

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Субкомпартаментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы митохондрий

И.В. Уколова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

✉ irina@sifibr.irk.ru

Аннотация. Система окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) митохондрий поддерживает все жизненно важные энергозатратные процессы в клетках эукариот, обеспечивая их энергией в форме АТФ. Ферменты ОКСФОС (комплексы I–V) локализуются во внутренней мембране митохондрий, преимущественно в кристном субкомпарменте. К настоящему времени получен значительный объем данных, указывающих на то, что дыхательные комплексы I, III₂ и IV в условиях *in vivo* могут физически взаимодействовать друг с другом в различной стехиометрии, образуя суперкомплексы. Несмотря на активное накопление знаний о структуре основных суперкомплексов системы ОКСФОС, ее физическая и функциональная организация *in vivo* остается неясной. Современные модели организации ОКСФОС во внутренней мембране митохондрий противоречивы и предполагают существование либо высокоорганизованных дыхательных цепочек, либо, наоборот, набора случайно расположенных дыхательных суперкомплексов и комплексов. При этом предполагается, что АТФ-синтаза (комплекс V) не образует ассоциаций с дыхательными ферментами и работает автономно. Наши последние данные, полученные на митохондриях этиолированных побегов гороха, указывают на возможность физической ассоциации дыхательных суперкомплексов и димерной АТФ-синтазы. Эта информация позволила пересмотреть существующие представления об организации фосфорилирующей системы и предложить новую субкомпартаментационную оксфосомную модель. Согласно новой модели, значительная часть комплексов ОКСФОС формирует оксфосомы, которые в определенной стехиометрии включают комплексы I–V и располагаются преимущественно в кристном субкомпарменте митохондрий в виде высокоорганизованных цепочек или «патчей», представляющих собой «мини-фабрики» по производству АТФ. Предполагается, что такая организация способствует увеличению эффективности работы системы ОКСФОС; открывает новые возможности для регуляции ее активности и в той или иной степени может определять морфологию внутренней мембраны митохондрий. В обзоре подробно обсуждается предлагаемая модель. Для лучшего понимания вопроса кратко рассмотрена история развития представлений об организации системы ОКСФОС с акцентом на современные модели, а также приведены накопленные за последние сорок лет основные экспериментальные данные, подтверждающие обоснованность оксфосомной гипотезы.

Ключевые слова: система окислительного фосфорилирования; митохондрии; оксфосома; модели организации ОКСФОС; суперкомплексы.

Для цитирования: Уколова И.В. Субкомпартаментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы митохондрий. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(7):778-786. DOI 10.18699/VJ21.089

The subcompartmented oxphosomic model of the phosphorylating system organization in mitochondria

I.V. Ukolova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

✉ irina@sifibr.irk.ru

Abstract. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system of mitochondria supports all the vitally important energy-consuming processes in eukaryotic cells, providing them with energy in the form of ATP. OXPHOS enzymes (complexes I–V) are located in the inner mitochondrial membrane, mainly in the cristae subcompartment. At present, there is a large body of data evidencing that the respiratory complexes I, III₂ and IV under *in vivo* conditions can physically interact with each other in diverse stoichiometry, thereby forming supercomplexes. Despite active accumulation of knowledge about the structure of the main supercomplexes of the OXPHOS system, its physical and functional organization *in vivo* remains unclear. Contemporary models of the OXPHOS system's organization in the inner membrane of mitochondria are contradictory and presume the existence of either highly organized respiratory strings, or, by contrast, a set of randomly dispersed respiratory supercomplexes and complexes. Furthermore, it is assumed that ATP-synthase (complex V) does not form associations with respiratory enzymes and operates autonomously. Our latest data obtained on mitochondria of etiolated shoots of pea evidence the possibility of physical association between the respiratory supercomplexes and dimeric ATP-synthase. These data have allowed us to reconsider the contemporary concept of the phosphorylation system organization and propose a new subcompartmented oxphosomic model. According to this

model, a substantial number of the OXPHOS complexes form oxphosomes, which in a definite stoichiometry include complexes I–V and are located predominantly in the cristae subcompartment of mitochondria in the form of highly organized strings or patches. These suprastructures represent “mini-factories” for ATP production. It is assumed that such an organization (1) contributes to increasing the efficiency of the OXPHOS system operation, (2) involves new levels of activity regulation, and (3) may determine the inner membrane morphology to some extent. The review discusses the proposed model in detail. For a better understanding of the matter, the history of development of concepts concerning the OXPHOS organization with the emphasis on recent contemporary models is briefly considered. The principal experimental data accumulated over the past 40 years, which confirm the validity of the oxphosomic hypothesis, are also provided.

