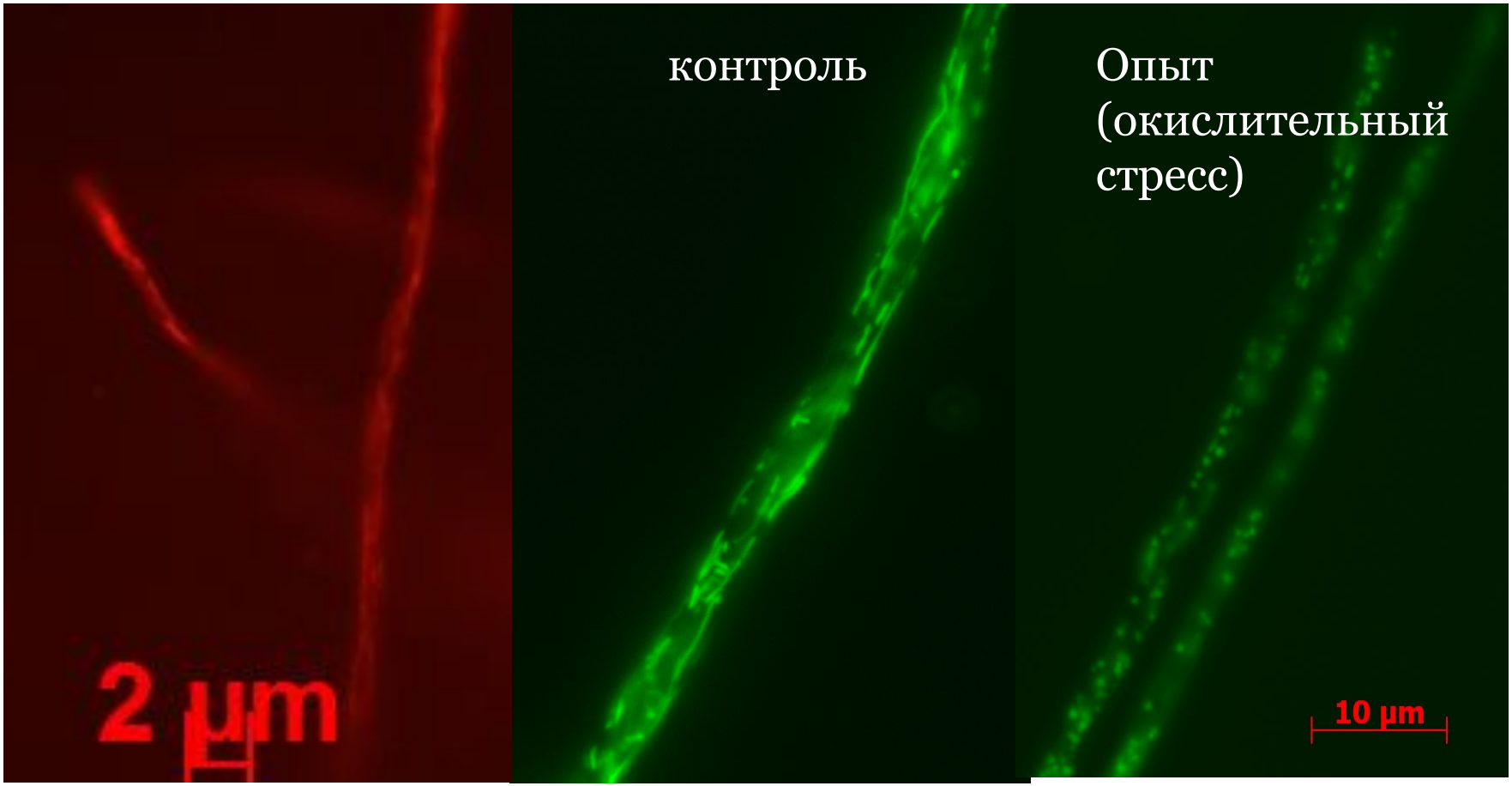
Зона 3 (более 100 мкм от апикального кончика)



Базидии шампиньона двуспорового

	
Базидия с ядром (2n) (показано стрелкой) в гименциальном слое *A. bisporus* (окрашивание Hoechst 33342)	Диффузное окрашивание в апексе базидии. Округлые митохондрии (стрелка) вблизи ядра в гименциальном слое *A. bisporus* (окрашивание родамином 6Ж)

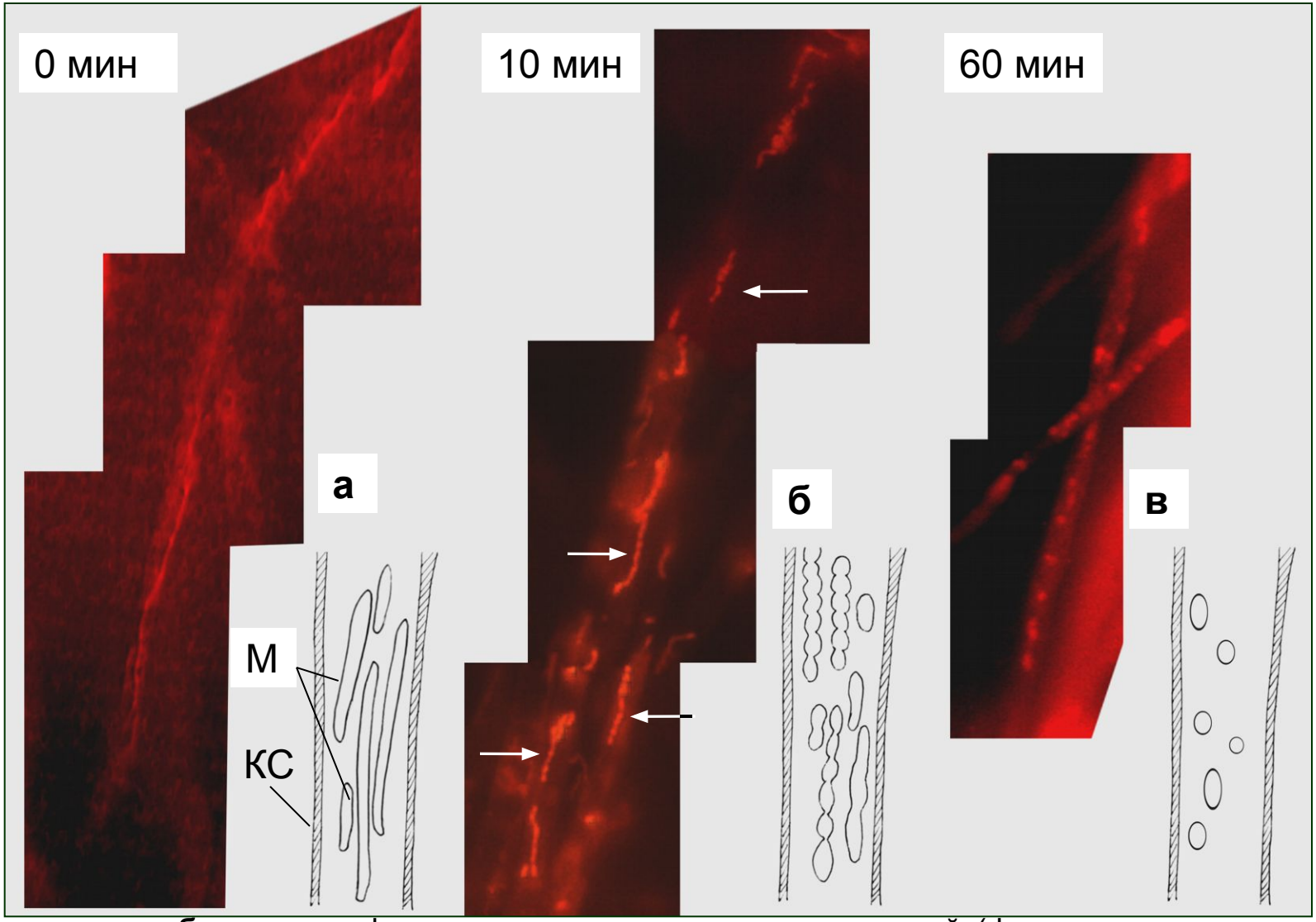
Влияние стрессового фактора на морфологию (фрагментацию) митохондрий *Podospora anserina*



Родамин 6Ж

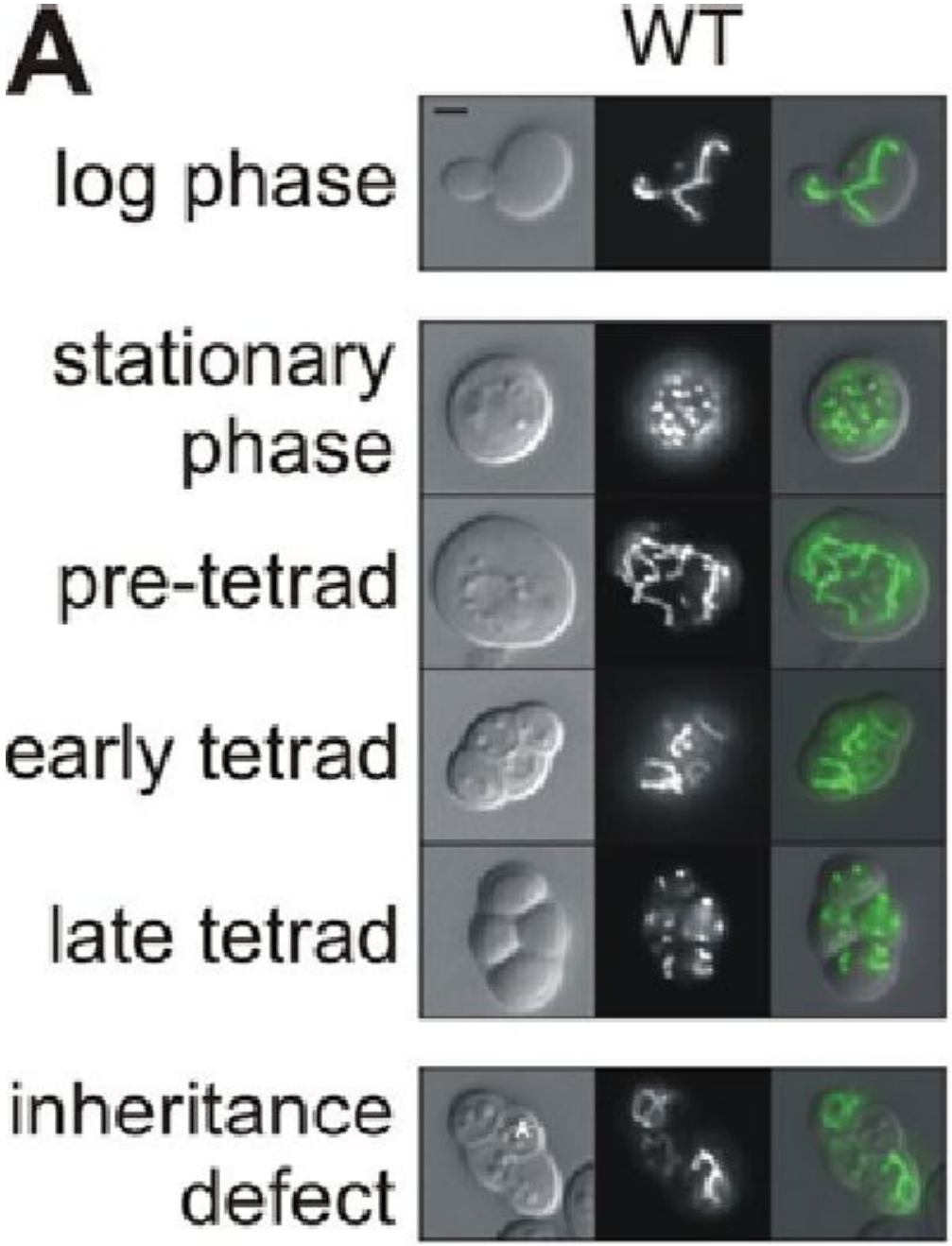
GFP плазмида

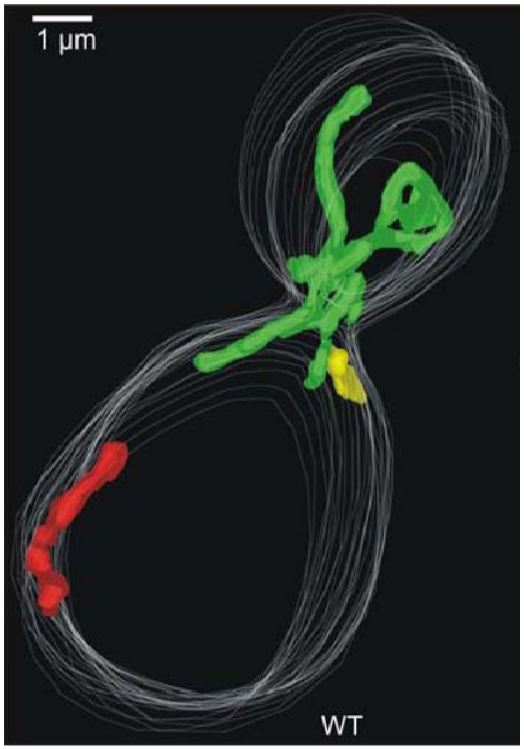
Влияние осмотического шока на морфологию митохондрий *Heleococcum alkalinum* (Козлова, 2007)



а – нулевая точка, **б** – начало фрагментации нитевидных митохондрий (формирование многочисленных перетяжек) через 10 мин инкубации в 4М NaCl, **в** – фрагментированный хондриом после 60 мин инкубации в 4М NaCl

Распределение и морфология митохондрий у одноклеточных грибов



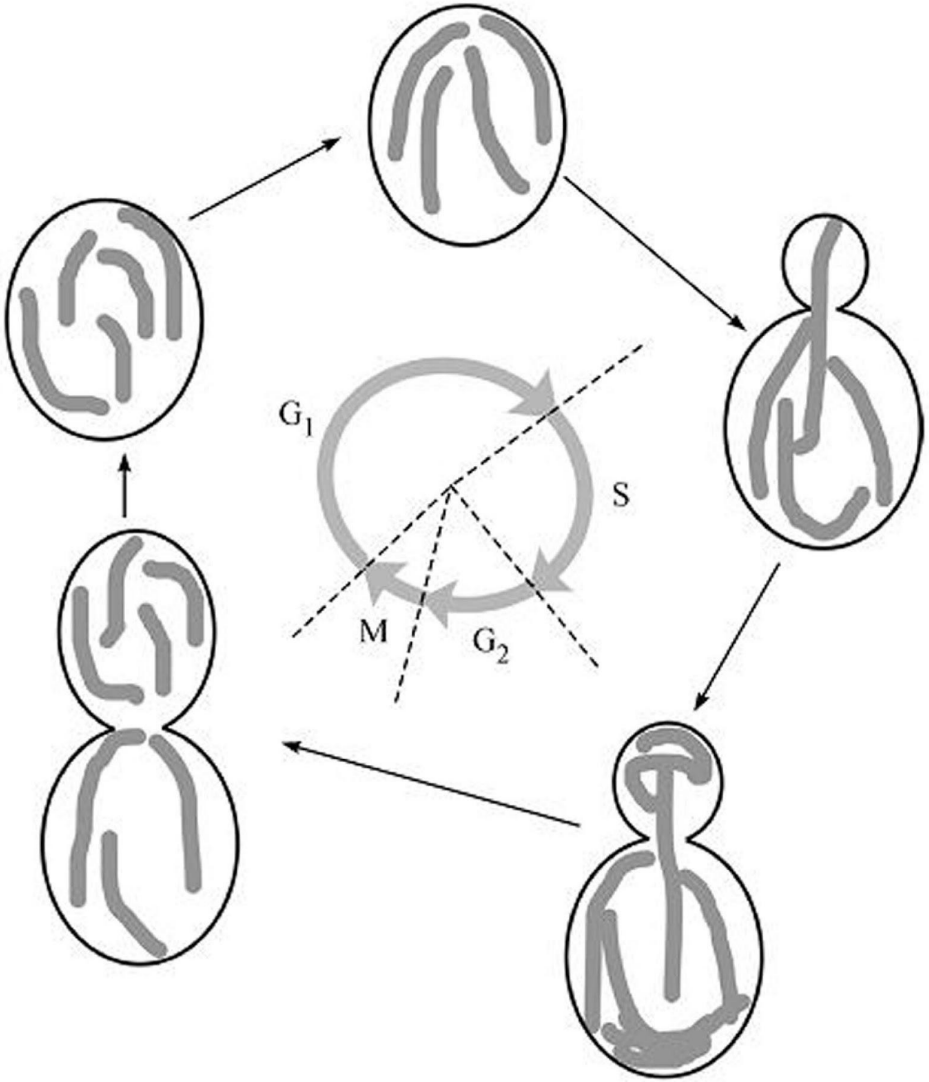


Распределение митохондрий в клетке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Связь клеточного и митохондриального циклов

- Связь с клеточным циклом. При изучении почкующихся дрожжей было продемонстрировано, что ядерные и митохондриальные деления имеют четкую корреляцию, конец делений митохондрий приходится на середину S-стадии интерфазы. Распределение митохондрий между материнской и дочерней клетками происходит в течение фаз S и G2 стадии интерфазы, в результате около половины митохондрий наследуется дочерней клеткой
- Связь с фазой роста. В клетках *S. cerevisiae* в логарифмической фазе роста наблюдается одна-три митохондрии. В стационарной фазе роста в гаплоидных клетках *S. cerevisiae* можно наблюдать до 50 отдельных органелл.

