



УДК 576.311.347:577.112:576.385

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ И ЕГО РОЛЬ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Костерина Е.А., Козенков И.И., Касымов В.А., Каменский П.А., Доминова И.Н.,  
Королёва Ю.А., Патрушева В.Е., Богачев Р.С., Литвинова Л.С., Бабак С.В., Моисеева Е.М.,  
Богданов Е.А., Мухортова О.А., Вавилина Я.С., Михальченкова Т.А., Патрушев М.В.

*Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград*

### РЕЗЮМЕ

Собственная ДНК митохондрий кодирует лишь 13 полипептидов – субъединиц электрон-транспортной цепи. Большинство же белков импортируются в митохондрии посредством различных механизмов. Последние исследования митохондриального протеома продемонстрировали истинные размеры и сложную функциональную организацию митохондриальных белковых профилей. Для протеомного профилирования митохондрий применяются различные технологии, которые в сумме представляют результаты, помогающие понять молекулярные механизмы функционирования органелл и выявить нарушения, приводящие к различным заболеваниям. В данном обзоре рассмотрены и проанализированы последние данные в области протеомики митохондрий и затронуты некоторые аспекты молекулярного патогенеза заболеваний дыхательной цепи.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондриальный протеом, импорт белков, компоненты дыхательной цепи, митохондриальная ДНК, заболевания дыхательной цепи.

### Введение

Определение последовательности митохондриального генома человека (мтДНК) стало важной вехой в истории биологии и митохондриальной медицины. Результатом, опубликованным в 1981 г. в журнале *Nature*, стала полная последовательность кольцевой молекулы мтДНК размером 16 569 п.н. [1]. В этом же номере журнала *Nature* были опубликованы работы, в которых впервые описаны РНК и белки, кодирующиеся митохондриальным геномом [2, 3]. С тех пор геном митохондрий и его продукты широко исследуются в различных аспектах, начиная от наследственных патологий и заканчивая миграционными процессами. Эти работы дали начало серии исследований по определению полиморфизмов мтДНК и их роли в патологиях, передающихся по материнской линии, о которых впервые было упомянуто в 1988 г. [4–6]. К настоящему времени локализованы и функционально охарактери-

ризованы в качестве этиологических факторов патогенеза более 150 мутаций мтДНК [7]. Текущая работа направлена на более глубокую характеристику патогенных и доброкачественных вариантов митохондриального генома [8–10].

Уже на ранних этапах исследования мтДНК стало понятно, что ее кодирующая емкость не может обеспечить полную потребность митохондрий в белках. Все 13 белков, кодируемых мтДНК млекопитающих, являются компонентами цепи окислительного фосфорилирования, посредством которой осуществляется синтез основной массы АТФ в клетке. Оставшиеся (примерно 77) субъединицы дыхательной цепи кодируются ядерным геномом, как и все белки, необходимые для транскрипции, трансляции, модификаций и комплексообразования [11]. Компоненты многих других митохондриальных биохимических каскадов также кодируются ядерной ДНК. Кроме того, в течение десятилетий исследований после первого секвенирования мтДНК стало понятно, что митохондриальные болезни, наследуемые по материнской линии, пред-

✉ Патрушев Максим Владимирович, тел.: 8 (4012) 59-55-95, доб. 6630, e-mail: mpatrushev@innopark.kantiana.ru

ставляют лишь около 15–20% от всех митохондриальных нарушений человека [12].

К концу 1990-х гг. стала более или менее понятна ключевая роль ядерного генома в функционировании митохондрий, однако тогда трудно было представить, какое количество белков, кодируемых ядерной ДНК, импортируются в митохондрии. На полуколичественных двумерных (2D) электрофоретических гелях высокоочищенных митохондрий исследователям удалось выявить около 1 500 индивидуальных пятен [13], каждое из которых соответствует определенному белку, что позволило оценить истинный размер митохондриального протеома. Интересно, что геномы альфа-протеобактерий, которые являются ближайшими живыми родственниками современных митохондрий, кодируют всего около 1 000 различных белковых продуктов [14]. Суммируя эти факты, можно предположить, что размер митохондриального протеома составляет приблизительно 1 000–1 500 белков. В 2001 г., после завершения амбициозного проекта по определению последовательности ДНК человека, началась систематизация перечня митохондриальных белков. В то время были четко идентифицированы только около 350 различных митохондриальных белков человека. С тех пор исследования, ключевыми данными которых являлись последовательности генов, а также результаты масс-спектрометрических исследований позволили продвинуться далеко вперед в каталогизации митохондриальных протеомов различных видов. Эти успехи обусловили и прогресс в понимании этиологии широкого спектра патологий человека.

К митохондриальному протеому относится подмножество полипептидов из 2 тыс. белков (у млекопитающих) [15]. Собственно митохондриальными могут называться белки, которые локализованы в митохондриальном матриксе, мембранах или межмембранном пространстве митохондрий. Несмотря на кажущуюся простоту, отнесение того или иного белка к митохондриальному протеому – задача нетривиальная, так как существуют постоянно мигрирующие белки, белки, присутствующие в чрезвычайно малых количествах, и, наконец, белки, которые можно обнаружить только на определенных стадиях клеточного цикла или же в определенных типах клеток. Из этого следует, что нет какого-то одного метода, который бы мог идентифицировать и охарактеризовать весь митохондриальный протеом. Ниже рассмотрены самые распространенные методы митохондриальной протеомики.

## Технологии исследования протеома митохондрий

С помощью биоинформационных технологий (ИТ), основанных на поиске целевых последовательностей белков – компонентов митохондриального протеома, идентифицировано по крайней мере пять различных механизмов импорта белков в митохондрии [16]. Один из основных путей основан на переносе белков в матрикс с включением дополнительной расщепляемой последовательности пептида, содержащей 15–50 аминокислотных остатков, которые образуют  $\alpha$ -спираль из положительно заряженных аминокислот на одной стороне и незаряженных, гидрофобных остатков – на другой. Некоторые из этих белков отсортировываются на внутренней мембране и в межмембранном пространстве на основе чередования пептидных последовательностей. Другой механизм опосредует импорт белков внешней мембраны через карбокситерминальный сигнал. Также существует отдельный механизм импорта гидрофобных белков внутренней мембраны, основанный на формировании конформационной петли с помощью серии несмежных внутренних сигналов ориентации [17]. Некоторые небольшие цистеин-богатые белки межмембранного пространства импортируются с помощью собственного внутреннего сигнала ориентации (например, Tim9 и Tim10 в дрожжах) [18, 19]. Наконец, многие белки просто «цепляются» своим гидрофобным хвостом за внешнюю мембрану с помощью  $\alpha$ -спиралей [16]. С использованием ИТ были разработаны многие алгоритмы для математического прогноза и определения расщепляемого таргет-сигнала и реализованы в таких программных продуктах, как TargetP [20], pTARGET [21], PSORT [22], iPSORT [23], Predotar [24], ngLoc [25], MitPred [26], MitoPred [27] и MitoProt [28, 29].