Key words: system of oxidative phosphorylation; mitochondria; oxphosome; models of the OXPHOS organization; supercomplexes.

For citation: Ukolova I.V. The subcompartmented oxphosomic model of the phosphorylating system organization in mitochondria. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):778-786. DOI 10.18699/VJ21.089

Введение

Система окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) митохондрий является основным источником энергии, производимой в виде АТФ, которая необходима для поддержания всех жизненно важных метаболических процессов, протекающих в клетках аэробных эукариотических организмов. Ферменты ОКСФОС локализованы во внутренней мембране митохондрий и включают пять функциональных комплексов (I–V), каждый из которых представляет собой сложно организованную молекулярную машину: комплекс I – НАДН-дегидрогеназа; комплекс II – сукцинатдегидрогеназа; комплекс III – цитохром-*bc1*-комплекс; комплекс IV – цитохром *c* оксидаза; комплекс V – АТФ-синтаза. Четыре первых фермента образуют дыхательную цепь и последовательно вовлечены в процесс переноса электронов от окисляемого субстрата на молекулярный кислород. Этот процесс в комплексах I, III и IV сопряжен с транслокацией протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, в результате чего образуется электрохимический протонный градиент, который используется АТФ-синтазой для синтеза АТФ. Кроме того, к системе ОКСФОС относят мобильные переносчики электронов, убихинон и цитохром *c* (Enríquez, 2016), и сопряженные с АТФ-синтазой переносчики адениновых нуклеотидов и неорганического фосфата (Лужиков, 2009).

Компоненты системы трансформации энергии составляют основную массу белков внутренней мембраны митохондрий и, по разным данным, занимают от половины до двух третей ее гидрофобного объема (Vonck, 2012; Schlame, 2021). К настоящему времени накопилось много данных, указывающих на более высокую, чем предполагалось ранее, степень организации ферментов ОКСФОС в условиях *in vivo*, а именно на существование дыхательных суперкомплексов различной стехиометрии, включающих комплексы I, димер III₂ и IV, и олигомерных рядов АТФ-синтазы (Vonck, 2012; Chaban et al., 2014). Считается, что такая компактная надмолекулярная организация позволяет избежать неспецифической агрегации ферментов и деформации липидного бислоя (Guigas, Weiss, 2016), повышает эффективность дыхания и защищает клетку от окислительного стресса (Lenaz, Genova, 2012).

Однако, несмотря на то что структура основных суперкомплексов хорошо изучена, физическая и функциональная организация системы ОКСФОС *in vivo* остается неизвестной и до сих пор является предметом споров.

Активный интерес к данному вопросу объясняется тем, что правильное представление о нативной организации энергетической системы митохондрий не только открывает новые возможности для дальнейшего развития митохондриологии, но и определяет новые пути решения таких жизненно важных задач человечества, как терапия болезней, связанных с митохондриальными дисфункциями.

Возможные варианты расположения суперкомплексов во внутренней митохондриальной мембране активно обсуждаются в современных моделях организации фосфорилирующей системы, которые порой противоречивы и предполагают существование либо высокоорганизованных дыхательных цепочек, либо, наоборот, свободно диффундирующих в плоскости мембраны суперкомплексов и комплексов дыхательной цепи. При этом предполагается, что АТФ-синтаза не образует ассоциаций с дыхательными ферментами и функционирует автономно.

На основании новых данных, полученных нами с использованием митохондрий побегов гороха, недавно была предложена субкомпартаментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы (Ukolova et al., 2020). В отличие от существующих моделей, она постулирует, что значительная часть дыхательных суперкомплексов взаимодействует с димерной АТФ-синтазой *in vivo*, формируя оксфосомы, которые располагаются преимущественно в кристном субкомпартаментаменте митохондрий в виде высокоорганизованных цепочек или «патчей» (рис. 1, e). Предполагается, что такая организация существенно увеличивает эффективность и обеспечивает дополнительные уровни контроля за работой системы ОКСФОС. Новая модель подробно рассматривается ниже. Для лучшего понимания вопроса и оценки ее обоснованности в статье представлены краткая история эволюции взглядов на организацию ОКСФОС, а также литературные данные, поддерживающие оксфосомную гипотезу.