Связь клеточного и митохондриального циклов



Динамика митохондрий и жизненный цикл

- При половом цикле размножения у *S. cerevisiae* наблюдается следующая динамика поведения хондриома. После слияния гаплоидных клеток происходит слияние отдельных митохондрий в одну гигантскую ветвящуюся структуру, это сопровождается объединением нуклеоидов отдельных митохондрий. Единая сеть сохраняется до конца второго деления мейоза, далее происходит деление хондриома на фрагменты. Четыре наиболее крупных фрагмента в виде колец локализованы в зоне четырех гаплоидных ядер. В процессе формирования аскоспор они распадаются на несколько десятков мелких структур.
- Таким образом, у *S. cerevisiae* митохондриальный цикл находится в прямой зависимости от клеточного цикла (интерфаза, митоз) и жизненного цикла (неполовое и половое размножение).

Геном митохондрий грибов

- **ДНК в митохондриях представлена циклическими молекулами, не образующими связь с гистонными белками. Митохондриальная ДНК очень однородна, отличие заключается в величине интронов/нетранскрибируемых участков.**
- **Митохондриальная ДНК представлены множественными копиями, собранными в кластеры. В митохондриях имеется стандартный набор генов: гены ферментов дыхательной цепи, участвующие в процессах окислительного фосфорилирования, гены рРНК, тРНК и гены АТФаз.**
- **Митохондриальная ДНК собрана в отдельную зону – нуклеоид. В митохондриях грибов может быть от 1 до 10 нуклеоидов.**
- **Синтез митохондриальной ДНК не связан с синтезом ДНК в ядре. В клетках дрожжей *S. cerevisiae* в стационарной фазе содержится 22 и более митохондрий, имеющих по четыре генома.**
- **В отличие от позвоночных животных, у растений, грибов и простейших мтДНК содержат до 80% некодирующих последовательностей. Несмотря на то, что в геномах митохондрий млекопитающих и дрожжей содержится приблизительно одинаковое количество генов, размеры дрожжевого генома в 4-5 раз больше — около 80 тыс. пар нуклеотидов, у *P. anserina* – 100 тыс. пар нуклеотидов. Хотя кодирующие последовательности мтДНК дрожжей высоко гомологичны соответствующим последовательностям у человека, дрожжевые мРНК имеют дополнительно 5'-лидерную и 3'-некодирующую области, как и большинство ядерных мРНК.**

Наследование митохондрий

- Сохранение целостности митохондриального генома в процессе наследования очень важно для дыхательной функции. Факторы, контролирующие сегрегацию митохондриального генома у грибов мало изучены. У большинства высших эукариотических организмов однородительское наследование mtDNA (McAlpine et al., 2001). У мицелиальных грибов из класса Ascomycota *Neurospora tetrasperma* и *N. crassa* показано однородительское наследование митохондрий (Lee and Taylor, 1993, Mannella et al., 1979). Как в случае слияния специализированных половых клеток (трихогина и конидии), так и при слиянии гомокариотических клеток вегетативного мицелия, отличающихся по ядрам с разными mat-локусами сохраняются митохондрии клеток акцепторов ядер.
- В то время как для почкующихся дрожжей характерно двуродительское наследование (Berger and Yaffe, 2000; Okamoto et al.,1998).

Движение митохондрий

- В клетках *Saccharomyces cerevisiae,* как и в клетках *Aspergillus nidulans* в транспорте митохондрий большую роль играют актиновые микрофиламенты (Hermann and Shaw, 1998).
- У дрожжей, *Schizosaccharomyces pombe* (Yaffe et al., 1996), и в клетках *Neurospora crassa* (Steinberg, Schlia, 1993), наоборот, в распределении митохондрий задействованы, в основном, микротрубочки. Исследователи наблюдали движение органелл со скоростью 1.4 мкм/с в гифах, протопласте, клеточных фрагментах и мутантах, лишенных клеточной стенки. Разрушение микротрубочек с помощью нокодазола уменьшало подвижность митохондрий, в то время как разрушение микрофиламентов цитохалазином D не оказывало такого влияния.
- Было выяснено, что связывание митохондрий с микротрубочками осуществляют периферические белки этих органелл. К таким белкам относятся белки из семейства кинезинов или родственного динеину белка.

Слияние (англ. fusion) и деление (англ.fission или division) митохондрий

- Динамично протекающие процессы слияния и деления (динамика) митохондрий обеспечивают лабильность хондриома и регуляцию функций органелл за счет механизмов генетического контроля структуры и функционирования митохондрий в соответствии с потребностями клетки в АТФ. Морфология митохондрий и количество копий генома зависит от баланса активности слияния и деления. Изменение в сторону слияния дает возможности клетке строить вытянутые взаимосвязанные митохондриальные сети, в тоже время сдвиг в сторону деления генерирует множество морфологически и функционально разных маленьких сферических органелл. Эта адаптация митохондриального компартмента к клеточным потребностям является ключевой для множества важных процессов

Слияние (англ. fusion) и деление (англ.fission или division) митохондрий

- Основными компонентами слияния и деления митохондрий являются мембранные белки: Mmm1 (белок ЭР), Mmm2, Mdm10, и Mdm12, образующие структуру мембранного *митохора*. Митохор связывает митохондрии и мтДНК с цитоскелетом (у дрожжей с актиновыми филаментами), что обеспечивает контролируемое передвижение органелл и их ДНК в клетке. 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.

TABLE 1. **Core components of the mitochondrial fusion and fission machineries**

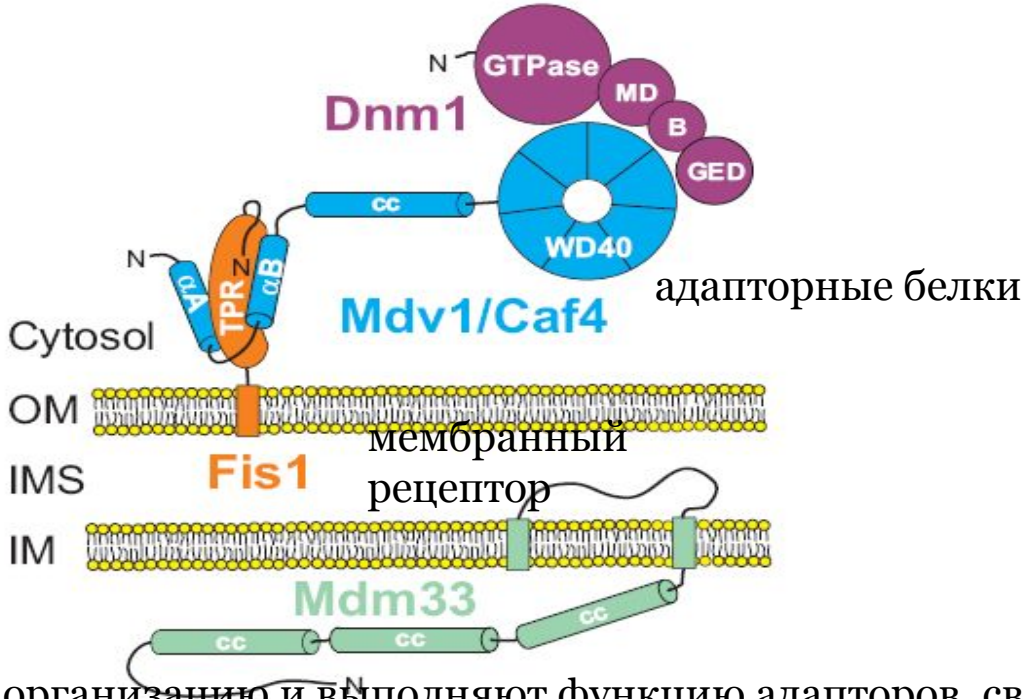
Process	Yeast	Orthologs in higher eukaryotes	Location	Proposed function
Fusion	Fzo1	Mfn1 and Mfn2 (mammals) Fzo and Dmfn (*D. melanogaster*)	OM	OM fusion
	Ugo1	-	OM	Coordination of OM and IM fusion
	Mgm1	OPA1 (mammals)	IM and IMS	IM fusion
Fission	Dnm1	DRP1/DLP1 (mammals) DRP-1 (*C. elegans*) ADL1 and ADL2 (*A. thaliana*)	Cytosol and OM	OM fission
	Fis1	hFis1 (human)	OM	Receptor for OM fission machinery
	Mdv1	-	Cytosol and OM	Adaptor between Fis1 and Dnm1
	Caf4	-	Cytosol and OM	Redundant with Mdv1

IM, inner membrane; IMS, intermembrane space; OM, outer membrane.

Westermann, 2008

- Предложено несколько моделей, объясняющих деление митохондрий с участием белков Dnm1, Fis1, Mdv1, Caf4 и Mdm33

Модель молекулярного аппарата деления митохондрий у дрожжей



Mdv1 и Caf4 имеют доменную организацию и выполняют функцию адапторов, связывающих Dnm1 с Fis1. Их спирально закрученный район осуществляет взаимодействие гомо-олигомеров. Dnm1 собирается в митохондрии как динамичные олигомеры, которые в конечном счете формируют спирали, окружающие митохондрию. Неизвестно, какой домен Dnm1 взаимодействует с повторяющимся районом WD40 белка Mdv1 или Caf4. Mdm33 содержит несколько прогнозируемых спирально закрученных районов в матриксе. Обозначены N-концы каждого полипептида; αA и αB, α спираль в N-терминальном конце Mdv1 и Caf4; B, вставка B; cc, спирально закрученный; GED, GTPаза эффекторный домен; IM, внутренняя мембрана; IMS, межмембранное пространство; MD, средний домен; OM, наружная меембрана; TPR, случайные четырехпептидные повторы.

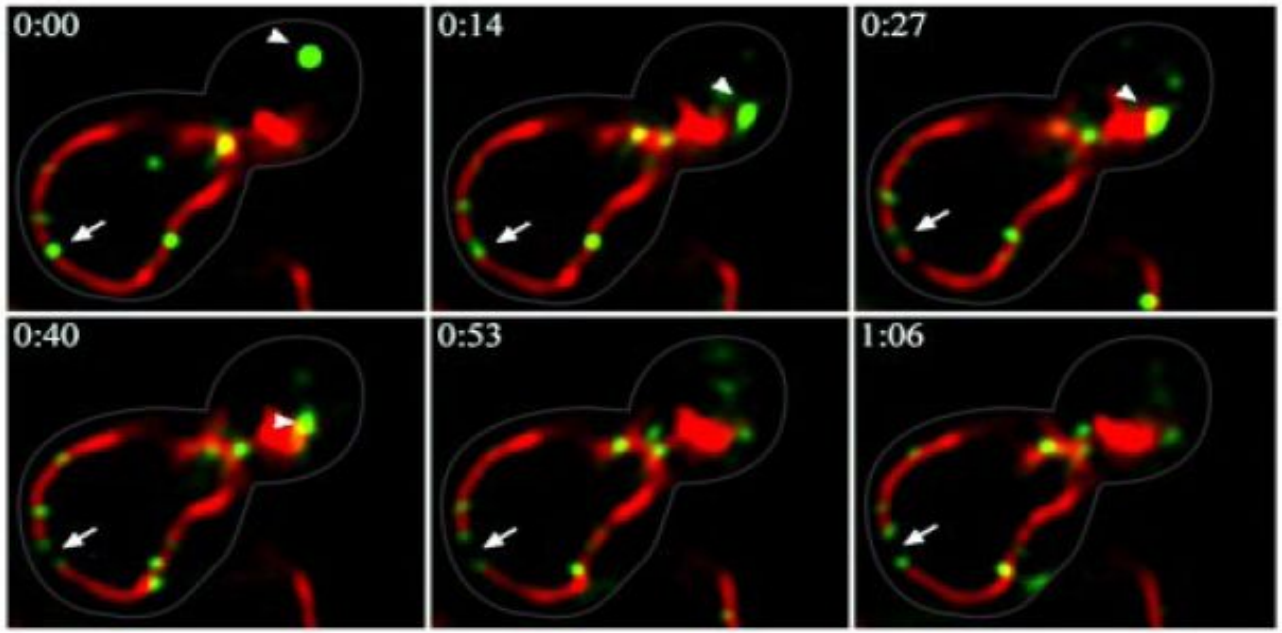


FIGURE 1. **Dnm1 punctate structures display dynamic behavior and localize to the cytoplasm and mitochondria.** Time-lapse images of Dnm1-GFP and mito-dsRed in wild type cells. A single 0.2-μm section is shown. *Arrowheads* indicate dynamic cytoplasmic Dnm1 punctate structures and *arrows* point to a stationary punctate structure stably associated with mitochondria and ultimately at a fission event. Times indicated are in seconds. Images are magnified ~500 times.