Основные ограничения вычислительных технологий заключаются в большом проценте ложноположительных результатов, а также в невозможности обнаружения таргет-сигналов для всего протеома, так как дополнительные, внедренные в результате процессинга белков последовательности представляют лишь один из множества механизмов импорта. Для примера: одна популярная программа (TargetP) обнаруживает сигнал лишь в 60% белков, митохондриальная локализация которых доказана экспериментально. Однако, по другим оценкам, 69% ее предсказаний являются ложными; при самых «строгих» настройках TargetP выдает 3% ложноположительных результатов, причем обнаруживает таргет-сигналы только у 20% митохондриальных белков [30]. Учитывая приведенный пример низкой чувствительности и специфичности программы, она не может применяться как самостоятельный инструмент в определении таргет-сигналов.

Своеобразным золотым стандартом в идентификации и характеристике митохондриального протеома, как, впрочем, и протеома человека в целом, являются методы масс-спектрометрии (МС). Кажущаяся простой задача разделения и идентификации митохондриальных белков является в действительности технически сложной, учитывая их количество и широкий динамический диапазон (по массе и изоэлектрическим характеристикам). Пионерские исследования, проведенные в 1998 и 2001 гг. с использованием 2D-электрофореза и МС позволили определить 46 белков плацентарных митохондрий человека [31] и 80 митохондриальных белков одной линии нейробластомы человека [32]. Преимущества тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) были доказаны в работе, результатом которой стало обнаружение 615 митохондриальных белков сердца человека [33] и 399 белков митохондрий головного мозга, сердца, почек и печени мышей [34]. Однако тщательный анализ показал, что в этих исследованиях были обнаружены только те белковые молекулы, которые присутствуют в больших количествах [34]. Новые поколения МС/МС-технологий более чувствительны и позволяют обнаруживать белки, количество которых не превышает 5 ppb. Например, Т. Kislinger с коллегами определили 2 533 белка из митохондриальных экстрактов мозга, сердца, почек, печени, легких и плаценты мышей [35]. Ряд дополнительных исследований выявили 1 130 митохондриальных белков из адипоцитов и клеток линии 3T3-L1 [36]; 1 162 из мозга, печени, сердца и почек крыс [37]; 689 белков мышц, сердца и печени крыс [38] и 297 из печени мыши [39]. Pagliarini и соавт. проанализировали митохондриальные экстракты из 14 разнообразных тканей мышей и обнаружили в общей сложности 3 881 белок [40].

Важно отметить, что не все белки, обнаруженные в митохондриальных экстрактах в ходе приведенных исследований, являются истинно митохондриальными (по локализации). Эта поправка обусловлена возросшей чувствительностью приборов нового поколения, способных обнаруживать крайне малые количества белков, которые попали в митохондриальные экстракты вследствие несовершенства процедур их очистки от компонентов цитозоля клеток. По различным оценкам, таких контаминантов в митохондриальных экстрактах присутствует до 75% от общей массы белков в экстракте. Сегодня существует один экспериментальный подход, позволяющий отличить истинный митохондриальный белок от контаминантов. Метод заключается в корреляции белковых профилей и основывается на предварительной очистке митохондрий в градиенте сахарозы с последующим сравнением пеп-

тидных профилей различных фракций градиента и выравниванием по маркерным для каждой органеллы белковым профилям. Последующие наложения профилей позволяют исключить совпадающие компоненты и выявить истинно митохондриальные белки. Применение этого метода позволило L.J. Foster и соавт. выявить 1 404 белка различных органелл, в том числе 297 митохондриальных [39]. Сравнивая данные, полученные с применением компьютерных технологий и МС/МС, Т. Kislinger и соавт. смогли отнести к митохондриальным только 334 из 2 533 белков, обнаруженных вычислительными методами [35].

Также к успешно применяемым подходам по локализации белков можно отнести методы микроскопии, при которых используется принцип иммунофлуоресценции нативных белков при наличии антител к эндогенным эпитопам. В ряде случаев осуществляются подходы, в которых исследуемый белок метится эндогенным маркером при связанной экспрессии. К сожалению, ограничение иммунологического метода состоит в частом отсутствии высококачественных антител. При исследовании протеома дрожжей успешно применялись технологии меченя эндогенными флуоресцентными белками [40, 41],

они же были апробированы на мышах [42], но по различным причинам не нашли широкого применения. Масштабные усилия в области визуализации белков млекопитающих с использованием микроскопии нашли свое отражение в продолжающемся по сей день проекте lifeDB (<http://www.lifedb.de>) [43] и в уже завершенном проекте MitoCarta (<http://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta>) [30]. К настоящему времени визуализированы 321 и 166 митохондриальных белков человека и мыши соответственно [44]. Несмотря на то что микроскопия наилучшим образом позволяет исследовать локализацию белков, ее применение ограничено множеством факторов, начиная от времязатратности всего процесса и заканчивая технологическими трудностями в идентификации истинных эпитопов (при применении антител в качестве меток).

Дополнительные данные о митохондриальной локализации белков могут быть получены методами вычислительной и экспериментальной геномики. Экстраполяция гомологии последовательностей с модельного организма на человека представляет чрезвычайно полезный метод для прогноза или же подтверждения локализации того или иного белка. Отлично зарекомендовал себя метод, при котором производится сравнение последовательностей потенциальных митохондриальных белков человека с митохондриальными белками других видов, локализация которых установ-

лена однозначно [30]. Также для локализации белков были успешно применены методы экспериментальной генетики: дрожжи с редуцированным геномом выращивали на неферментативном субстрате, в результате чего наблюдали изменение белковых профилей, в том числе и в митохондриях [45–47]. Приводятся и другие методы, основанные на изменениях функционирования геномов. Так, оценка профилей мРНК при индукции или ингибировании митохондриального биогенеза позволяет дать прогноз по изменению белкового профиля, а также по присутствию *cis*-регуляторных, специфичных для генов митохондриальной системы мотивов в промоторах [48–50]. Несмотря на то что индивидуальные подходы позволяют достигнуть определенных результатов в попытках локализации белков митохондрий, все же наиболее адекватным можно считать применение ансамблей методов.

### Свойства митохондриального протеома

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

Наиболее полный перечень (MitoCarta) содержит около 1 100 генных локусов, кодирующих митохондриальные белки [30]. По некоторым оценкам, основанным на байесовской модели вероятностей, сегодняшние данные представляют лишь 85% аннотаций с учетом априорной вероятности того, что в среднем 7% всех генов млекопитающих митохондриальные. С учетом априорной вероятности в диапазоне от 5 до 12% байесовская модель предсказывает, что 1 050–1 400 генов кодируют митохондриальные белки. Конечно же, каждый ген с учетом сплайсинга может кодировать несколько белков, которые, в свою очередь, могут подвергаться посттрансляционной модификации. Это в итоге приведет к тому, что конечный репертуар белков будет более чем на порядок превышать количество генов, которые их кодируют. Одним из уникальных свойств митохондриального протеома является большой разброс в количествах его компонентов. Так, ранее было сделано наблюдение о расхождении концентраций белков митохондриального протеома на пять или шесть порядков [35, 51]. По результатам анализов 2D-гелей были определены два белка внешней и внутренней мембраны, представленные в

наибольших количествах: VDAC и ANT соответственно. Недавно проведенный МС/МС-анализ подтвердил высокую концентрацию этих белков. На основании грубой оценки количества митохондриальных белков в 14 тканях мышей выделено пять наиболее распространенных: ATP5A1, ATP5B, ACO2, ANT1, ANT2, VDAC1 [52].