Краткий экскурс в историю развития представлений об организации системы ОКСФОС митохондрий *in vivo*

Физическая целостность дыхательной цепи (т. е. объединенность ее компонентов) предполагалась еще Д. Кейлином в его работах 1930–1940-х гг. (Keilin, 1930; Keilin, Hartree, 1939, 1949). Долгое время считалось, что все ферменты дыхательной цепи стабильно взаимодействуют, образуя «дыхательные ансамбли» (Chance, Williams, 1956;

Lehninger, 1959). Такое агрегатное состояние дыхательной цепи называли «твердым» (Lehninger, 1959; Rich, 1981) (см. рис. 1, а). По мере получения новых данных на смену «твердой» модели пришла «жидкостная» (Hackenbrock et al., 1986) (см. рис. 1, б). Эта модель исключала физическую ассоциацию компонентов ОКСФОС и постулировала, что все редокс-компоненты, участвующие в переносе электронов, и белки, необходимые для синтеза АТФ, являются «независимыми латеральными диффузантами», которые взаимодействуют в результате множественных столкновений.

Несмотря на большой объем данных, свидетельствующих в пользу «жидкостной» модели, продолжали накапливаться факты, указывающие на существование *in vivo* ассоциаций комплексов дыхательной цепи, а также олигомерной АТФ-синтазы. Поворотным стал 2000 г., когда Г. Шэггер с коллегами, используя разработанный ими метод голубого нативного электрофореза (BN-PAGE), получили убедительные доказательства физического взаимодействия дыхательных комплексов с образованием суперкомплексов и фактически обновили и вернули «твердую» модель, предложив концепцию респирасомы (Schägger, Pfeiffer, 2000) (см. рис. 1, в). Согласно этой модели, обнаруженные суперкомплексы являются строительными блоками, которые могут взаимодействовать и формировать сеть дыхательных суперкомплексов, т. е. респирасому. Позднее авторы стали называть респирасомой также отдельный суперкомплекс, включающий дыхательные комплексы I, III₂ и IV, который мог самостоятельно «дышать», т. е. выполнять весь цикл переноса электронов от окисляемого субстрата на молекулярный кислород (Schägger, 2002). В результате термин прижился и сейчас используется именно в этом контексте.

Современное представление об организации энергетической системы митохондрий *in vivo*

Филогенетическая консервативность организации компонентов ОКСФОС

С появлением BN-PAGE и успешным сочетанием этого метода с криоэлектронной микроскопией и энзимографией, а также другими методами, изучение надмолекулярной организации системы ОКСФОС в митохондриях различных организмов вышло на новый уровень. Дальнейшие исследования системы ОКСФОС в митохондриях млекопитающих, растений, грибов, дрожжей, водорослей и некоторых простейших выявили схожий состав суперкомплексов (Krause et al., 2004; Chaban et al., 2014). Все изученные надмолекулярные ассоциации компонентов ОКСФОС, полученные в результате солиubilизации митохондрий мягкими детергентами, можно разделить на четыре основные группы: 1) суперкомплекс I₁III₂; 2) суперкомплексы III₂IV₁₋₂; 3) респирасомы I₁III₂IV₁₋₄; 4) димерная АТФ-синтаза. В некоторых видах дополнительно были обнаружены дыхательные суперкомплексы с другим составом и стехиометрией (Ukolova et al., 2020). Димеры АТФ-синтаз *in vivo* ассоциируют друг с другом, образуя длинные олигомерные цепочки, расположенные вдоль сильно изогнутых краев крист внутренней мембраны (Kühlbrandt, 2019). Имеются убедительные данные,

указывающие на то, что именно димеризация АТФ-синтазы с последующей олигомеризацией способствует формированию крист.