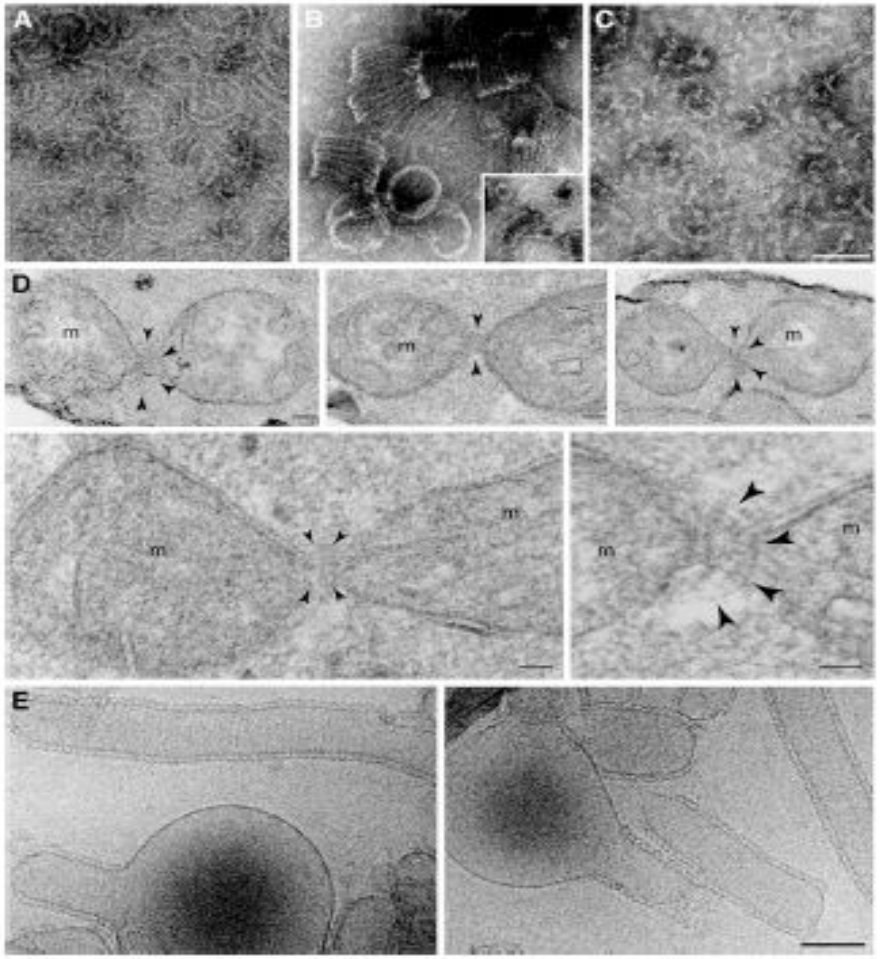
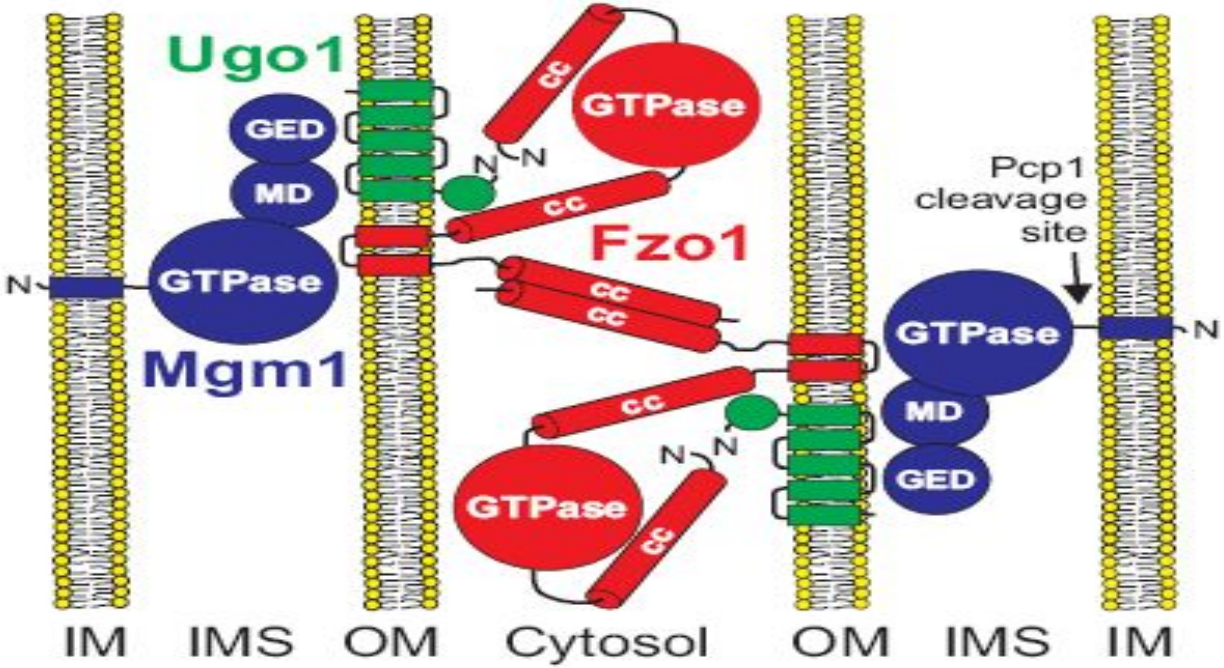


Figure 5. **Dnm1 self-assembles into spirals that are structurally tailored to fit mitochondria.** (A–C) Electron micrographs of negatively stained Dnm1 structures. (A) Dnm1 forms curved filaments in the absence of nucleotides. (B) Dnm1 self-assembles into large spirals in the presence of GMP-PCP. (Inset) Dynamin-1 spirals formed in the presence of GDP/BeF_x. (C) Dnm1/GMP-PCP spirals undergo a conformational change upon the addition of GTP. (D) Conventional EM analysis of mitochondrial constriction sites in thin sections of yeast cells. Arrowheads indicate electron-dense structures that are found in association with mitochondrial constriction sites. M, matrices of the mitochondria. (E) Dnm1 assembly in the presence of liposomes. Bars, 100 nm.

Слияние митохондрий

- Теоретически возможно два пути слияния митохондрий: с одновременным и раздельным слиянием внутренних и внешних мембран. С практической точки зрения этот вопрос нуждается в дальнейших исследованиях. Механизм слияния внутренней мембраны митохондрий на данный момент представляет собой загадку. Наиболее вероятным участником этого процесса представляется динаминоподобный белок, но как именно он участвует в слиянии митохондрий, на данный момент неизвестно.

Модель молекулярного аппарата слияния митохондрий у дрожжей.

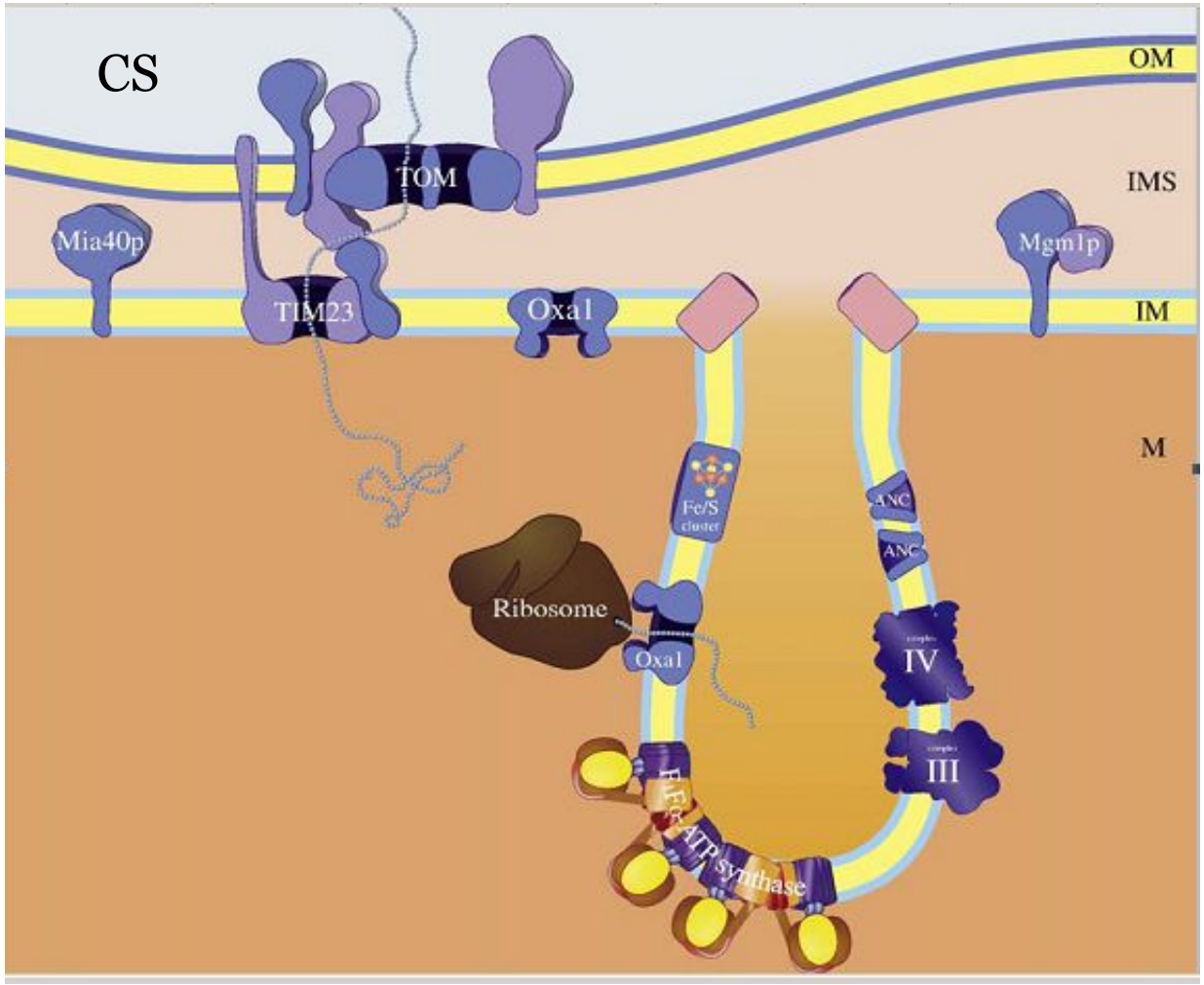


Две молекулы Fzo1 связывают две смежные митохондрии путем сборки димерного антипараллельного спирально закрученного С-концевого региона. Fzo1 в митохондриях является частью крупного комплекса 800 kDa неизвестного состава (16). Ugo1 содержит до пяти районов стягивающих мембрану, как показано на рисунке, однако, предложена и другая альтернативная топология с несколькими десятками трансмембранных регионов. Неизвестно какая часть Ugo1 взаимодействует с Fzo1 и Mgm1. Mgm1 существует в двух формах в митохондрии, длинная форма, имеющая трансмембранный район на внутренней мембране, и короткая форма без этого района при расщеплении Pcp1. Неизвестно, какой домен Mgm1 взаимодействует с компонентами наружной мембраны. Обозначены N-концы каждого полипептида; cc, спирально закрученный; GED, GTPаза эффекторный домен; IM,внутренняя мембрана; IMS, межмембранное пространство MD, средний домен; OM, наружная меембрана

- Процесс слияния митохондрий можно разделить на три этапа — фиксация органелл, слияние наружных и слияние внутренних мембран органелл.

- Основными регуляторами слияния митохондрий у дрожжей являются ГТФазы наружной и внутренней мембран митохондрий Fzo1 и Mgm1 соответственно, а также белок наружной мембраны Ugo1
- Процесс слияния митохондрий имеет большое значение для наследования и сохранения генома митохондрий. Не случайно перед митозом или мейозом ядра происходит слияние мелких митохондрий в одну или несколько крупных митохондрий.

Субкомпартменты внутренней мембраны митохондрий
Митохондрии содержат около 800 белков/1500 у человека



Субкомпартментализация внутренней мембраны митохондрий. Распространение митохондриальных белков участвующих в нескольких главных процессах митохондрий определенных методами количественной иммуноцитохимии с использованием электронного микроскопа у *S. cerevisiae*.

Белки внутренней мембраны вовлечены в слияние митохондрий (Mgm1p) или белок привязки (Mia40p, TIM23 комплекс) предпочтительно локализованных во внутренней мембране. Кроме белков, вовлеченных в окислительное фосфорилирование (ANC adenine nucleotide carrier protein, Complex III, Complex IV, F1FO-ATP синтаза) мембрана крист богата кластерами Fe/S.

Это распределение неравномерное и изменяющееся. Динамика перераспределения белков зависит о физиологического статуса клетки. CS-цитозоль; OM, наружная мембрана; IMS, межмембранное пространство; IM, внутренняя мембрана; M, пространство матрикса (Zicketal.,2009)

Дыхательная цепь митохондрий

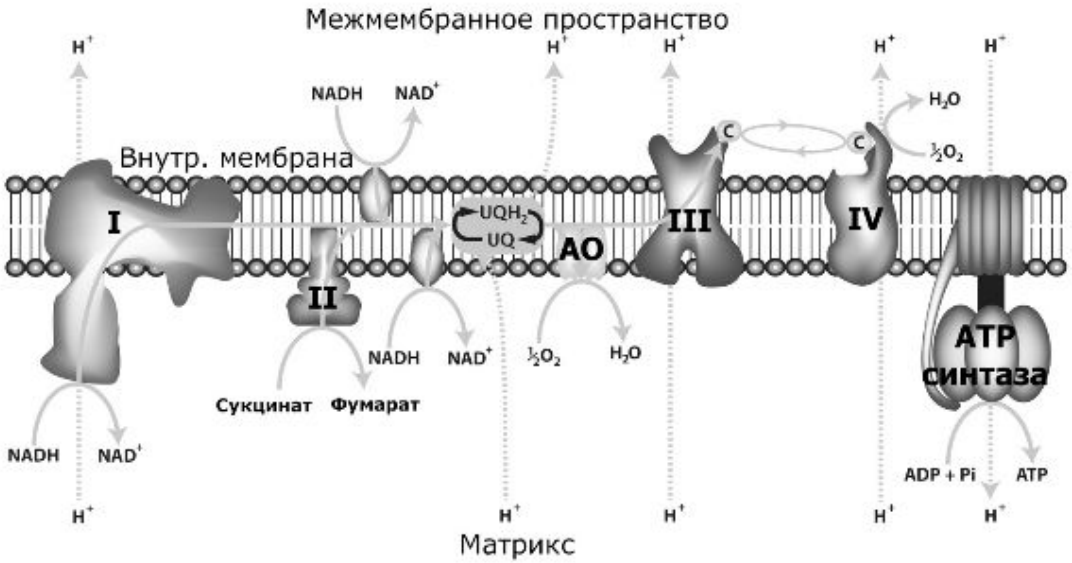
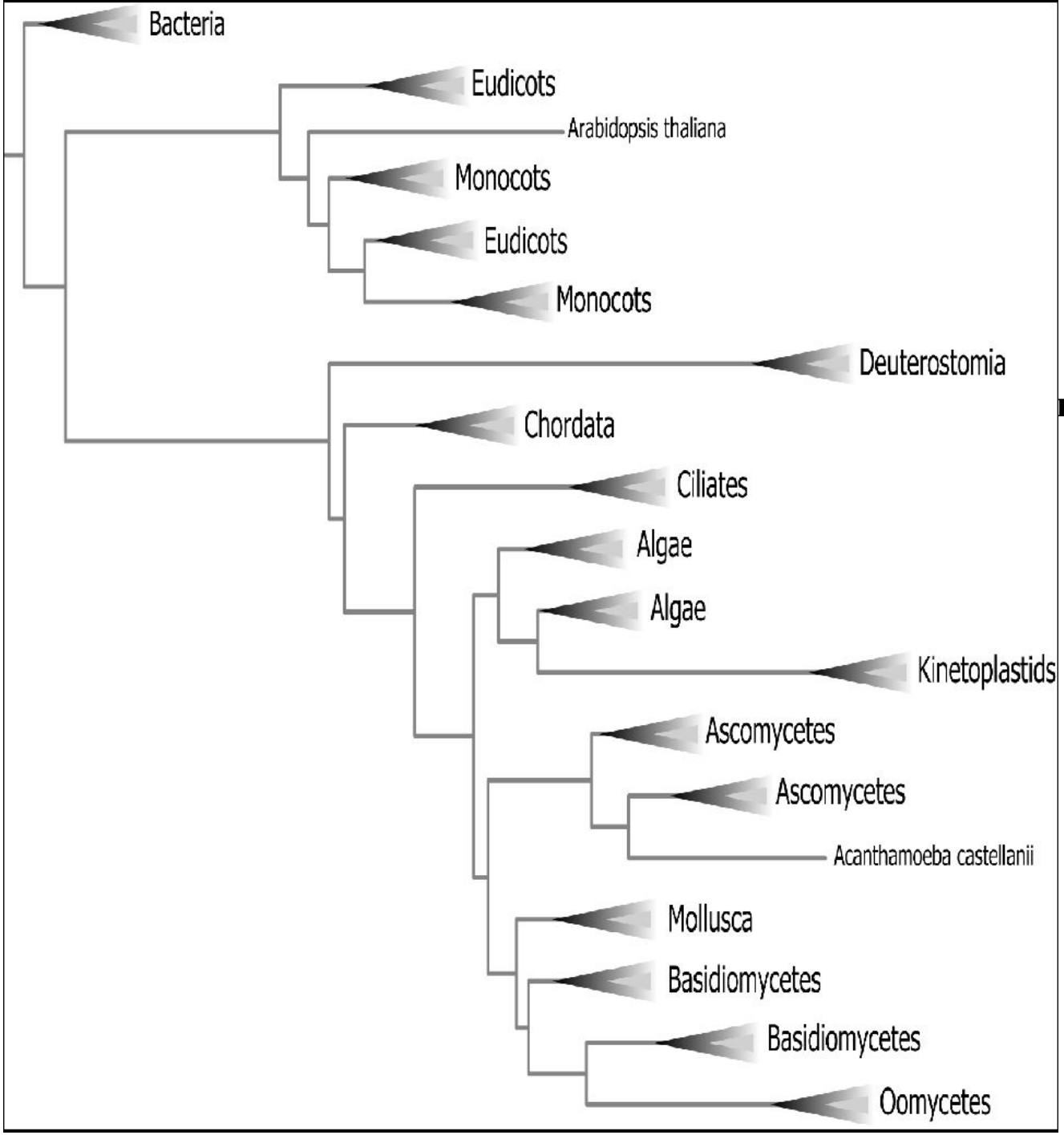


Рис. 1. Структура дыхательной цепи растений и некоторых грибов.