Давно известно, что белки могут выполнять аналогичные функции в различных компартментах клетки, обладающих различными регуляторными свойствами. Эта кажущаяся избыточность позволяет относительно небольшому числу структурных генов (20 000–30 000) тонко регулировать все клеточные процессы как в пространстве, так и во времени. Белки с различной локализацией могут продуцироваться и дупликациями гена (например, HMGCS1 и HMGCS2). Однако к белкам двойной локализации принято относить те, которые кодировались одним генным локусом, но имеют различную локализацию. Двойная локализация может быть достигнута несколькими путями: альтернативным сплайсингом, различными иницирующими кодонами, в результате чего с одного гена получаются два и более белковых продукта, один из которых может содержать митохондриальную таргет-последовательность (например, ISCU [53] и LRPPRC [72]). Белки могут менять свою локализацию под действием экзогенных стимулов (например, проапоптотический белок BID транслоцируется из цитозоля в митохондрии при действии апоптотического стимула) [54]. Крупномасштабные исследования локализации компонентов клеточного протеома мышей, проведенные L.J. Foster с коллегами, продемонстрировали двойную локализацию для 39% всех белков и 16% митохондриальных белков [39]. В дрожжах A. Kumar и соавт., проанализировав 2 744 белка, продемонстрировали двойную локализацию для 11% всех белков и 15% митохондриальных белков [41]. Эти исследования позволяют предположить, что в совокупности около 15% митохондриальных белков имеют двойную локализацию.

Функции митохондрий не лимитированы электрон-транспортной цепью и циклом трикарбоновых кислот. Митохондрии осуществляют и ряд других важнейших физиологических функций, среди которых биосинтез гема, окисление жирных кислот и аминокислот, синтез пиримидина, гомеостаз кальция и апоптоз. Из приблизительно 1 100 предположительно митохондриальных белков функция более 300 неизвестна, для других 300 известна лишь доменная структура, информация о которой получена при анализе гомологий последовательностей аминокислот [30]. Часть этих белков может принимать участие в уже

описанных биохимических каскадах, а может входить в еще не открытые метаболические пути. Основываясь на анализе коэкспрессии белков, инвентаризированных в MitoCarta, R. Nilsson и соавт. смогли идентифицировать новые митохондриальные транспортеры и шапероны, вовлеченные в биосинтез гема [55]. М.А. Нуумен и соавт., используя несколько иной подход, основанный на анализе функциональных цепей, продемонстрировали связь некоторых белков с рядом митохондриальных функций, часть из которых считалась полностью изученной [56, 57]. Было показано, что митохондрии содержат все необходимые белковые компоненты для синтеза жирных кислот второго типа [58], которые, в свою очередь, могут опосредовать биосинтез липоевой кислоты, а также синтез жирных кислот, инкорпорированных в митохондриальные липиды. Другие крупномасштабные протеомные исследования показали наличие в митохондриях большого количества белков, участвующих в обратимом фосфорилировании и ацетилировании [42], что свидетельствует о развитой сигнальной сети в митохондриальном матриксе.

### Тканеспецифичность митохондрий

Уже не первое десятилетие проводятся исследования биохимического статуса и ультраструктуры митохондрий. Сегодня очевидно, что митохондрии сильно различаются в зависимости от типа клеток, в котором они локализованы. Протеомные исследования внесли свой вклад в понимание молекулярных аспектов тканевой специфичности митохондрий. Сердце, например, содержит приблизительно в 2,5 раза больше митохондрий, чем мозг. Однако различия в митохондриях этих тканей не ограничиваются их количеством, а носят еще и весомый качественный характер. Первые упоминания об исследованиях качественных межтканевых различий протеома митохондрий приводит V.K. Mootha и соавт. Показано, что митохондриальные белковые профили различных тканей идентичны примерно на 75% [49, 59]. Эти данные были несколько скорректированы более обширными исследованиями. Из 1 100 белков, аннотированных в MitoCarta, общими для митохондрий всех тканей являются 50%, в то время как другие 50% – тканеспецифичные. Эти же исследования показали, что митохондрии развивающихся тканей обладают более обширным белковым профилем, чем митохондрии дифференцированных тканей [30]. Исследование митохондриального протеома различных тканей приводит к довольно интересным результатам. Так, анализ белкового профиля бурого жира подтвердил ранее сделанные предположе-

ния о том, что адипоциты происходят от мышечных клеток [60].

В ряде случаев исследование протеомного профиля приводит и к неожиданным результатам. Ожидалось, что субъединицы всех четырех комплексов дыхательной цепи присутствуют в большом количестве во всех типах тканей и клеток. Однако, к примеру, комплекс IV в некоторых тканях несет дополнительные субъединицы. Кроме того, количественное соотношение субъединиц четырех комплексов дыхательной цепи различаются в зависимости от ткани, в которой они локализованы [61]. В этой связи обращают на себя внимание рибосомы, которые, возможно, обеспечивают избирательный синтез полипептидов в зависимости от типа тканей. В недавних работах R.S. Balaban и соавт. не только охарактеризовали митохондриальный протеом крыс [37], но и связали его с картами биохимических путей и моделями биосинтетических возможностей различных органов [62]. В.О. Palsson и соавт., используя данные о митохондриальных протеомах, построили модель метаболизма митохондрий сердечной мышцы [63, 64].

### Эволюционные аспекты митохондриальных белков

Факты свидетельствуют о том, что современные митохондрии представляют собой потомков ранних эндосимбионтов, на роль которых, по разным данным, претендуют альфа-протеобактерии [14]. С тех времен эндосимбионты либо потеряли, либо перенесли часть своего генетического материала в ядро клетки-хозяина. Более того, белки клетки-хозяина приобрели таргетные сигналы для импорта в органеллы. Различные данные указывают на то, что лишь около 15–20% белков современных митохондрий берут свое начало у митохондриального предка, т.е. были закодированы в ДНК альфа-протеобактерий [65]. Митохондриальные белки млекопитающих представляются наиболее эволюционно консервативными, чем белки других клеточных компонентов. Почти 75% белков митохондрий млекопитающих, очевидно, бактериального происхождения. Другие же компоненты клеток представлены белками бактериального происхождения лишь на 48%. Несмотря на древнее происхождение большинства митохондриальных компонентов, 9% из них имеют гомологи только у многоклеточных животных. Некоторые митохондриальные белки эволюционировали уже в позвоночных линиях, в частности несколько проапоптотических факторов.