В настоящее время существуют две альтернативные модели расположения дыхательных суперкомплексов и комплексов ОКСФОС во внутренней мембране митохондрий, которые фактически представляют собой современные версии «твердой» и «жидкостной» моделей, – это модель высокоорганизованных дыхательных цепочек и «патчей» (Nübel et al., 2009; Wittig, Schägger, 2009) и «пластичная» модель (Acín-Pérez et al., 2008; Enríquez, 2016). Первая описывает цепочки ассоциированных друг с другом дыхательных суперкомплексов (см. рис. 1, з), тогда как вторая постулирует случайное распределение суперкомплексов и комплексов в мембране (см. рис. 1, д). При этом обе модели предполагают раздельное расположение и автономное функционирование дыхательных суперкомплексов и олигомерных рядов АТФ-синтаз.

Дыхательные цепочки и «патчи»

Модель возникла в результате дальнейшего развития модели респирасомы (Schägger, Pfeiffer, 2000). На основании новых данных, полученных с использованием BN-методов, Г. Шэггер с коллегами (Nübel et al., 2009; Wittig, Schägger, 2009) предположили, что дыхательные суперкомплексы во внутренней мембране митохондрий могут быть «строительными блоками» для более крупных структур, а именно дыхательных цепочек и даже «патчей». Дыхательные цепочки представляют собой линейные ряды ассоциированных друг с другом суперкомплексами (см. рис. 1, з). Связующими звеньями между суперкомплексами выступают, в зависимости от вида и организма, димеры или тетрамеры комплекса IV (Wittig, Schägger, 2009). По мнению авторов, дыхательные цепочки могут располагаться параллельно друг другу в плоскости мембраны и взаимодействовать через мономеры комплекса I с образованием структур более высокого порядка, называемых «патчами» (Nübel et al., 2009).

Убедительным доводом в пользу этой модели стала идентификация (при помощи модифицированных нативных гелей с большими порами) мультимерных дыхательных суперкомплексов с видимыми массами от 4–8 до 35–45 МДа (Strecker et al., 2010). Исследователи опирались также на более ранние пионерные работы Р.Д. Аллена с коллегами (Allen et al., 1989), в которых при помощи криоэлектронной микроскопии удалось зафиксировать не только олигомерные ряды АТФ-синтаз на внешнем изгибе тубулярных крист *Paramecium multimicronucleatum*, но и дополнительный ряд крупных частиц на их внутреннем изгибе, расположенных на одинаковом расстоянии друг от друга и соответствующих по размеру димерному комплексу I. Г. Шэггер и И. Виттиг (Wittig, Schägger, 2009) предположили, что этот дополнительный ряд представляет собой дыхательную цепочку, и предложили ее вариант для митохондрий млекопитающих (см. рис. 1, з). Варианты дыхательных цепочек для картофеля и *Polytomella* sp. были разработаны и другими исследователями (Bultema et al., 2009; Miranda-Astudillo et al., 2018). При этом цепочки располагались параллельно олигомерным рядам АТФ-синтаз (Miranda-Astudillo et al., 2018).