- I – НАДН-дегидрогеназа
- II – сукцинатдегидрогеназа
- III – убихинол-цитохром *c*-редуктаза
- IV – цитохром –*c*-оксидаза
- V – H+-транспортирующая АТФ-синтаза.

- Комплексы дыхательной цепи построены из множества полипептидов и содержат ряд различных окислительно-восстановительных коферментов, связанных с белками. К ним принадлежат флавин (ФМН (FMN) или ФАД (FAD) в комплексах I и II), железо-серные центры (в I, II и III) и группы *гемов* (комплексные соединения порфиринов с двухвалентным железом в II, III и IV). В I, III и IV дыхательных комплексах транспорт электронов сопряжен с переносом протона, в результате чего создается градиент протонов, используемый для синтеза АТФ (*окислительное фосфорилирование*).

- На каждый комплекс действуют определенные ингибиторы, например, ротенон и пиерицидин на Комплекс I, антимицин и миксотиазол на Комплекс III и цианид на Комплекс IV.
- У грибов и растений обнаружены также альтернативные пути переноса электронов (альтернативная Комплексу I НАДН:убихинон оксидоредуктаза и Комплексу IV – альтернативная оксидаза), которые нечувствительны к действию ингибиторов Комплекса I (антимицин А) и IV (цианид). Альтернативная оксидаза (АО) имеет ядерное происхождение. Перенос электронов через АО не сопряжен с синтезом АТР и запасанием энергии, а энергия окисления убихинола кислородом выделяется в виде тепла.



Филогенетическое древо АО, построенное на основании анализа первичных структур.

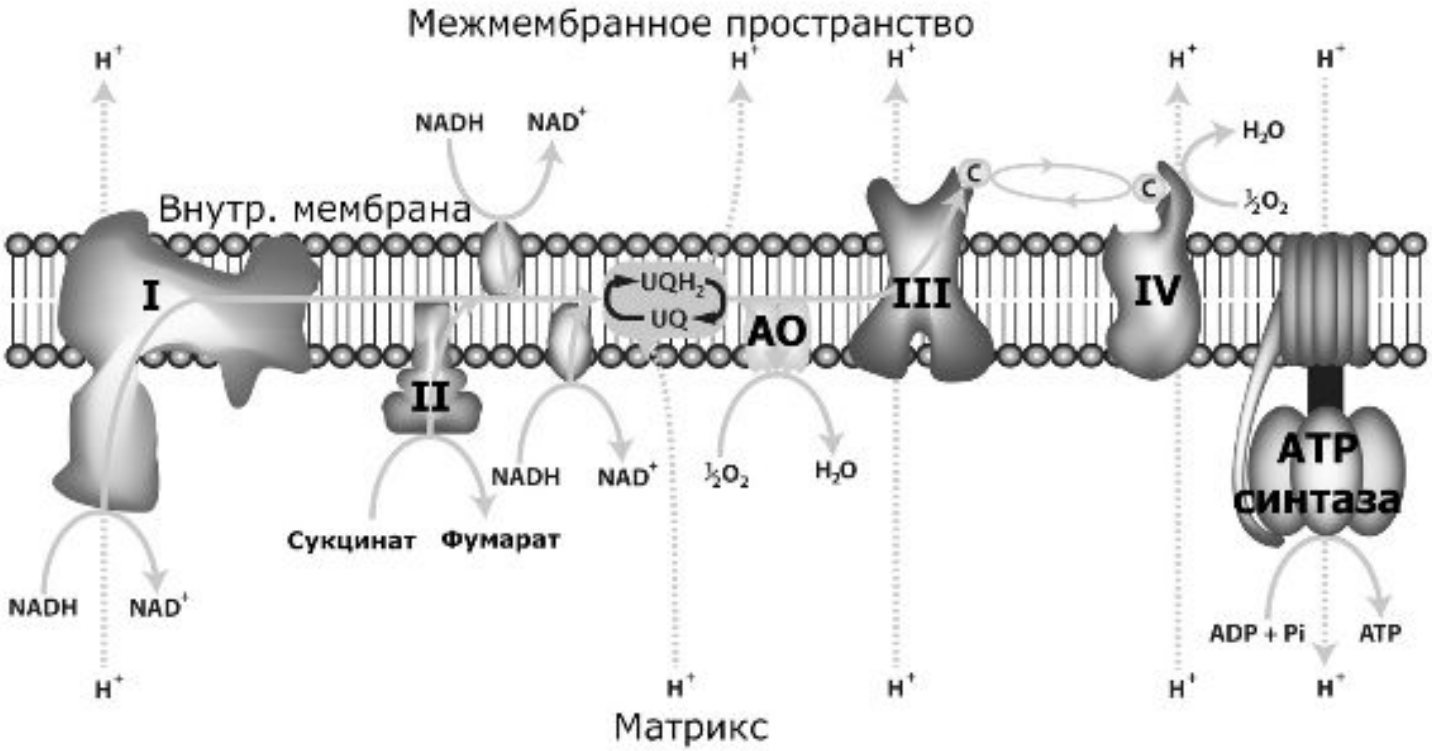


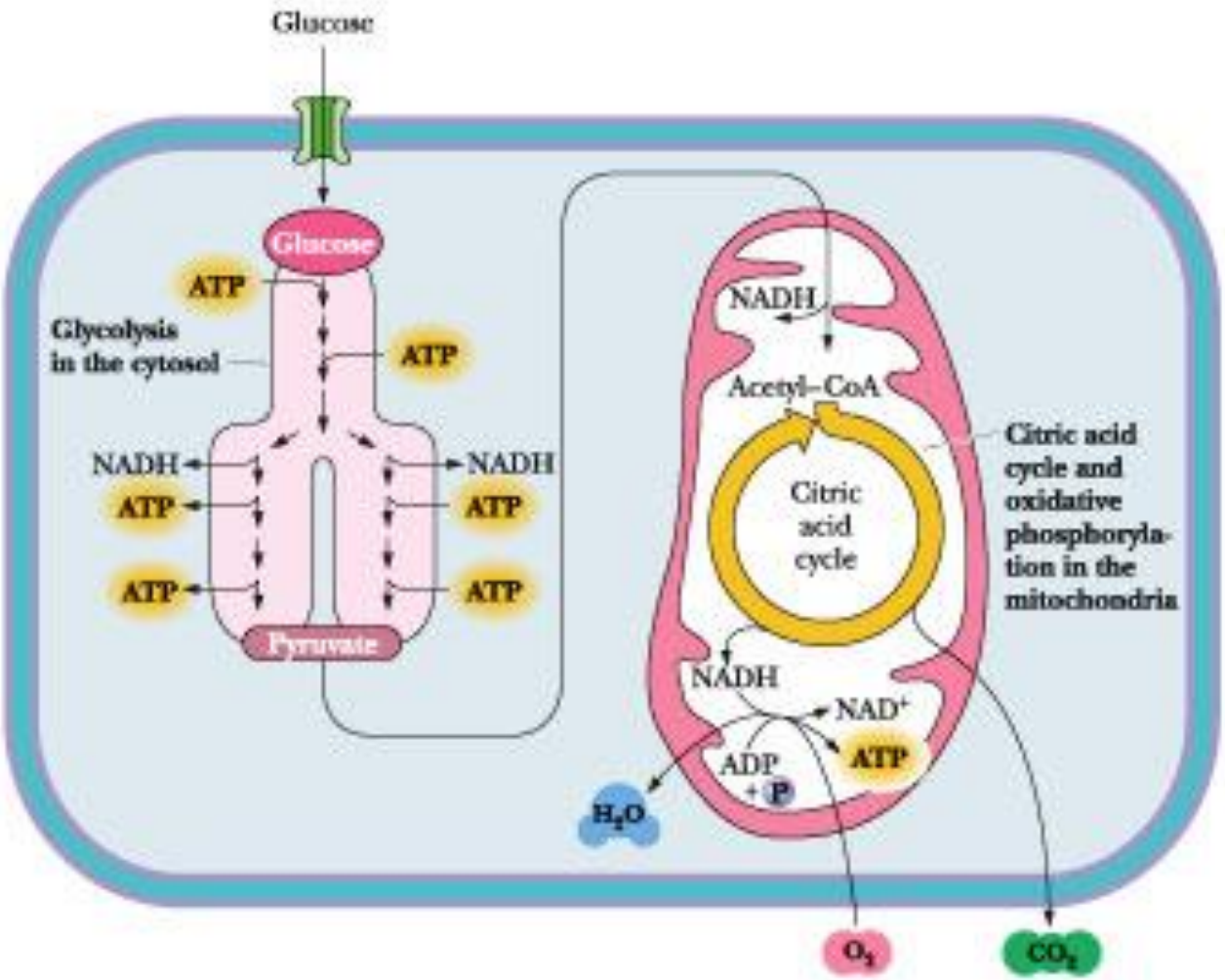
Рис. 1. Структура дыхательной цепи растений и некоторых грибов.

АО найдена у многих видов дрожжей, включая *Rhodotorula glutinis*, *Candida lipolytica* (теперь *Yarrowia lipolytica*), *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *Pichia anomala* (*Hansenula anomala*), *P. pastoris*, *P. stipitis*, *Debaryomyces hansenii*, патогенных для человека дрожжах *Cryptococcus neoformans* и ряде других.

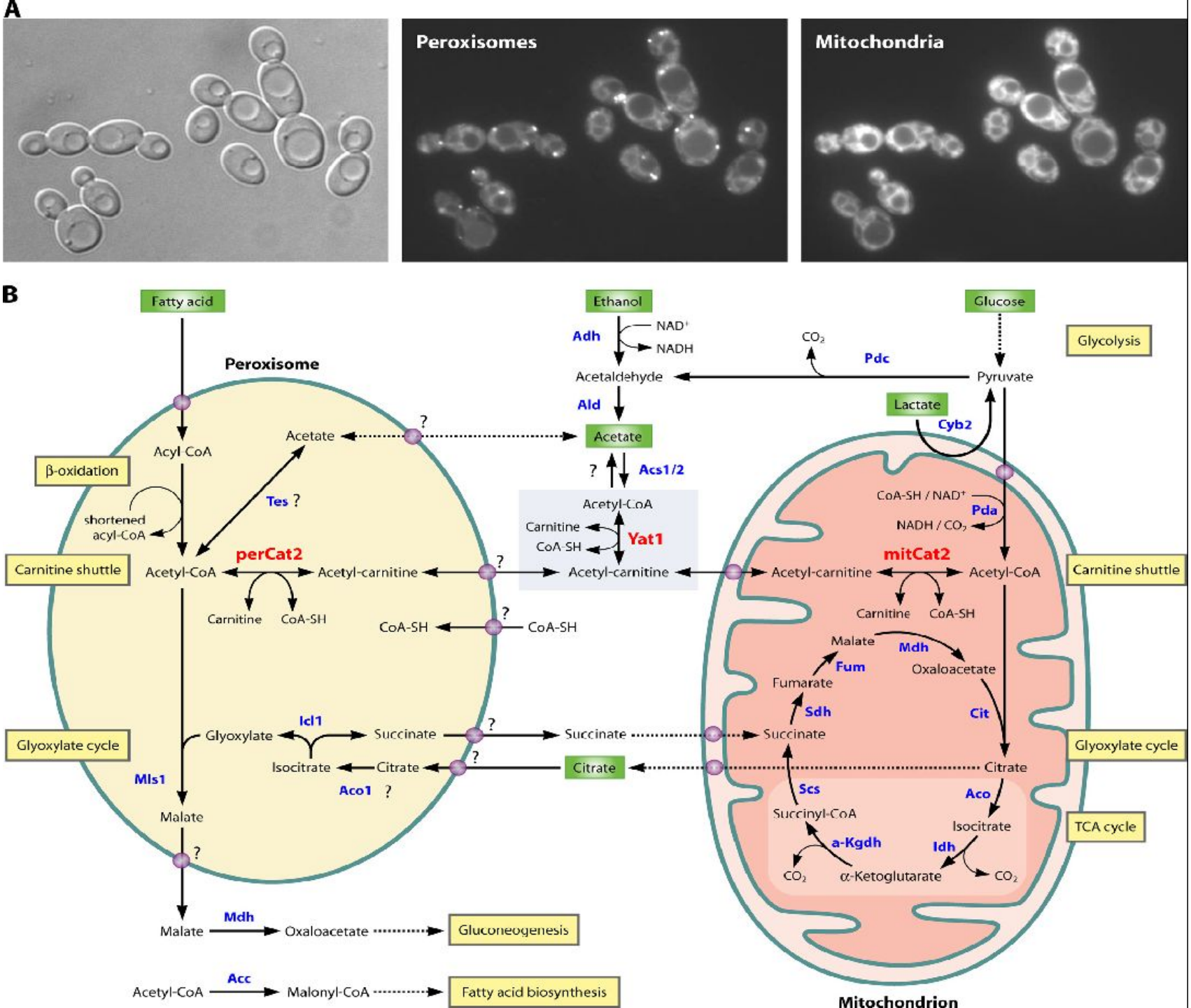
АО обнаружена в ряде грибов, включая *Ustilago ayclis*, *U. maydis*, *Tapesia acuformis*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Ajellomyces capsulatus*, *Podospora anserina*, *Magnaporthe grisea*, *Phycomyces blakesleeanus*, осмофильный дрожжеподобный гриб *Moniliella tomentosa*.

АО найдена у ряда патогенов: в фитопатогенных грибах *Sclerotinia sclerotiorum* и *Septoria tritici*, патогенном для насекомых грибе *Metarhizium anisopliae*, патогенных для человека дрожжах *C. neoformans*, термальном диморфном патогенном грибе человека *Paracoccidioides brasiliensis*, спорах относящегося к грибам внутриклеточного паразита *Antonospora* (*Paranosema*) *locustae* с редуцированным метаболизмом, лишенных канонических митохондрий и цикла трикарбоновых кислот, но сохранивших транслоказу адениновых нуклеотидов для использования АТР хозяина, в полубиотрофном грибе-патогене *Moniliophthora perniciosa*, вызывающем болезнь какао, и эндемическом патогене диморфном грибе *Histoplasma capsulatum*. Патогены приобрели способность экспрессировать АО в клетках хозяина, при этом АО выполняет важную роль в их выживании, особенно, если клетки хозяина подвергаются действию разных факторов стресса.