### Болезни человека, ассоциированные с митохондриями

Данные о митохондриальном протеоме позволили систематизировать подходы к пониманию митохондриальных патологий. Заболевания дыхательной цепи (ЗДЦ) представлены подмножеством митохондриальных нарушений и характеризуются как биохимические нарушения окислительного фосфорилирования. Частота встречаемости ЗДЦ – 1 на 5 тыс. новорожденных, и в совокупности из всех болезней обмена веществ они наиболее распространены [66]. Митохондриальная дыхательная цепь состоит из пяти высокомолекулярных комплексов, субъединицы которых транскрибируются с 13 митохондриальных генов и приблизительно 77 ядерных генов [11]. Дефекты в дыхательной цепи приводят к широкому кругу заболеваний, начиная от летальности новорожденных и заканчивая различными нейродегенеративными заболеваниями преклонного возраста. Клиническая картина заболеваний, вызванных дефектами дыхательной цепи, может быть различна, однако неизменным для всех остается вовлеченность в патогенез большинства органов и систем организма. Так, наиболее частыми клиническими признаками большинства подобных заболеваний являются миопатии скелетных мышц, кардиомиопатии, припадки, инсульты, атаксия, периферическая невропатия, слепота, глухота, нарушения моторики, печеночная и почечная недостаточность, дисфункция костного мозга, а также эндокринная и экзокринная дисфункции [67–69]. С точки зрения типов наследования данные заболевания являются гетерогенными и могут наследоваться аутосомно-доминантно, аутосомно-рецессивно, сцепленно с X-хромосомой и по материнской линии. Отмечены также спорадические случаи манифестации. Расчеты показывают, что 15–20% ЗДЦ вызваны мутациями в мтДНК, остальные, по видимому, являются причиной полиморфизма ядерных генов [12, 70]. Из-за сильной генетической гетерогенности и плейотропности генетических локусов, связанных с патогенезом, дифференциальная диагностика заболеваний ЗДЦ крайне осложнена [71–73].

Количество данных о ядерных генах, вовлеченных в ЗДЦ, в последнее время значительно возросло благодаря работам в области геномики и протеомики митохондрий. Типичными подходами в аннотировании функций генов, лежащих в основе патогенеза ЗДЦ, являются кандидатный анализ, анализ сцепления и картирование гомозигот. Однако методы, основанные на картировании, как правило, позволяют анализировать лишь достаточно протяженные участки хромосом и не дают информации о причинной мутации. Поскольку гены, кодирующие компоненты дыхательной цепи, являются кандидатными, информация об их структуре, основанная на данных митохондриального

протеома, позволяет сильно сузить поиск полиморфизмов – этиологических факторов патогенеза. Первые результаты, основанные на крупномасштабных геномных и протеомных исследованиях, позволили картировать полиморфизмы в локусе LRPPRC, которые лежат в основе патогенеза франко-канадского варианта синдрома Лея [76]. Аналогичный подход впоследствии был использован для выявления генов *ETHE1* как этиологических факторов этилмалоновой энцефалопатии [74]. Постоянно увеличивающийся список генов, вовлеченных в функцию дыхательной цепи [75], позволяет глубже понять молекулярную природу патогенеза ЗДЦ. На сегодняшний день выявлено 92 белоккодирующих гена, мутации в которых приводят к ЗДЦ. Кирби с коллегами систематизировали указанные гены и обозначили пять основных путей молекулярной этиологии ЗДЦ. Во-первых, в основе ЗДЦ могут лежать изменения любого из 13 белоккодирующих генов мтДНК, а также изменения в генах тРНК и рРНК [77]. Во-вторых, повреждения ядерных генов, кодирующих субъединицы любого из пяти комплексов дыхательной цепи, могут являться причиной ЗДЦ. В-третьих, мутации в генах, кодирующих факторы импорта митохондриальных белков и факторы «сборки» дыхательной цепи. В-четвертых, факторы, обеспечивающие динамику мембран митохондрий. И, наконец, белки, которые обеспечивают биогенез мтДНК, также могут являться причиной ЗДЦ. Ряд генов невозможно отнести к той или иной классификации вследствие неопределенности их функции (например, *MPV17* и *FASTKD2*) или же по причине неполного понимания патогенеза заболевания.

Традиционно митохондриальные патологии связывают с нарушением в функционировании дыхательной цепи и синтеза аденозинтрифосфата. Однако в последнее время стало появляться все больше данных о наличии дополнительных фенотипов митохондрий, связанных, к примеру, с опухолями мягких тканей и сахарным диабетом [66, 78]. Работы в этом направлении интенсифицируются, и это дает свои результаты. Недавно были обнаружены мутации в генах митохондриальных белков *PYCR1*, которые лежат в основе преждевременного старения и генерализованного эластозиса (неизлечимое заболевание кожи) [79], а также в генах белков *DHODH*, которые опосредуют такую тяжелую патологию, как синдром Миллера, характеризующийся микрогнатией, заячьей губой и гипоплазией конечностей [80]. В сумме с белками митохондриальной локализации сегодня связывают более 150 различных заболеваний. Таким образом, применяя различные подходы прослеживания всех изменений от фенотипа к генотипу, можно достаточно точно анно-

тирывать изменения в основном метаболизме, происходящие при патогенезе различных заболеваний. С. Scharfe с коллегами провели крупномасштабное обзорное исследование, в котором различные клинические фенотипы направленно ассоциировались с изменениями в генах, кодирующих белки митохондриальной локализации. На основе их исследований создана база данных, в которую сегодня входят 502 клинических фенотипа, ассоциированные со 174 дефектами белков митохондриальной локализации (<http://www.mitophenome.org>) [81]. Эта база является пока неполной (отсутствует примерно половина известных белков, вовлеченных в ЗДЦ), а также в нее включены белки, которые основной массой не локализируются в митохондриальном матриксе (например, р53 и WFS1) [82–84]. Несмотря на это, данные, приведенные в базе, могут быть использованы для начальной привязки клинического фенотипа к биохимическим путям и генам. Ресурс позволяет провести количественное отождествление различных симптомокомплексов. Например, используя базу, легко рассчитать, что неврологические симптомы встречаются в 89% случаев при мутациях в генах, ассоциированных с митохондриями, в то время как комбинированный симптомокомплекс, затрагивающий нервную, сердечно-сосудистую системы, желудочно-кишечный тракт и метаболические пути, встречается в 57% случаев. Ресурс также позволяет строить биологические связи между генами и специфическим фенотипом и многое другое. Несмотря на то что указанный ресурс и подобные ему находятся в самом начале развития, уже сегодня возникло обоснованное понимание того, что системные знания в области протеомики и геномики митохондрий позволят более точно диагностировать и осуществлять направленную терапию многих заболеваний человека.

В заключение суммируем приведенные факты в нескольких основных пунктах:

– митохондриальный протеом человека представлен 1 100–1 400 различными белками, только 13 из которых кодируются митохондриальной ДНК;

– на сегодняшний день идентифицированы примерно 1 100 белков митохондриального протеома. Для их идентификации применялись методы высокопроизводительной протеомики, геномики, микроскопии и компьютерного анализа;

– около 15% митохондриальных белков имеют двойную локализацию;

– ансамбли митохондриальных белков тканеспецифичны. Приблизительно 50% митохондриальных белков являются общими для всех тканей, оставшиеся – специфичны для определенного типа;

– митохондриальные рибосомы демонстрируют удивительную тканевую специфичность;

– 75% митохондриального протеома имеют гомологию с бактериальным протеомом, в то время как для клетки в целом процент гомологии не превышает 48;

– благодаря геномике и протеомике перечень митохондриальных заболеваний постоянно растет.