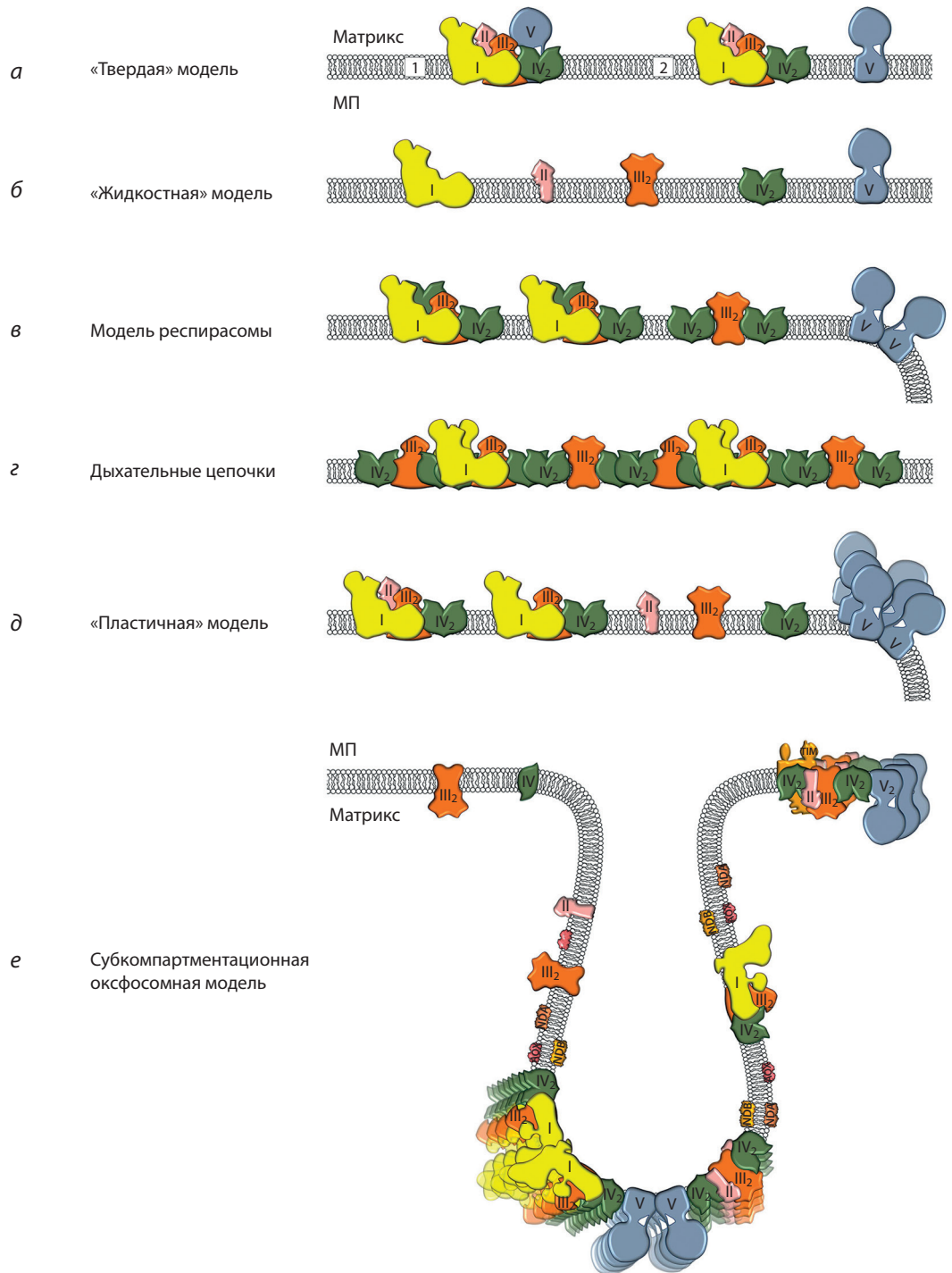


Рис. 1. Развитие представлений об организации системы ОКСФОС митохондрий от первоначальной «твердой» до новой субкомпарментационной оксфосомной модели.

Интерпретация моделей представлена с учетом современных данных о структуре комплексов ОКСФОС млекопитающих (а–д) и растений (е). Согласно литературным источникам, все основные модели, за исключением последней (е), приведены для митохондрий млекопитающих. Обозначения: первоначальная (1) и более поздняя (2) «твердые» модели; матрикс и МП – матрикс и межмембранное пространство митохондрий; комплексы I, II, III₂, IV и IV₂ дыхательной цепи и АТФ-синтаза (комплекс V) обозначены желтым, розовым, оранжевым, темно-зеленым и голубым цветом соответственно. На более современных схемах показано, что димерная АТФ-синтаза способствует загибу мембраны и, таким образом, участвует в формировании крист (в, д, е). Описание моделей приведено в тексте. Модель респирасомы (в) изображена согласно схемам Г. Шэггера (Schägger, Pfeiffer, 2000; Schägger, 2002) и отражает ее основной постулат, определяющий соотношение большого суперкомплекса I₁III₂IV₄ и маленького суперкомплекса III₂IV₄ как 2:1. В этой модели в обоих суперкомплексах димеры комплекса IV (IV₂) располагаются с противоположных сторон димера III₂. Модель дыхательных цепочек (г) приведена по схеме Г. Шэггера и И. Виттиг (Wittig, Schägger, 2009), но, в отличие от оригинала, представлен вид сбоку (в плоскости мембраны). Существуют и другие варианты дыхательных цепочек (Bultema et al., 2009; Miranda-Astudillo et al., 2018). В оксфосомной модели (е), разработанной для митохондриальной системы ОКСФОС побегов гороха (Ukolova et al., 2020), помимо основных комплексов ОКСФОС присутствуют свободно расположенные альтернативные ферменты, что подчеркивает более сложную организацию фосфорилирующей системы у растений.