Метаболические процессы



- Метаболические связи пероксисом и митохондрий


A
Peroxisomes
Mitochondria
B
Fatty acid
Peroxisome
Acyl-CoA
β-oxidation
shortened acyl-CoA
Tes ?
Acetate
Carnitine shuttle
Acetyl-CoA
perCat2
Acetyl-carnitine
Carnitine
CoA-SH
CoA-SH
CoA-SH
Glyoxylate cycle
Glyoxylate
Icl1
Succinate
Isocitrate
Citrate
Aco1 ?
Mls1
Malate
Malate
Mdh
Oxaloacetate
Gluconeogenesis
Acetyl-CoA
Acc
Malonyl-CoA
Fatty acid biosynthesis
Ethanol
Adh
NAD+
NADH
Acetaldehyde
Ald
Acetate
Acs1/2
Acetyl-CoA
Carnitine
CoA-SH
Yat1
Acetyl-carnitine
Citrate
Succinate
Glucose
Glycolysis
CO2
Pdc
Pyruvate
Lactate
Cyb2
CoA-SH / NAD+
Pda
NADH / CO2
mitCat2
Acetyl-carnitine
Acetyl-CoA
Carnitine
CoA-SH
Carnitine shuttle
Malate
Mdh
Oxaloacetate
Fum
Fumarate
Sdh
Succinate
Cit
Citrate
Glyoxylate cycle
Scs
Succinyl-CoA
Aco
Isocitrate
TCA cycle
a-Kgdh
Idh
CO2
α-Ketoglutarate
CO2
Mitochondrion

Funct Integr Genomics (2009) 9:145–151
DOI 10.1007/s10142-008-0095-6

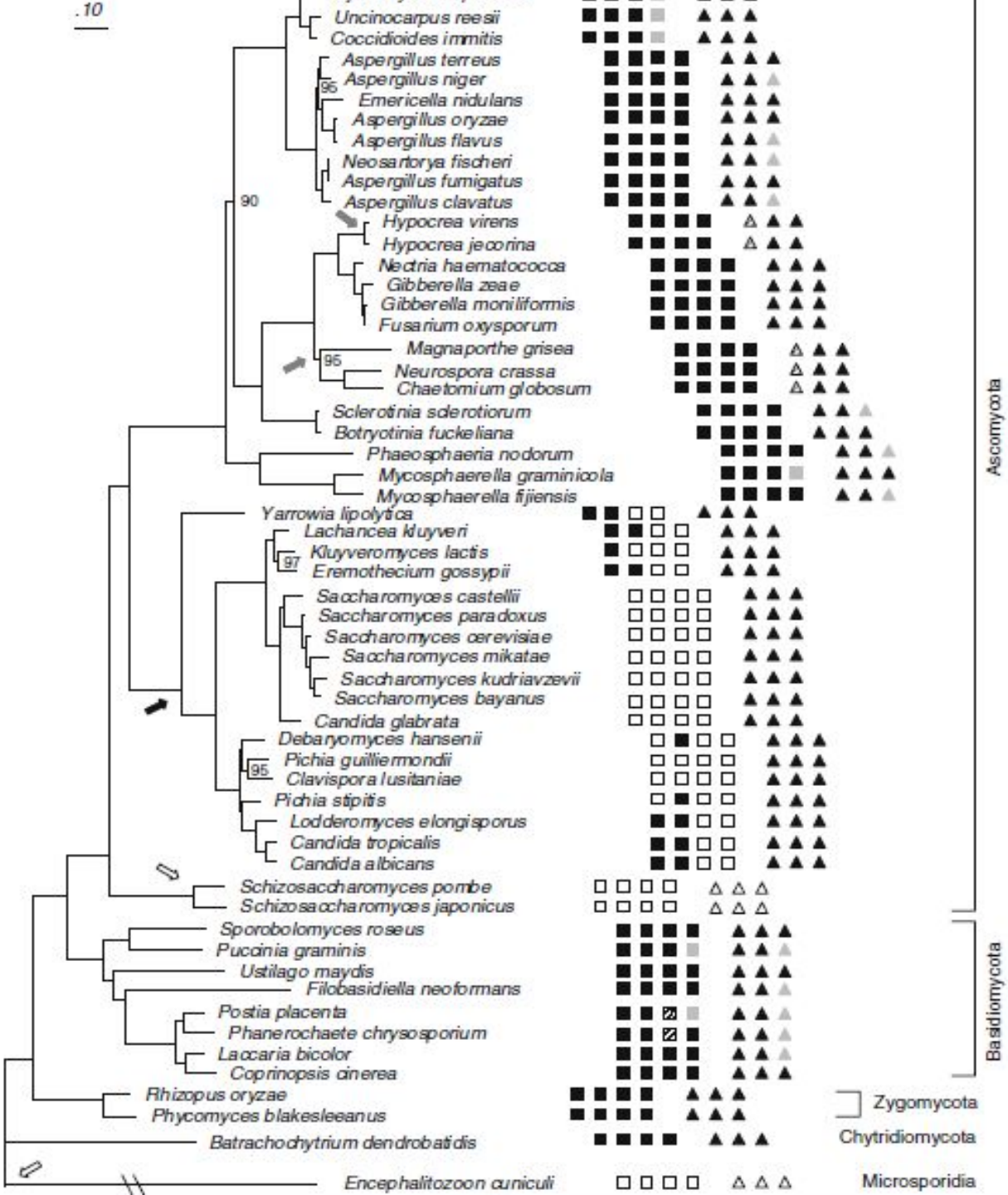
REVIEW

Plasticity of a key metabolic pathway in fungi

Yao-Qing Shen · Gertraud Burger

β-окисление жирных кислот протекает в <u>митохондриях</u> с участием четырех ферментов: ацил-CoA дегидрогеназа, эноил-CoA гидратаза, 3-OH-ацил-CoA дегидрогеназа, 3-кето-ацил-CoA тиолаза.

β-окисление жирных кислот протекает в <u>пероксисомах</u> с участием трех ферментов: ацил-CoA оксидаза, мультифункциональный фермент, 3-кето-ацил-CoA тиолаза



□ ■ β-окисление жирных кислот протекает в митохондриях (ацил-CoA дегидрогеназа, эноил-CoA гидратаза, 3-OH-ацил-CoA дегидрогеназа, 3-кето-ацил-CoA тиолаза).

Δ▲ β-окисление жирных кислот протекает в пероксисомах (ацил-CoA оксидаза, мультифункциональный фермент, 3-кето-ацил-CoA тиолаза)

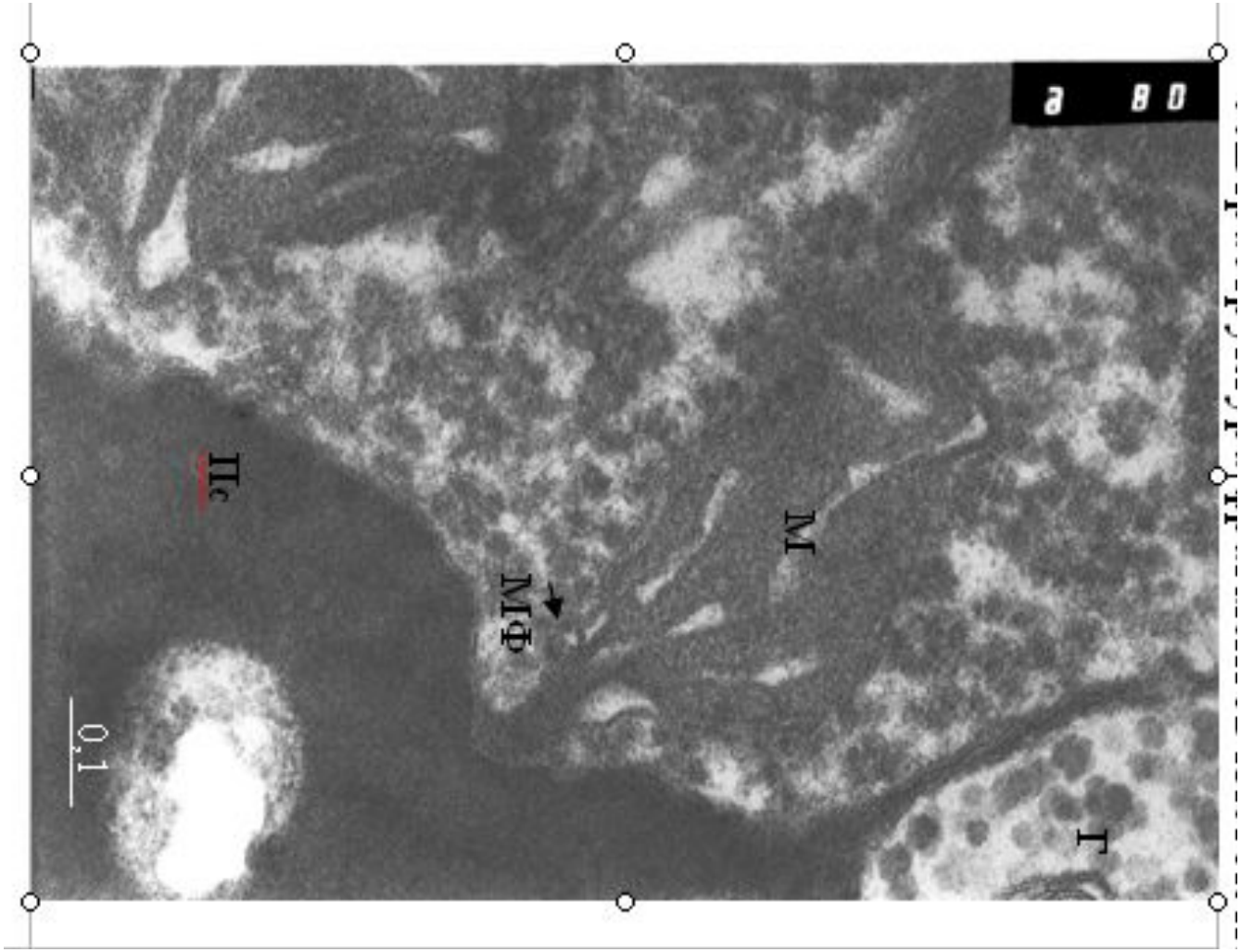
○Δ □ соответствующие ферменты, характерные для β-окисление жирных кисло не обнаружены

Серым закрашенные символы – все гомологи соответствующих ферментов присутствуют у митохондрий и пероксисом

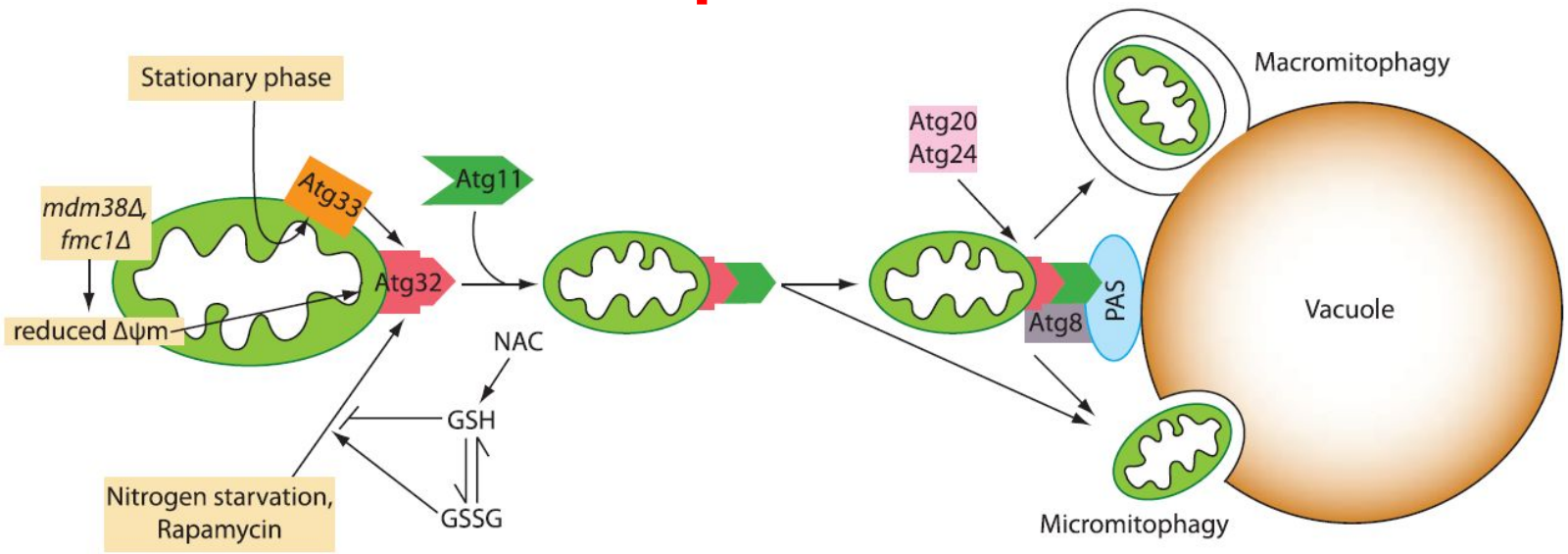
Связь митохондрий с другими органеллами:

пероксисомы и ядра

(митоз и мейоз) (клетки мицелия *Agaricus bisporus, связь митохондрий и пероксисомы)*

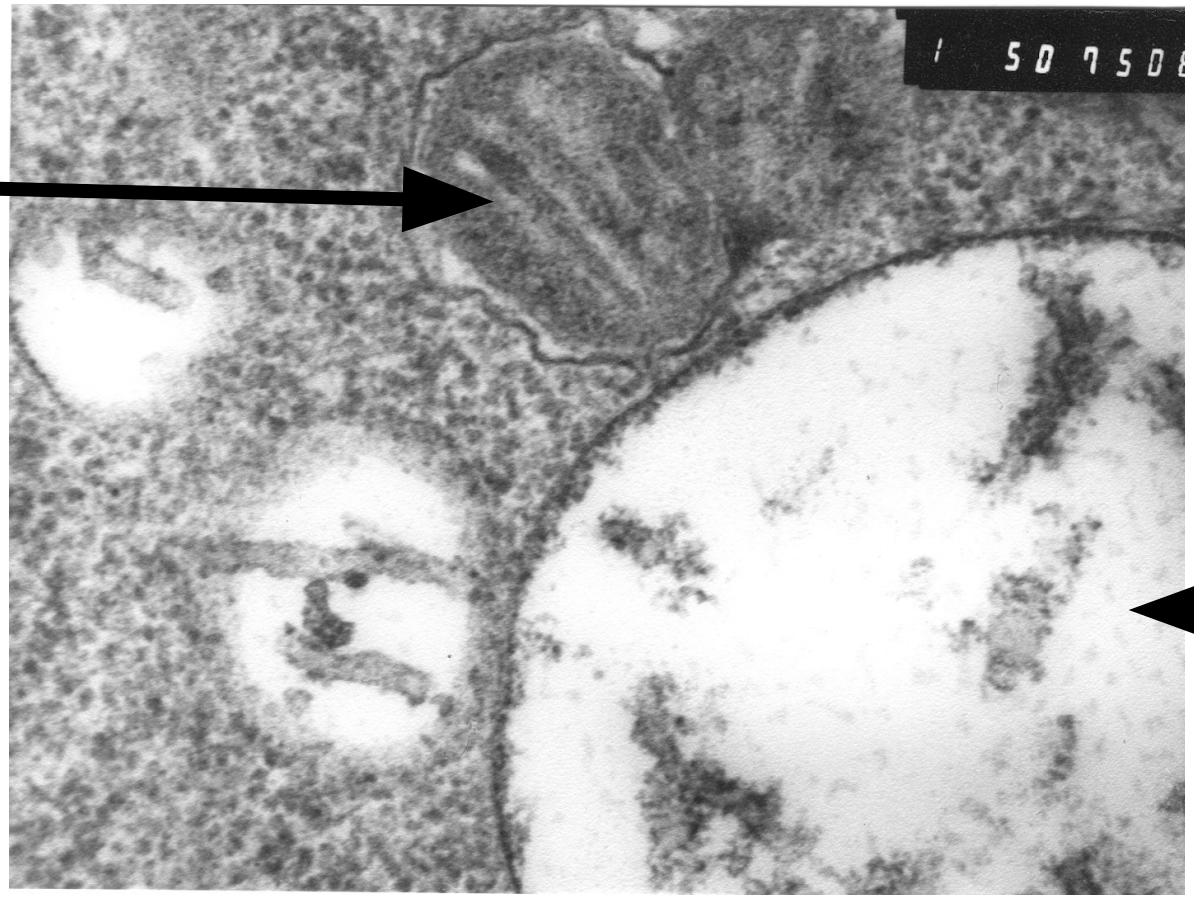


Митофагия



- Схема митофагии у дрожжей. Митофагия индуцируется снижением мембранного митохондриального потенциала, азотным голоданием, рапамицином или входе в стационарную фазу. Снижение пула глютатиона (GSH) ингибируют митофагию. При индукции митофагии, митохондриальный рецептор Atg32 связывается с адапторным белком Atg11. Atg11 набирает митохондрии к комплексу PAS, где Atg32 может связываться Atg8 облегчая формирование фагофора, который окружает митохондрии. Митохондрии могут быть доставлены в вакуоль через макроавтофагоподобный или микроавтофагоподобный механизм.