#### Литература

1. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // *Nature*. 1981. 290. P. 457–465.
2. Montoya J., Ojala D., Attardi G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs // *Nature*. 1981. 290. P. 465–470.
3. Ojala D., Montoya J., Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria // *Nature*. 1981. 290. P. 470–474.
4. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies // *Nature*. 1988. 331. P. 717–719.
5. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy // *Science*. 1988. 242. P. 1427–1430.
6. Wallace D.C., Zheng X.X., Lott M.T. et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease // *Cell*. 1988. 55. P. 601–610.
7. Ruiz-Pesini E., Lott M.T., Procaccio V. et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny // *Nucleic Acids Res.* 2007. 35. D823–28.
8. McFarland R., Elson J.L., Taylor R.W., Howell N., Turnbull D.M. Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when "definitely maybe" is not good enough // *Trends Genet.* 2004. 20. P. 591–596.
9. Mitchell A.L., Elson J.L., Howell N., Taylor R.W., Turnbull D.M. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: Mutation or polymorphism? // *J. Med. Genet.* 2006. 43. P. 175–179.
10. Montoya J., Lopez-Gallardo E., Diez-Sanchez C., Lopez-Perez M.J., Ruiz-Pesini E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. 1787. 476–483.
11. DiMauro S., Schon E.A. Mitochondrial respiratory-chain diseases // *N. Engl. J. Med.* 2003. 348. P. 2656–2668.
12. DiMauro S., Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease // *Ann. Med.* 2005. 37. P. 222–232.
13. Lopez M.F., Kristal B.S., Chernokalskaya E. et al. High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation // *Electrophoresis*. 2000. 21. P. 3427–3440.
14. Andersson S.G., Zomorodipour A., Andersson J.O. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria // *Nature*. 1998. 396. P. 133–140.
15. Clamp M., Fry B., Kamal M. et al. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. 104. P. 19428–19433.
16. Chacinska A., Koehler C.M., Milenkovic D., Lithgow T., Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms // *Cell*. 2009. 138. P. 628–644.
17. Wiedemann N., Pfanner N., Ryan M.T. The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria // *EMBO J.* 2001. 20.

- P. 951–960.
18. *Banci L., Bertini I., Cefaro C. et al.* MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. 16. P. 198–206.
  19. *Milenkovic D., Ramming T., Muller J.M. et al.* Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria // *Mol. Biol. Cell.* 2009. 20. P. 2530–2539.
  20. *Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G.* Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence // *J. Mol. Biol.* 2000. 300. P. 1005–1016.
  21. *Guda C.* pTARGET: a web server for predicting protein subcellular localization // *Nucleic Acids Res.* 2006. 34. W210–13.
  22. *Nakai K., Horton P.* PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization // *Trends Biochem. Sci.* 1999. 24. P. 34–36.
  23. *Banmai H., Tamada Y., Mariyama O., Nakai K., Miyano S.* Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals // *Bioinformatics.* 2002. 18. P. 298–305.
  24. *Small I., Peeters N., Legeai F., Lurin C.* Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences // *Proteomics.* 2004. 4. P. 1581–1590.
  25. *King B.R., Guda C.* ngLOC: an n-gram-based Bayesian method for estimating the subcellular proteomes of eukaryotes // *Genome Biol.* 2007. 8.R68.
  26. *Kumar M., Verma R., Raghava G.P.* Prediction of mitochondrial proteins using support vector machine and hidden Markov model // *J. Biol. Chem.* 2006. 281. P. 5357–5363.
  27. *Guda C., Fahy E., Subramaniam S.* MITOPRED: a genome-scale method for prediction of nucleus-encoded mitochondrial proteins // *Bioinformatics.* 2004. 20. P. 1785–1794.
  28. *Claros M.G., Vincens P.* Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences // *Eur. J. Biochem.* 1996. 241. P. 779–786.
  29. *Gaston D., Tsaousis A.D., Roger A.J.* Predicting proteomes of mitochondria and related organelles from genomic and expressed sequence tag data // *Methods Enzymol.* 2009. 457. P. 21–47.
  30. *Palmfeldt J., Vang S., Stenbroen V. et al.* Mitochondrial proteomics on human fibroblasts for identification of metabolic imbalance and cellular stress // *Proteome Sci.* 2009. 7. P. 20.
  31. *Rabilloud T., Kieffer S., Procaccio V. et al.* Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome // *Electrophoresis.* 1998. 19. P. 1006–1014.
  32. *Scheffler N.K., Miller S.W., Carroll A.K. et al.* Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric identification of mitochondrial proteins from an SH-SY5Y neuroblastoma cell line // *Mitochondrion.* 2001. 1. P. 161–179.
  33. *Taylor S.W., Fahy E., Zhang B. et al.* Characterization of the human heart mitochondrial proteome // *Nat. Biotechnol.* 2003. 21. P. 281–286.
  34. *Mootha V.K., Bunkenborg J., Olsen J.V. et al.* Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria // *Cell.* 2003. 115. P. 629–640.
  35. *Kislinger T., Cox B., Kannan A. et al.* Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcriptomic profiling // *Cell.* 2006. 125. P. 173–186.
  36. *Adachi J., Kumar C., Zhang Y., Mann M.* In-depth analysis of the adipocyte proteome by mass spectrometry and bioinformatics // *Mol. Cell Proteomics.* 2007. 6. P. 1257–1273.
  37. *Johnson D.T., Harris R.A., French S. et al.* Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. 292. C689–697.
  38. *Forner F., Foster L.J., Campanaro S., Valle G., Mann M.* Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver // *Mol. Cell Proteomics.* 2006. 5. P. 608–619.
  39. *Foster L.J., de Hoog C.L., Zhang Y. et al.* A mammalian organelle map by protein correlation profiling // *Cell.* 2006. 125. P. 187–199.
  40. *Huh W.K., Falvo J.V., Gerke L.C. et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast // *Nature.* 2003. 425. P. 686–691.
  41. *Kumar A., Agarwal S., Heyman J.A. et al.* Subcellular localization of the yeast proteome // *Genes Dev.* 2002. 16. P. 707–719.
  42. *Ozawa T., Sako Y., Sato M., Kitamura T., Umezawa Y.* A genetic approach to identifying mitochondrial proteins // *Nat. Biotechnol.* 2003. 21. P. 287–293.
  43. *Mehrle A., Rosenfelder H., Schupp I. et al.* The LIFEdb database in 2006 // *Nucleic Acids Res.* 2006. 34. D415–18.
  44. *Smith A.C., Robinson A.J.* MitoMiner, an integrated database for the storage and analysis of mitochondrial proteomics data // *Mol. Cell Proteomics.* 2009. 8. P. 1324–1337.
  45. *DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O.* Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale // *Science.* 1997. 278. P. 680–686.
  46. *Dimmer K.S., Fritz S., Fuchs F. et al.* Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Biol. Cell.* 2002. 13. P. 847–853.
  47. *Steinmetz L.M., Scharfe C., Deutschbauer A.M. et al.* Systematic screen for human disease genes in yeast // *Nat. Genet.* 2002. 31. P. 400–404.
  48. *Calvo S., Jain M., Xie X. et al.* Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics // *Nat. Genet.* 2006. 38. P. 576–582.
  49. *Mootha V.K., Handschin C., Arlow D. et al.* Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. 101. P. 6570–6575.
  50. *Mootha V.K., Lindgren C.M., Eriksson K.F. et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes // *Nat. Genet.* 2003. 34. P. 267–273.
  51. *Foster L.J., de Hoog C.L., Zhang Y. et al.* A mammalian organelle map by protein correlation profiling // *Cell.* 2006. 125. P. 187–199.
  52. *Vieira H.L., Haouzi D., El Hamel C. et al.* Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator // *Cell Death Differ.* 2000. 7. P. 1146–1154.
  53. *Tong W.H., Rouault T.* Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of human