Макромитофагия *Piptoporus betulinus* (21 ср. мальт-агар)



Митохондрии и старение

- **Старение** (англ. aging) это фундаментальный процесс обнаруженный почти у всех биологических систем и может быть определен как зависимая от времени утрата функции/й и экспоненциальное увеличение скорости наступления смерти (Osiewacz, Kimpel, 1999).
- Старение, прогрессирующий процесс дегенерации, приводящий к возрастозависимому повышению смертности, обнаружено у большинства эукариот (Dufour et al., 2000). Молекулярные механизмы, отвечающие за этот процесс, остаются в большинстве своем неизвестными.

- Признаки старения *Podospora anserina* and *Neurospora crassa* (senescent strains) (Griffiths, 1992, Osiewacz and Hamman, 2006), которые проявляются накануне смерти клеток мицелия:
- Замедление скорости роста мицелия и остановка роста
- Редукция надсубстратного мицелия
- Усиление пигментации
- Формирование нежизнеспособных конидий
- Нарушение апикального роста гиф
- Подавление цитоплазматического наследования

Митохондриальные факторы старения *P. anserina*

α-sen ДНК представляет собой особый мобильный интрон – первый интрон (*Cox1*-i1, α-интрон, или pl-интрон) митохондриального гена *cox1*, кодирующего первую субъединицу цитохром *c*-оксидазы (cytochrome *c* oxidase, COX, Stahl et al., 1978; Cummings et al., 1979), акселератор/модулятор старения, который приводит к реорганизации митохондриального генома и дисфункции митохондрий

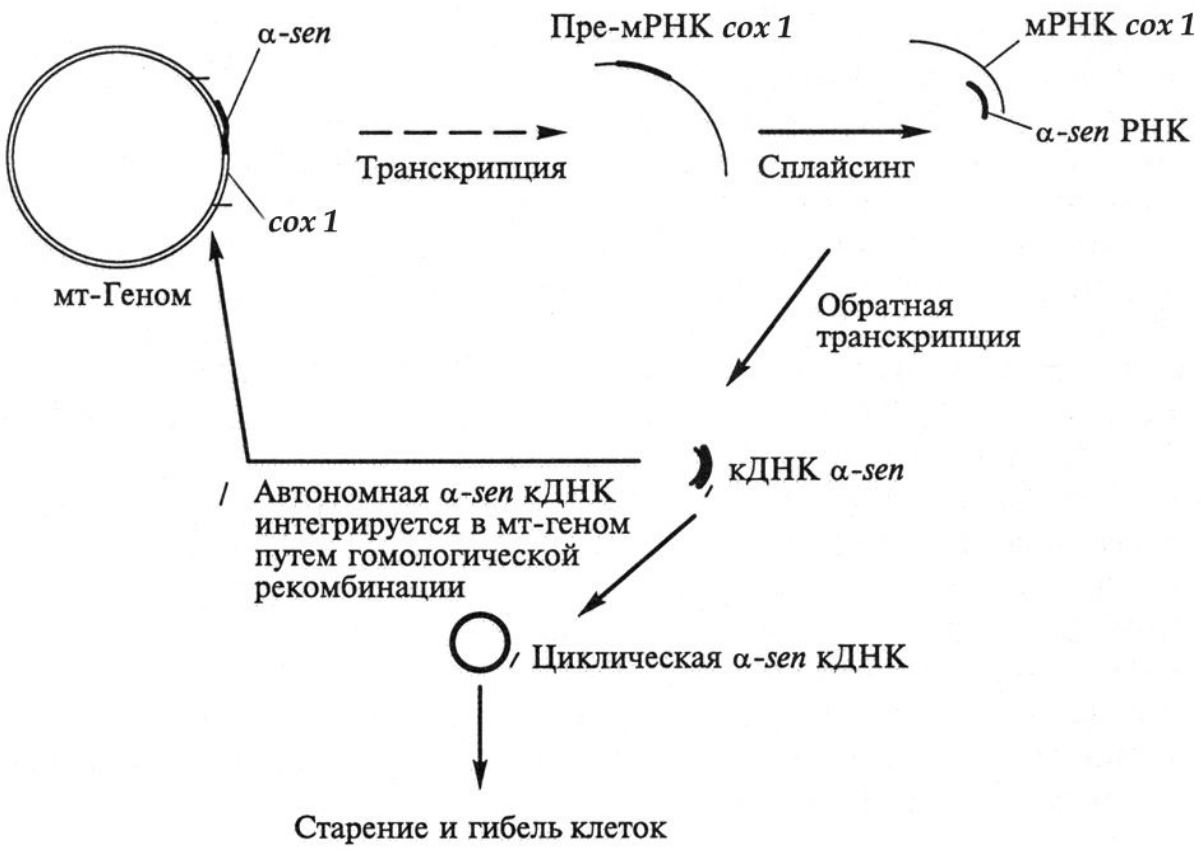
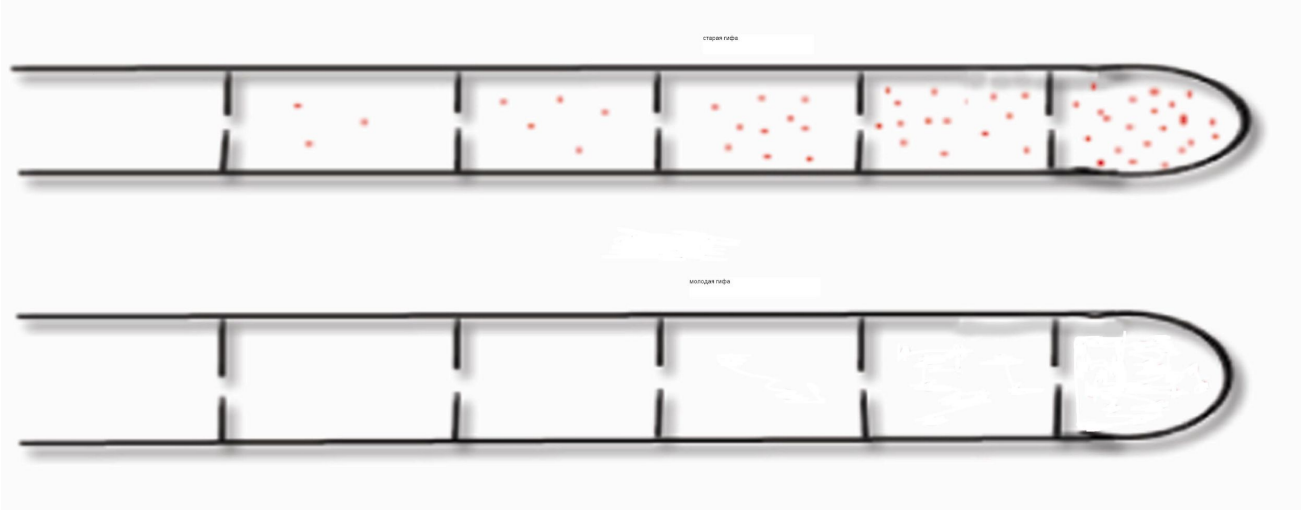


Схема вырезания и накапливания последовательности α-sen в стареющих культурах *P. anserina* (Дьяков и др., 2005)

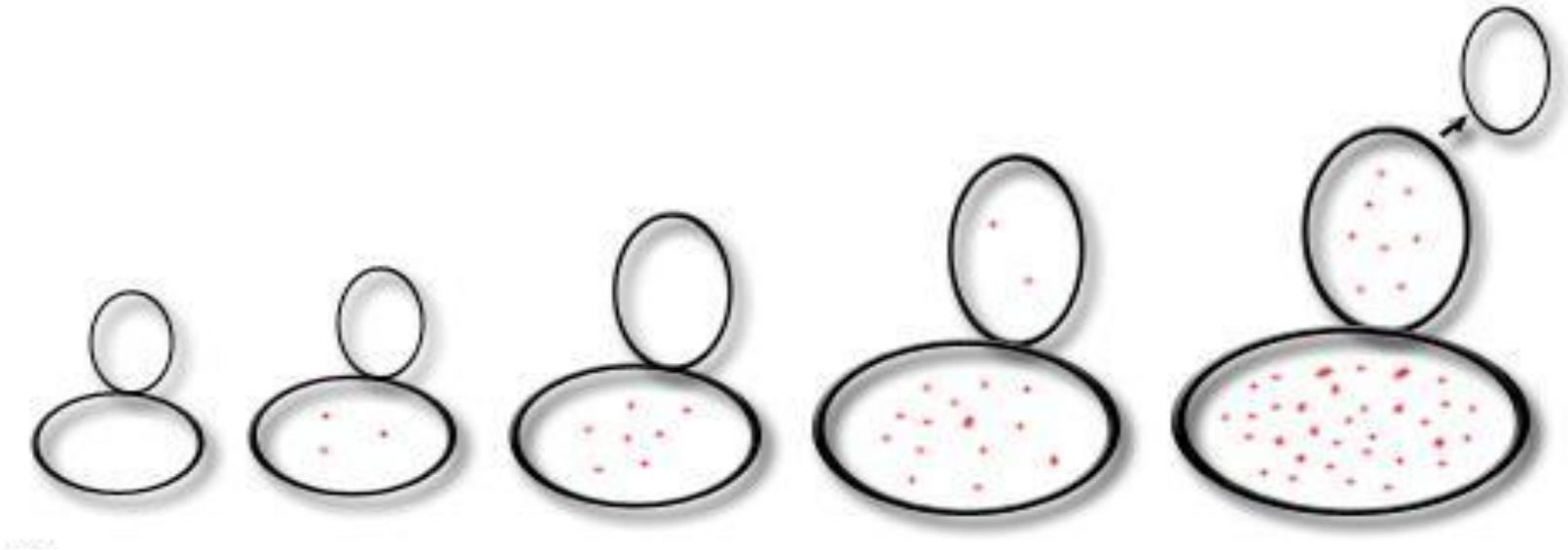
Накопление факторов старения у *Podospora anserina*



Гифа сверху Модельная схема накопления и распределения между клеток условного фактора старения. у *P. anserina*.

Гифа снизу Модель молодой гифы

Накопление факторов старения у дрожжей



Модельная схема накопления и распределения между клетками условного фактора старения у дрожжей. У дрожжей условный фактор старения (красные точки) долгое время не передается дочерним клеткам и накапливается только в материнской (фильтрация).

Фактор старения дрожжей - рДНК-повторы (Bitterman et al., 2003), экстрахромосомные кольцевые фрагменты рДНК (до 1000 в клетке).

Роль митохондрий в апоптозе клетки

Особая роль митохондрий в системе выбора клетки между жизнью и смертью определяется тем, что они являются основными генераторами активных форм кислорода в клетке, а их межмембранное пространство служит депо проапоптотических факторов.