- cells // EMBO J. 2000. 19. P. 5692–5700.
54. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors // Cell. 1998. 94. P. 481–490.
  55. Nilsson R., Schultz I.J., Pierce E.L. et al. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis // Cell Metab. 2009. 10. P. 119–130.
  56. Huynen M.A., de Hollander M., Szklarczyk R. Mitochondrial proteome evolution and genetic disease // Biochim. Biophys. Acta. 2009. 1792. P. 1122–1129.
  57. Perocchi F., Jensen L.J., Gagneur J. et al. Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle // PLoS Genet. 2006. 2:e170.
  58. Hiltunen J.K., Schonauer M.S., Autio K.J., Mittelmeier T.M., Kastaniotis A.J., Dieckmann C.L. Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids // J. Biol. Chem. 2009. 284. P. 9011–9015.
  59. Patrushev M., Kasymov V., Patrusheva V., Ushakova T., Gogvadze V., Gaziev A. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments // Cell Mol. Life Sci. 2004. 61 (24). P. 3100–3103.
  60. Forner F., Kumar C., Lubner C.A., Fromme T., Klingenspor M., Mann M. Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions // Cell Metab. 2009. 10. 324–
  61. Capaldi R.A., Halphen D.G., Zhang Y.Z., Yanamura W. Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain // J. Bioenerg. Biomembr. 1988. 20. P. 291–311.
  62. Johnson D.T., Harris R.A., Blair P.V., Balaban R.S. Functional consequences of mitochondrial proteome heterogeneity // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007. 292. C698–707.
  63. Thiele I., Price N.D., Vo T.D., Palsson B.O. Candidate metabolic network states in human mitochondria. Impact of diabetes, ischemia, and diet // J. Biol. Chem. 2005. 280. P. 11683–11695.
  64. Vo T.D., Greenberg H.J., Palsson B.O. Reconstruction and functional characterization of the human mitochondrial metabolic network based on proteomic and biochemical data // J. Biol. Chem. 2004. 279. P. 39532–39540.
  65. Gabaldon T., Huynen M.A. From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism // PLoS Comput. Biol. 2007. 3:e219.
  66. DiMauro S., Hirano M., Schon E.A. Mitochondrial Medicine. New York: Informa Healthcare, 2006. 348 p.
  67. Evdokimovskii EV, Patrushev MV, Ushakova TE, Gaziev AI. Sharp changes in the copy number of mtDNA and its transcription in the blood cells of X-ray irradiated mice are observed, and mtDNA fragments appear in the blood serum // Radiats. Biol. Radioecol. 2007. 47 (4). P. 402–407.
  68. Patrushev M.V., Patrusheva V.E., Kasymov V.A., Evdokimovsky E.V., Ushakova T.E., Gaziev A.I. Release of mtDNA from mitochondria and activation of its replication in tissues of irradiated mice // Tsitologiya. 2006. 48 (8). P. 684–690.
  69. Patrushev M., Kasymov V., Patrusheva V., Ushakova T., Gogvadze V., Gaziev A.I. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice // Mitochondrion. 2006. 6 (1). P. 57–62.
  70. Chinnery P.F. Searching for nuclear-mitochondrial genes // Trends Genet. 2003. 19. P. 60–62.
  71. Bernier F.P., Boneh A., Dennett X., Chow C.W., Cleary M.A., Thorburn D.R. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children // Neurology. 2002. 59. P. 1406–1411.
  72. Morava E., van den Heuvel L., Hol F. et al. Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children // Neurology 2006. 67. P. 1823–1826.
  73. Walker U.A., Collins S., Byrne E. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification // Eur. Neurol. 1996. 36. P. 260–267.
  74. Tiranti V., D'Adamo P., Briem E. et al. Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein // Am. J. Hum. Genet. 2004. 74. P. 239–252.
  75. Zhu X., Peng X., Guan M.X., Yan Q. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2009. 41. P. 179–187.
  76. Mootha V.K., Lepage P., Miller K. et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. 100. P. 605–610.
  77. Uusimaa J., Finnila S., Remes A.M. et al. Molecular epidemiology of childhood mitochondrial ncephalomyopathies in a Finnish population: sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNAArg, tRNA<sup>Glu</sup>, and tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) genes // Pediatrics. 2004. 114. P. 443–450.
  78. Patrushev M.V., Patrusheva V.E. Role of transcription factors in mtDNA biogenesis mediated by thyroid hormones // Biochemistry (Mosc). 2011. 76 (2). 260–267.
  79. Reversade B., Escande-Beillard N., Dimopoulou A. et al. Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features // Nat. Genet. 2009. 41. 1016–1021.
  80. Ng S.B. et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder // Nat. Genet. 2009. 42. P. 30–35.
  81. Scharfe C., Lu H.H., Neuenburg J.K. et al. Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes // PLoS Comput. Biol. 2009. 5:e1000374.
  82. Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling // J. Biol. Chem. 2000. 275. P. 16202–16212.
  83. Mihara M., Erster S., Zaika A. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria // Mol. Cell. 2003. 11. P. 577–590.
  84. Fonseca S.G., Fukuma M., Lipson K.L. et al. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells // J. Biol. Chem. 2005. 280. P. 39609–39615.

Поступила в редакцию 22.01.2013 г.

Утверждена к печати 10.04.2013 г.

- Костерина Е.А.** – мл. науч. сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Козенков И.И.** – мл. науч. сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Касымов В.А.** – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Каменский П.А.** – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Доминова И.Н.** – мл. науч. сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Королёва Ю.А.** – мл. науч. сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Патрушева В.Е.** – науч. сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Богачев Р.С.** – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой терапии БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Литвинова Л.С.** – д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Бабак С.В.** – канд. мед. наук, зав. лабораторией клинической фармакологии БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Моисеева Е.М.** – студентка медицинского факультета БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Богданов Е.А.** – аспирант лаборатории геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Мухортова О.А.** – студентка медицинского факультета БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Вавилина Я.С.** – студентка медицинского факультета БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Михальченкова Т.А.** – студентка медицинского факультета БФУ им. И. Канта (г. Калининград).  
**Патрушев Максим Владимирович** (✉) – канд. биол. наук, зав. лабораторией геномных и протеомных исследований БФУ им. И. Канта (г. Калининград).

✉ Патрушев Максим Владимирович, тел.: 8 (4012) 59-55-95, доб. 6630, e-mail: mpatrushev@innopark.kantiana.ru

## MITOCHONDRIAL PROTEIN PROFILE AND ITS ROLE IN PATHOLOGIC PROCESSES

**Kosterina Ye.A., Kozenkov I.I., Kasymov V.A., Kamensky P.A., Dominova I.N., Korolyova Yu.A., Patrusheva V.Ye., Bogachev R.S., Litvinova L.S., Babak S.V., Moiseeva Ye.M., Bogdanov Ye.A., Mukhortova O.A., Vavilina Ya.S., Mikhalchenkova T.A., Patrushev M.V.**

*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

### ABSTRACT

Mitochondria import hundreds of different precursor proteins from the cytosol, and only 13 proteins are encoded by mtDNA itself. Recent investigations demonstrated real size of mitochondrial proteome and complexity of their functions. There are many methods using for mitochondrial proteome profiling, that help to understand a molecular mechanisms of mitochondrial functions and identify the causes of disruptions that lead to different disorders. In this review we discuss a recent data in the field of mitochondrial proteomics.

**KEY WORDS:** mitochondrial proteome, protein import, respiratory chain proteins, mitochondrial DNA, respiratory chain disorders.

*Bulletin of Siberian Medicine, 2013, vol. 12, no. 3, pp. 5–17*

### References

1. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290, pp. 457–465.
2. Montoya J., Ojala D., Attardi G. Distinctive features of the 5t-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, 1981, 290, pp. 465–470.
3. Ojala D., Montoya J., Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 1981, 290, pp. 470–474.
4. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of

- muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 1988, 331, pp. 717–719.
5. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 1988, 242, pp. 1427–1430.
  6. Wallace D.C., Zheng X.X., Lott M.T., Shoffner J.M., Hodge J.A. et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*, 1988, 55, pp. 601–610.
  7. Ruiz-Pesini E., Lott M.T., Procaccio V., Poole J.C., Brandon M.C. et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35, D823–28.
  8. McFarland R., Elson J.L., Taylor R.W., Howell N., Turnbull D.M. Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when “definitely maybe” is not good enough. *Trends Genet.*, 2004, 20, pp. 591–596.
  9. Mitchell A.L., Elson J.L., Howell N., Taylor R.W., Turnbull D.M. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: Mutation or polymorphism? *J. Med. Genet.*, 2006, 43, pp. 175–179.
  10. Montoya J., Lopez-Gallardo E., Diez-Sanchez C., Lopez-Perez M.J., Ruiz-Pesini E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1787, pp. 476–483.
  11. DiMauro S., Schon E.A. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, pp. 2656–2668.
  12. DiMauro S., Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann. Med.*, 2005, 37, pp. 222–232.
  13. Lopez M.F., Kristal B.S., Chernokalskaya E., Lazarev A., Shestopalov A.I. et al. High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis*, 2000, 21, pp. 3427–3440.
  14. Andersson S.G., Zomorodipour A., Andersson J.O., Sicheritz-Ponten T., Alsmark U.C. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 1998, 396, pp. 133–140.
  15. Clamp M., Fry B., Kamal M., Xie X., Cuff J. et al. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, pp. 19428–19433.
  16. Chacinska A., Koehler C.M., Milenkovic D., Lithgow T., Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, 2009, 138, pp. 628–644.
  17. Wiedemann N., Pfanner N., Ryan M.T. The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.*, 2001, 20, pp. 951–960.
  18. Banci L., Bertini I., Cefaro C., Ciofi-Baffoni S., Gallo A. et al. MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009, 16, pp. 198–206.
  19. Milenkovic D., Ramming T., Muller J.M., Wenz L.S., Geibert N. et al. Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol. Biol. Cell*, 2009, 20, pp. 2530–2539.
  20. Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 2000, 300, pp. 1005–1016.
  21. Guda C. pTARGET: a web server for predicting protein subcellular localization. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, W210–13.
  22. Nakai K., Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, 24, pp. 34–36.
  23. Bannai H., Tamada Y., Maruyama O., Nakai K., Miyano S. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, 2002, 18, pp. 298–305.
  24. Small I., Peeters N., Legeai F., Lurin C. Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 2004, 4, pp. 1581–1590.
  25. King B.R., Guda C. ngLOC: an n-gram-based Bayesian method for estimating the subcellular proteomes of eukaryotes. *Genome Biol.*, 2007, 8, R68.
  26. Kumar M., Verma R., Raghava G.P. Prediction of mitochondrial proteins using support vector machine and hidden Markov model. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, pp. 5357–5363.
  27. Guda C., Fahy E., Subramaniam S. MITOPRED: a genome-scale method for prediction of nucleus-encoded mitochondrial proteins. *Bioinformatics*, 2004, 20, pp. 1785–1794.
  28. Claros M.G., Vincens P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.*, 1996, 241, pp. 779–786.
  29. Gaston D., Tsaousis A.D., Roger A.J. Predicting proteomes of mitochondria and related organelles from genomic and expressed sequence tag data. *Methods Enzymol.*, 2009, 457, pp. 21–47.
  30. Palmfeldt J., Vang S., Stenbroen V., Pedersen C.B., Christensen J.H. et al. Mitochondrial proteomics on human fibroblasts for identification of metabolic imbalance and cellular stress. *Proteome Sci.*, 2009, 7, pp. 20.
  31. Rabilloud T., Kieffer S., Procaccio V., Louwagie M., Courchesne P.L. et al. Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. *Electrophoresis*, 1998, 19, pp. 1006–1014.
  32. Scheffler N.K., Miller S.W., Carroll A.K., Anderson C., Davis R.E. et al. Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric identification of mitochondrial proteins from an SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Mitochondrion*, 2001, 1, pp. 161–179.
  33. Taylor S.W., Fahy E., Zhang B., Glenn G.M., Warnock D.E. et al. Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, pp. 281–286.
  34. Mootha V.K., Bunkenborg J., Olsen J.V., Hjerrild M., Wisniewski J.R. et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, 2003, 115, 629–640.
  35. Kislinger T., Cox B., Kannan A., Chung C., Hu P. et al. Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcriptomic profiling. *Cell*, 2006, 125, pp. 173–186.
  36. Adachi J., Kumar C., Zhang Y., Mann M. In-depth analysis of the adipocyte proteome by mass spectrometry and bioinformatics. *Mol. Cell Proteomics*, 2007, 6, pp. 1257–1273.
  37. Johnson D.T., Harris R.A., French S., Blair P.V., You J. et al. Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2007, 292, C689–697.
  38. Forner F., Foster L.J., Campanaro S., Valle G., Mann M. Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from