Признаки апоптоза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

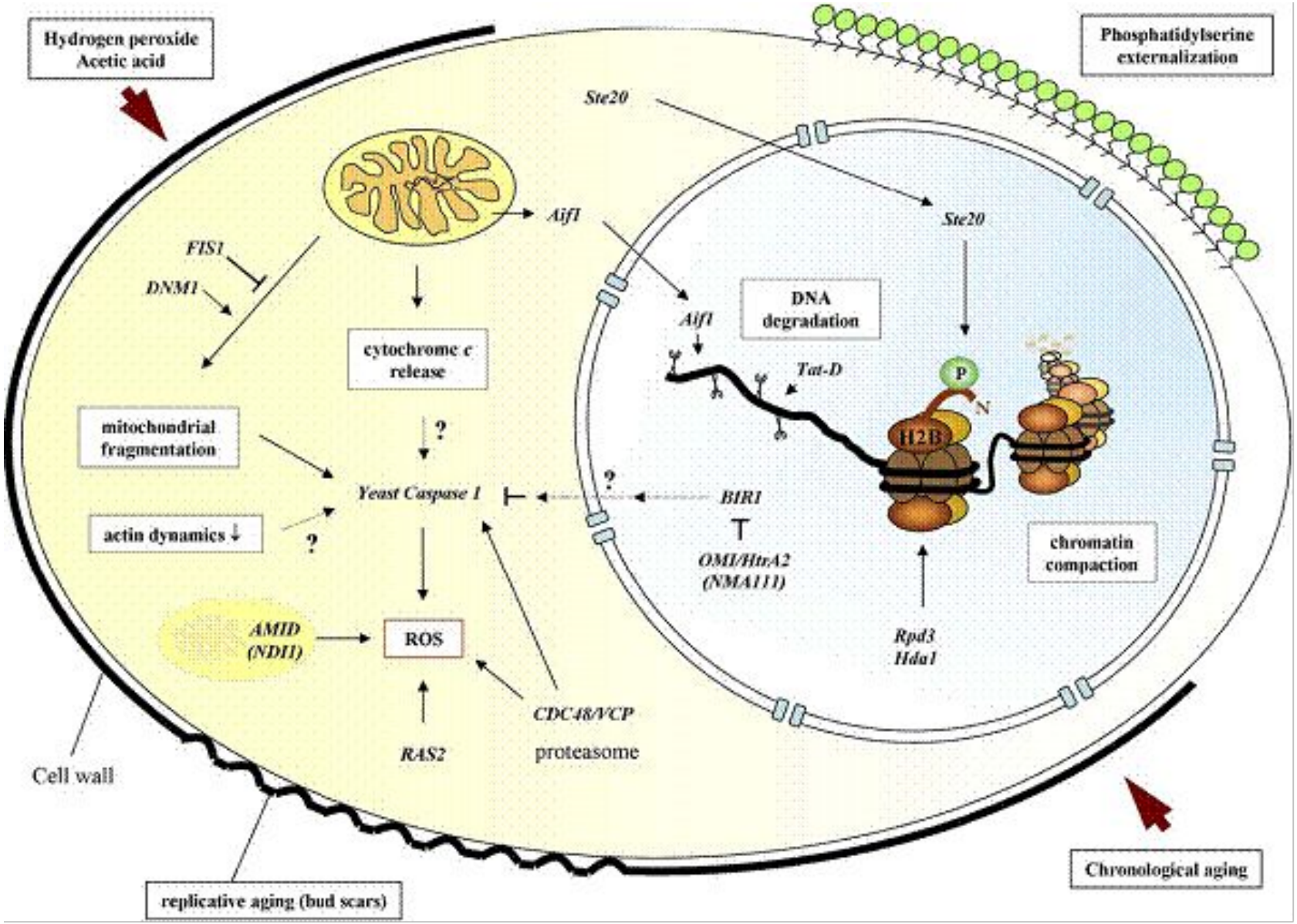
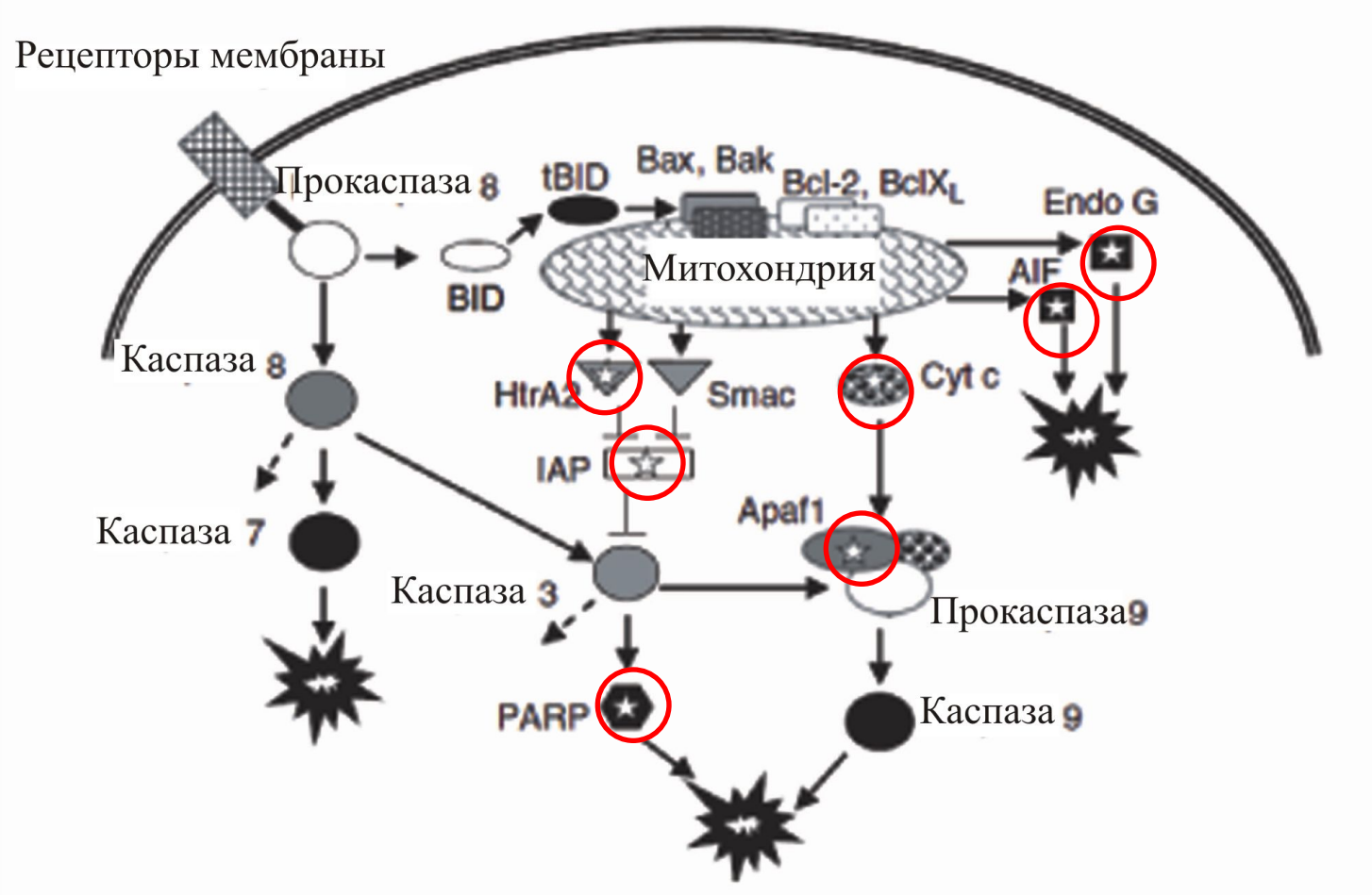
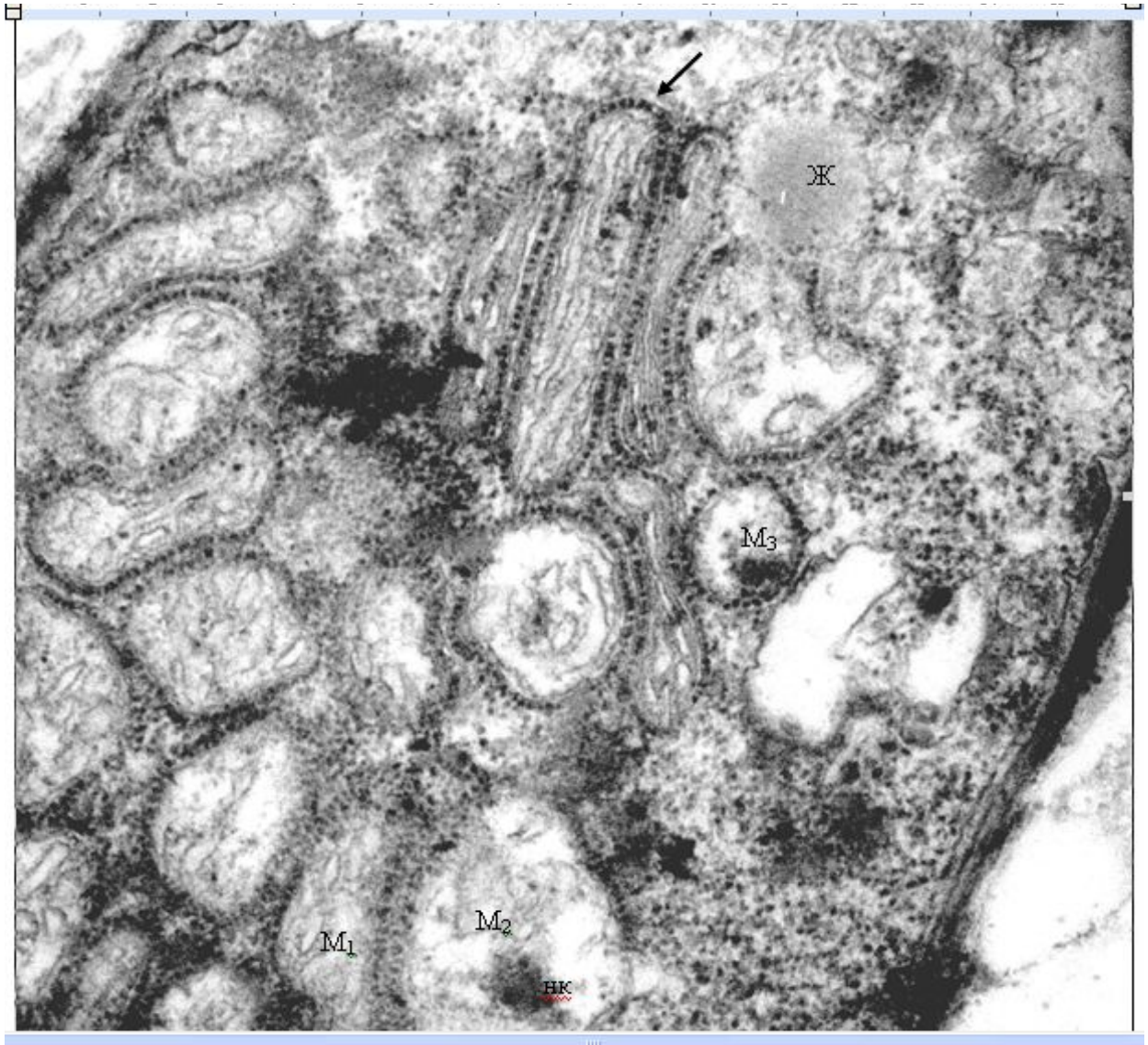


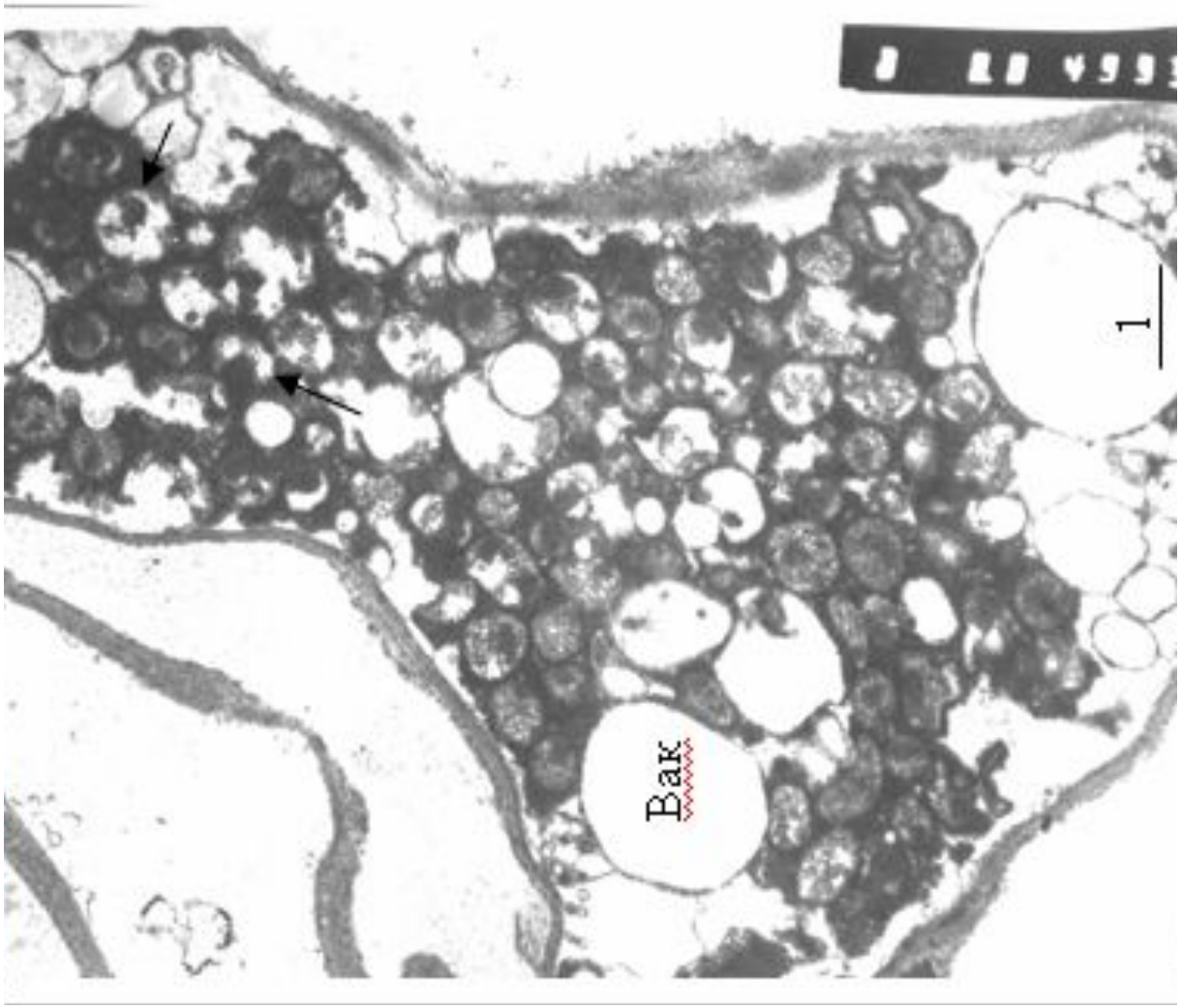
Схема путей апоптоза у грибов



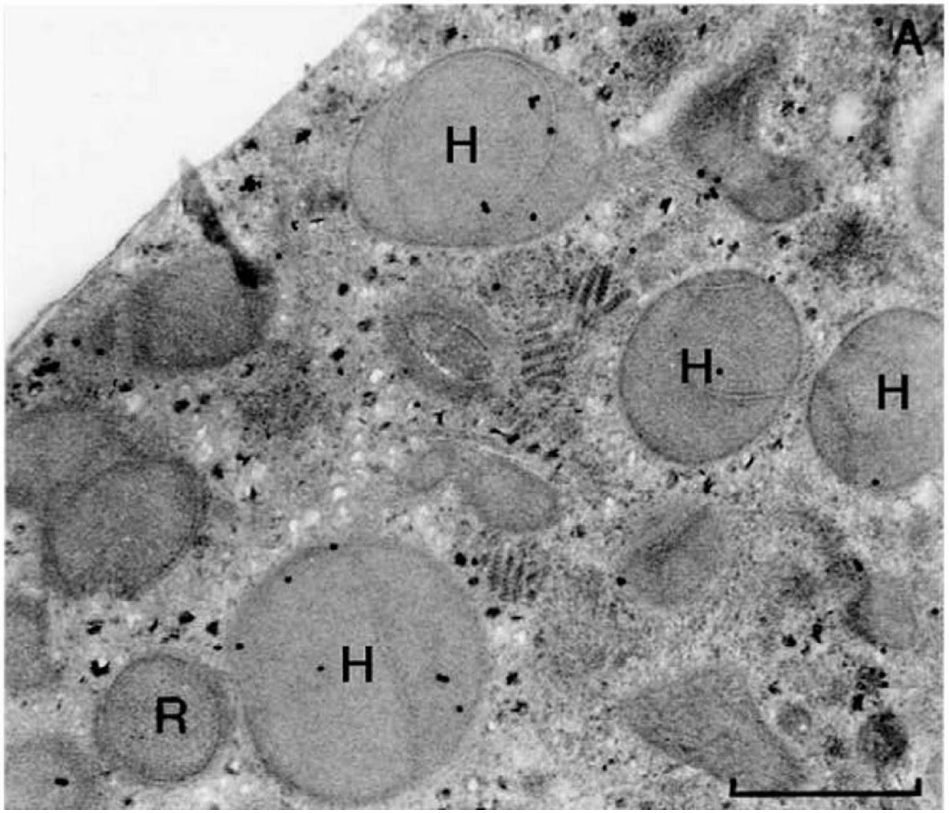
Морфология митохондрий клеток глубинного мицелия *Agaricus bisporus*, находящегося в стадии апоптоза