- muscle, heart, and liver. *Mol. Cell Proteomics*, 2006, 5, pp. 608–619.
39. Foster L.J., de Hoog C.L., Zhang Y., Zhang Y., Xie X. et al. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell*, 2006, 125, pp. 187–199.
40. Huh W.K., Falvo J.V., Gerke L.C., Carroll A.S., Howson R.W. et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 2003, 425, pp. 686–691.
41. Kumar A., Agarwal S., Heyman J.A., Matson S., Heidtman M. et al. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.*, 2002, 16, pp. 707–719.
42. Ozawa T., Sako Y., Sato M., Kitamura T., Umezawa Y. A genetic approach to identifying mitochondrial proteins. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, pp. 287–293.
43. Mehrle A., Rosenfelder H., Schupp I., del Val C., Arlt D. et al. The LIFEdb database in 2006. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, D415–18.
44. Smith A.C., Robinson A.J. MitoMiner, an integrated database for the storage and analysis of mitochondrial proteomics data. *Mol. Cell Proteomics*, 2009, 8, pp. 1324–1337.
45. DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997, 278, pp. 680–686.
46. Dimmer K.S., Fritz S., Fuchs F., Messerschmitt M., Weinbach N. et al. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 2002, 13, pp. 847–853.
47. Steinmetz L.M., Scharfe C., Deutschbauer A.M., Mokranjac D., Herman Z.S. et al. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet.*, 2002, 31, pp. 400–404.
48. Calvo S., Jain M., Xie X., Sheth S.A., Chang B. et al. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat. Genet.*, 2006, 38, pp. 576–582.
49. Mootha V.K., Handschin C., Arlow D., Xie X., St Pierre J. et al. Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, pp. 6570–6575.
50. Mootha V.K., Lindgren C.M., Eriksson K.F., Subramanian A., Sihag S. et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.*, 2003, 34, pp. 267–273.
51. Foster L.J., de Hoog C.L., Zhang Y., Zhang Y., Xie X. et al. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell*, 2006, 125, pp. 187–199.
52. Vieira H.L., Haouzi D., El Hamel C., Jacotot E., Belzacq A.S. et al. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ.*, 2000, 7, pp. 1146–1154.
53. Tong W.H., Rouault T. Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of human cells. *EMBO J.*, 2000, 19, pp. 5692–5700.
54. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, 94, pp. 481–490.
55. Nilsson R., Schultz I.J., Pierce E.L., Soltis K.A., Naranuntarat A. et al. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab.*, 2009, 10, pp. 119–130.
56. Huynen M.A., de Hollander M., Szklarczyk R. Mitochondrial proteome evolution and genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, 1792, pp. 1122–1129.
57. Perocchi F., Jensen L.J., Gagneur J., Ahting U., von Mering C. et al. Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle. *PLoS Genet.*, 2006, 2:e170.
58. Hiltunen J.K., Schonauer M.S., Autio K.J., Mittelmeier T.M., Kastaniotis A.J., Dieckmann C.L. Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, pp. 9011–9015.
59. Patrushev M., Kasymov V., Patrusheva V., Ushakova T., Gogvadze V., Gaziev A. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell Mol. Life Sci.*, 2004, 61 (24), pp. 3100–3103.
60. Forner F., Kumar C., Lubner C.A., Fromme T., Klingenspor M., Mann M. Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab.*, 2009, 10, 324–
61. Capaldi R.A., Halphen D.G., Zhang Y.Z., Yanamura W. Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1988, 20, pp. 291–311.
62. Johnson D.T., Harris R.A., Blair P.V., Balaban R.S. Functional consequences of mitochondrial proteome heterogeneity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2007, 292, C698–707.
63. Thiele I., Price N.D., Vo T.D., Palsson B.O. Candidate metabolic network states in human mitochondria. Impact of diabetes, ischemia, and diet. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, pp. 11683–11695.
64. Vo T.D., Greenberg H.J., Palsson B.O. Reconstruction and functional characterization of the human mitochondrial metabolic network based on proteomic and biochemical data. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, pp. 39532–39540.
65. Gabaldon T., Huynen M.A. From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. *PLoS Comput. Biol.*, 2007, 3:e219.
66. DiMauro S., Hirano M., Schon E.A. *Mitochondrial Medicine*. New York, Informa Healthcare, 2006. 348 p.
67. Evdokimovskii EV, Patrushev MV, Ushakova TE, Gaziev AI. Sharp changes in the copy number of mtDNA and its transcription in the blood cells of X-ray irradiated mice are observed, and mtDNA fragments appear in the blood serum. *Radiat. Biol. Radioecol.*, 2007, 47 (4), pp. 402–407.
68. Patrushev M.V., Patrusheva V.E., Kasymov V.A., Evdokimovsky E.V., Ushakova T.E., Gaziev A.I. Release of mtDNA from mitochondria and activation of its replication in tissues of irradiated mice. *Tsitologiya*, 2006, 48 (8), pp. 684–690.
69. Patrushev M., Kasymov V., Patrusheva V., Ushakova T., Gogvadze V., Gaziev A.I. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. *Mitochondrion*, 2006, 6 (1), pp. 57–62.
70. Chinnery P.F. Searching for nuclear-mitochondrial genes. *Trends Genet.*, 2003, 19, 60–62.
71. Bernier F.P., Boneh A., Dennett X., Chow C.W., Cleary M.A., Thorburn D.R. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology*, 2002, 59, pp. 1406–1411.
72. Morava E., van den Heuvel L., Hol F., de Vries M.C.,

- Hogeveen M. et al. Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children. *Neurology*, 2006, 67, pp. 1823–1826.
73. Walker U.A., Collins S., Byrne E. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur. Neurol.*, 1996, 36, pp. 260–267.
74. Tiranti V., D'Adamo P., Briem E., Ferrari G., Miner R. et al. Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am. J. Hum. Genet.*, 2004, 74, pp. 239–252.
75. Zhu X., Peng X., Guan M.X., Yan Q. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2009, 41, pp. 179–187.
76. Mootha V.K., Lepage P., Miller K., Bunkenborg J., Reich M. et al. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, pp. 605–610.
77. Uusimaa J., Finnila S., Remes A.M., Rantala H., Vainionpaa L. et al. Molecular epidemiology of childhood mitochondrial ncephalomyopathies in a Finnish population: sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNAArg, tRNAGlu, and tRNALeu (UUR) genes. *Pediatrics*, 2004, 114, pp. 443–450.
78. Patrushev M.V., Patrusheva V.E. Role of transcription factors in mtDNA biogenesis mediated by thyroid hormones. *Biochemistry (Mosc)*, 2011, 76 (2), pp. 260–267.
79. Reversade B., Escande-Beillard N., Dimopoulou A., Fischer B., Chng S.C. et al. Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features. *Nat. Genet.*, 2009, 41, pp. 1016–1021.
80. Ng S.B. et al. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat. Genet.*, 2009, 42, pp. 30–35.
81. Scharfe C., Lu H.H., Neuenburg J.K., Allen E.A., Li G.C. et al. Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes. *PLoS Comput. Biol.*, 2009, 5:e1000374.
82. Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, pp. 16202–16212.
83. Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell.*, 2003, 11, pp. 577–590.
84. Fonseca S.G., Fukuma M., Lipson K.L., Nguyen L.X., Allen J.R. et al. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, pp. 39609–39615.

**Kosterina Ye.A.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Kozenkov I.I.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Kasymov V.A.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Kamensky P.A.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Dominova I.N.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Korolyova Yu.A.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Patrusheva V.Ye.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Bogachev R.S.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Litvinova L.S.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Babak S.V.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Moiseeva Ye.M.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Bogdanov Ye.A.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Mukhortova O.A.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Vavilina Ya.S.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Mikhailchenkova T.A.** – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Patrushev Maksim V.** (✉) – Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

✉ **Patrushev Maksim V.**, Ph. +7 (4012) 59-55-95 (6630); e-mail: mpatrushev@innopark.kantiana.ru