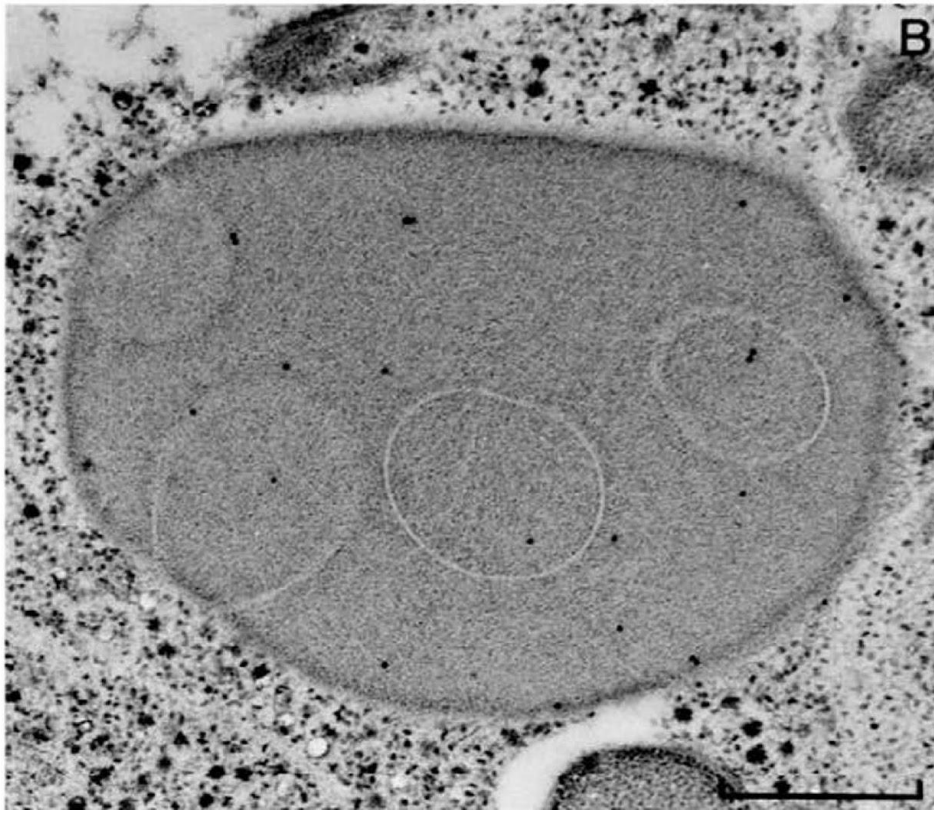


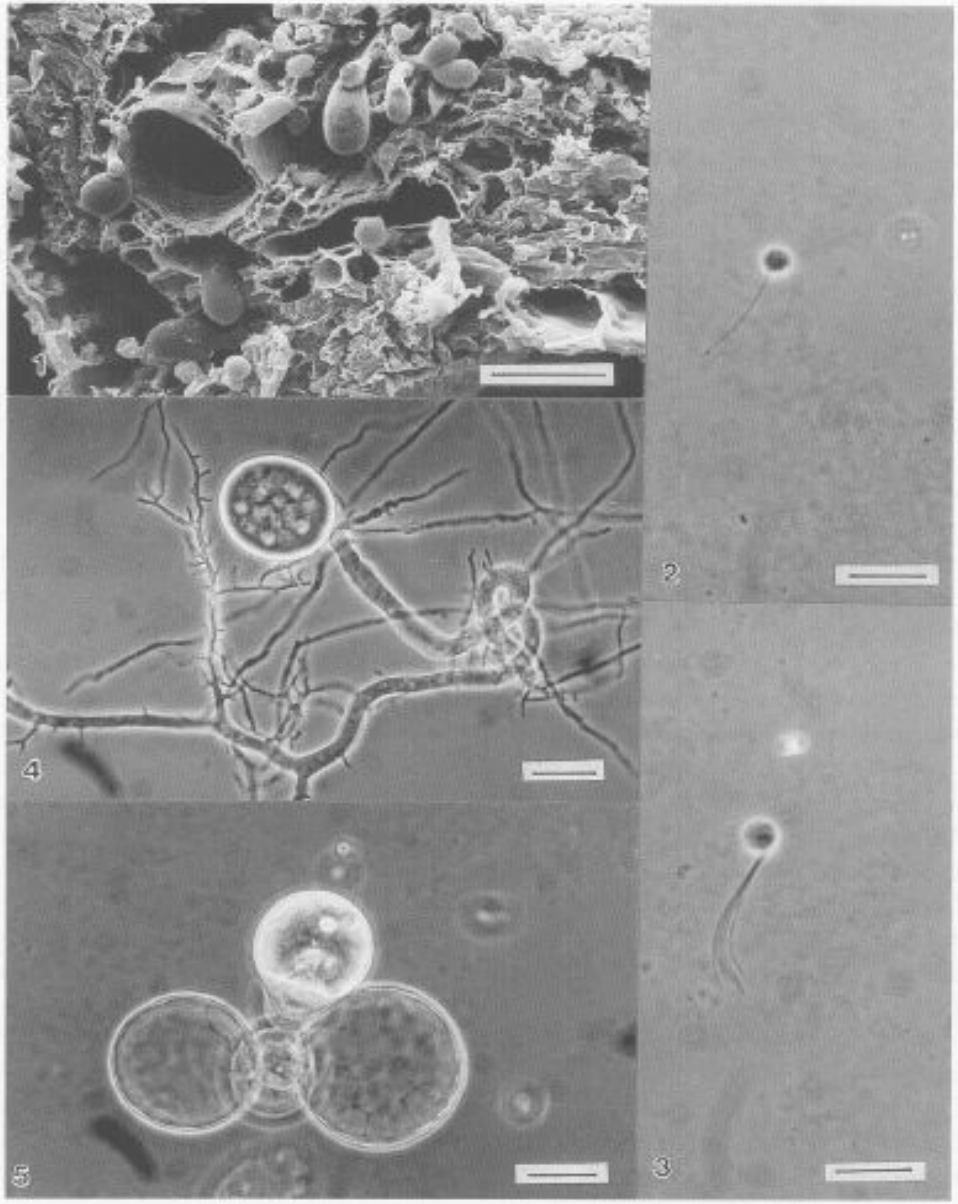
Ультраструктура апоптотической клетки глубинного мицелия *Agaricus bisporus* после длительного культивирования



Гидрогеносомы







Figs. 1-5. Scanning electron micrograph and light micrographs. **1.** Fungi colonising the thick-walled sclerenchyma and vascular tissues of a rice straw fragment in the rumen of a goat. **2.** A uniflagellated zoospore (*P. minutus*). **3.** A polyflagellated zoospore (*N. frontalis*). **4.** An anaerobic rumen fungus (*N. frontalis*) with filamentous myceloid rhizoids. **5.** An anaerobic rumen fungus (*C. communis*) with bulbous rhizoids. Bars: 1 = 25 μm; 2-5 = 20 μm.

Распространение

- Гидрогеносомы были обнаружены примерно 40 лет назад. Эти органеллы присутствуют у разных неродственных анаэробных эукариот, у которых нет митохондрий (например, хитридиевые грибы, анаэробные флагелляты и цилиаты). Гидрогеносомы имеют сферическую или овальную форму, 1–2 мкм в диаметре, не содержат ДНК. Сходно с микротельцами белки гидрогеносом кодируются ядром, синтезируются в цитозоле и транспортируются в органеллы.

Происхождение

- Полагают, что эти органеллы произошли от эндосимбиотических анаэробных бактерий или архей, хотя в случае трихомонад вопрос остаётся открытым. Предполагают также, что они могут быть сильно модифицированными митохондриями. Показано присутствие белков теплового шока (Hsp60 и Hsp70) в гидрогеносомах *Neocallimastix patriciarum*, которые участвуют в митохондриальном импорте и фолдинге (от англ.folding укладка) белков, что может свидетельствовать о том, что гидрогеносомы имеют митохондриального предка или общего предка гидрогеносом и митохондрий.

Функции

- Главная функция гидрогеносом – это окислительное декарбоксилирование пирувата, сопряженное с образованием АТФ, с электронным транспортом через ферредоксин, который заканчивается образованием молекулярного водорода.

- Анаэробные хитридиевые (например, виды *Neocallimastix* и *Piromyces*) метаболизируют малат (образованный из глюкозы) с образованием АТФ и ацетата. Восстановленные эквиваленты в результате декарбоксилирования малата не переходят в митохондриальную электрон-транспортную цепь, но используются Fe-гидрогеназой для формирования молекулярного водорода.

Ключевые ферменты гидрогеносом: пируват: ферредоксин оксидоредуктаза и гидрогеназа

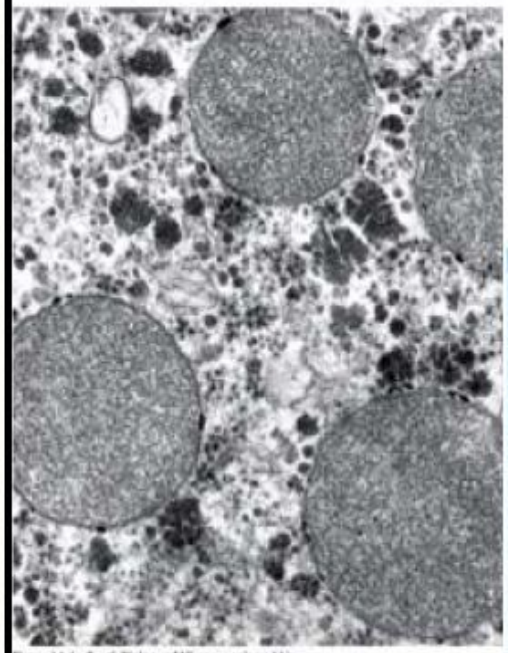
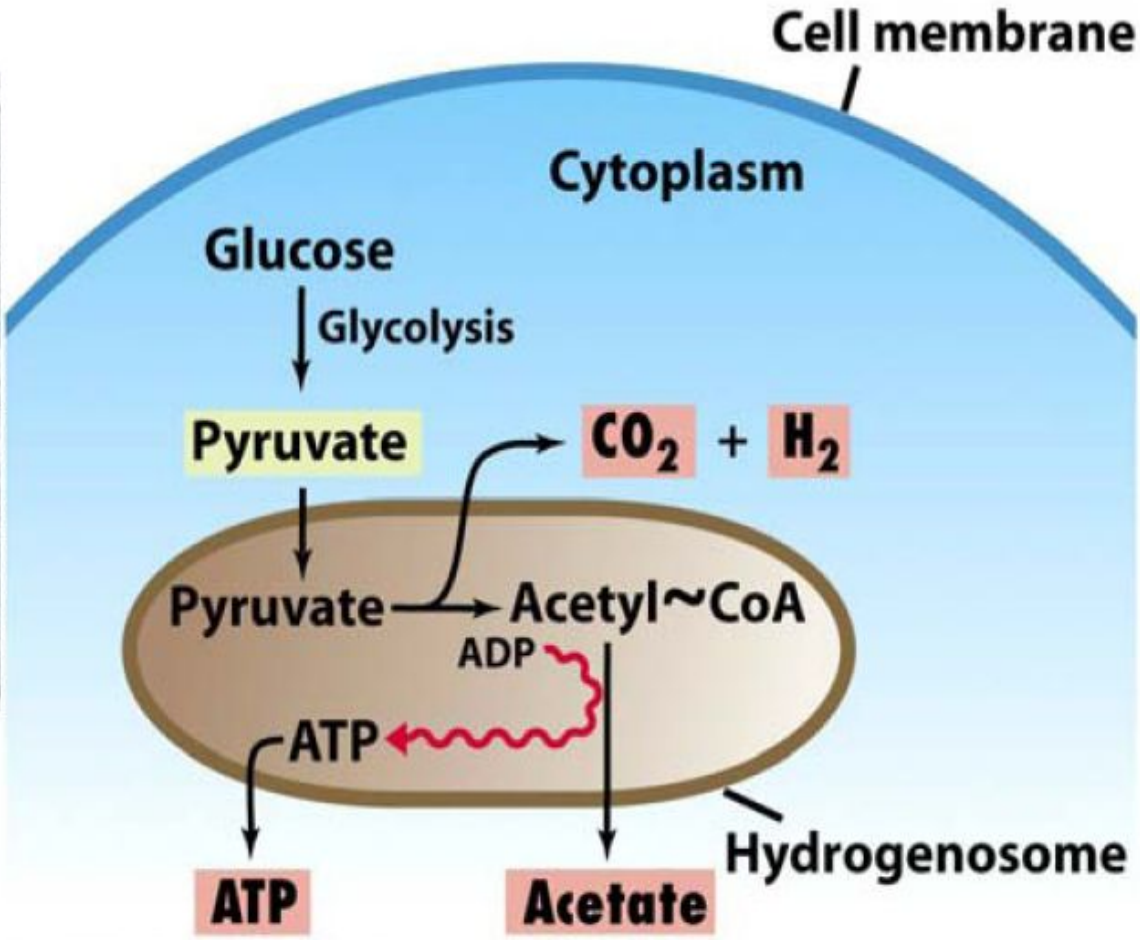
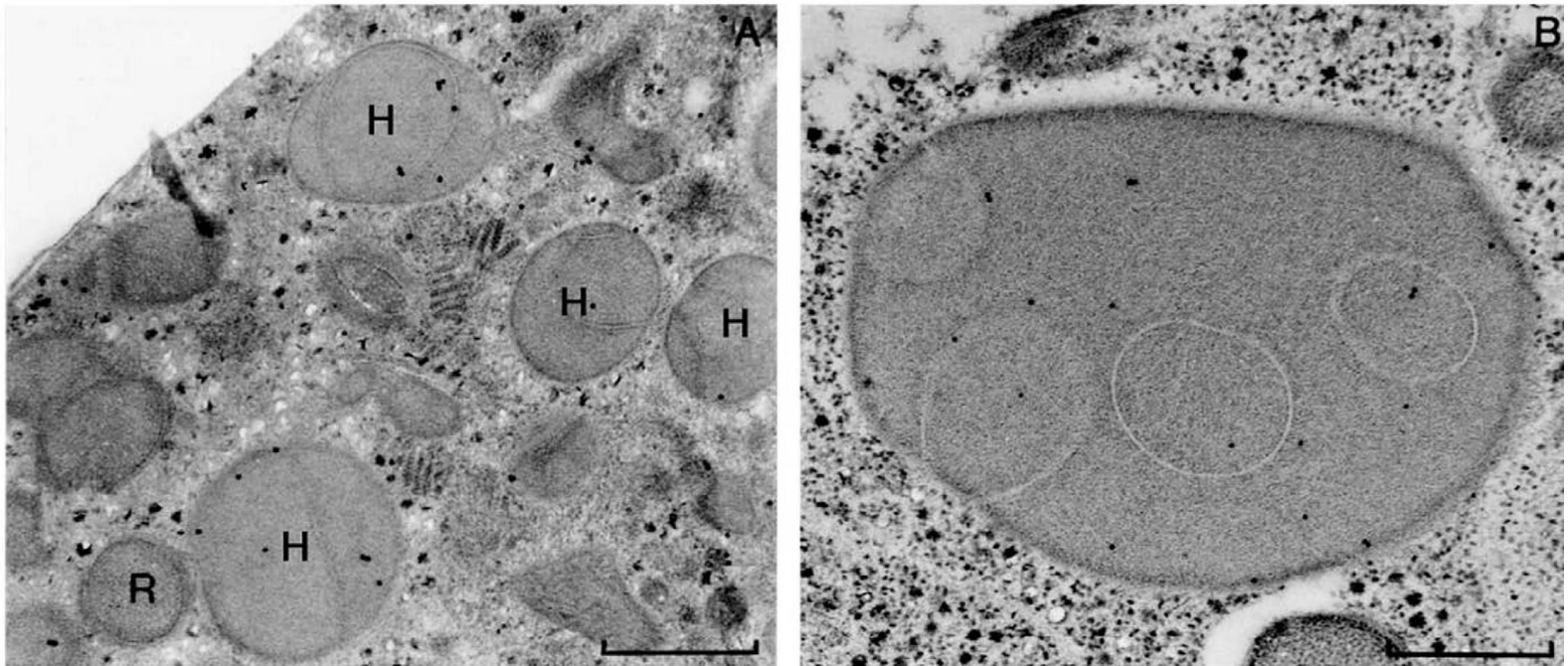


Figure 14-4a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



Биогенез

- Молекулярные механизмы биогенеза гидрогеносом еще во многом неизвестны. Гидрогеносомы делятся тремя способами, сходными с митохондриями: фрагментацией, делением пополам, и в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Они могут делиться в любой фазе цикла клетки/организма и от нее не зависят. Они окружены двумя мембранами и имеют гранулярный матрикс. Гидрогеносомы анаэробного гриба *Neocallimastix* sp. имеют одну или множество периферических везикул, содержащих кальций. Периферические везикулы могут быть изолированы от матрикса гидрогеносом и представляют собой четкий компартмент гидрогеносомы. Гидрогеносомы с нарушенными функциями удаляются автофагическим путем и подвергаются деградации в лизосомах.