«Пластичная» модель

Изучение состава ОКСФОС у различных видов с использованием BN-PAGE показало, что после солиubilизации митохондрий детергентами часть популяции дыхательных комплексов находится в свободном состоянии, а часть присутствует в составе суперкомплексов (Enríquez, 2016). Более того, в ряде исследований отмечено, что относительное количество свободных и ассоциированных дыхательных ферментов, а также соотношение суперкомплексов различной стехиометрии меняется в зависимости от типа клеток и физиологического состояния организма (этапа развития, стрессового воздействия, болезни). На основании этих данных Ж.А. Энрикес с коллегами (Acín-Pérez et al., 2008; Acín-Pérez, Enríquez, 2014) предложили «пластичную» модель, которая постулирует сбалансированное сосуществование свободных дыхательных комплексов и суперкомплексов разного состава и стехиометрии, соответствующее физиологическому статусу клетки (см. рис. 1, *д*). Данная модель рассматривается автором преимущественно как «усовершенствованная версия жидкостной модели» (Enríquez, 2016), поскольку отдельные дыхательные комплексы и суперкомплексы свободно диффундируют в плоскости внутренней митохондриальной мембраны.

Новая субкомпарментационная оксфосомная модель организации фосфорилирующей системы митохондрий

Новая модель постулирует, что существенная часть дыхательных суперкомплексов физически взаимодействует с димерной АТФ-синтазой с образованием оксфосом, которые располагаются преимущественно в кристном субкомпарменте митохондрий в виде высокоорганизованных участков, «мини-фабрик» по производству АТФ (Ukolova et al., 2020) (см. рис. 1, *е*). При этом остальная часть дыхательных суперкомплексов и комплексов, по видимому, остается в свободной форме. Предполагается, что соотношение между ассоциированными оксфосомами и свободными дыхательными суперкомплексами и комплексами зависит от типа, физиологического статуса и энергетических потребностей клетки. Фактически модель объединяет современные «твердую» и «жидкостную» модели (см. рис. 1, *з, д*), добавляя дополнительный уровень сложности, связанный с оксфосомной организацией и структурным и функциональным разделением внутренней мембраны на субкомпарменты.

Экспериментальные данные, определившие появление модели

Как отмечалось выше, предлагаемая модель была разработана на основании данных, полученных нами недавно при изучении организации фосфорилирующей системы в митохондриях этиолированных побегов гороха (Ukolova et al., 2020). Использование свежeweделенных митохондрий для солиubilизации дигитонином суперкомплексов и комплексов ОКСФОС, применение мультимерной электрофорезной системы на основе BN-PAGE и мягкой электрофорезной системы на основе BN-PAGE и мягкой электрофорезной системы позволили идентифицировать суперкомплекс IV_1Va_2 и показать возможность физического взаимодействия между АТФ-син-

тазой и комплексом IV дыхательной цепи. Кроме того, в дополнение к каноническим ассоциациям I_1III_2 , $I_1III_2IV_n$ и III_2IV_{1-2} , димеру V_2 , а также свободным комплексам I–V нам удалось обнаружить и другие новые структуры, которые не детектировались ранее, а именно: вторую форму АТФ-синтазы Va с более высокой молекулярной массой, респирасому $I_2III_4IV_n$ с двумя копиями комплекса I и двойным димерным комплексом III_2 , а также высокомолекулярный мегакомплекс $(II_xIII_yIV_z)_n$. Одновременное выделение суперкомплекса IV_1Va_2 , респирасом $I_{1-2}III_{2-4}IV_n$ и мегакомплекса $(II_xIII_yIV_z)_n$, в которых комплекс IV был связан либо с АТФ-синтазой, либо с дыхательными комплексами, позволило предположить, что все комплексы ОКСФОС *in vivo* могут физически взаимодействовать в определенной стехиометрии с образованием более крупной структуры – оксфосомы. Таким образом, оксфосома представляет собой структуру, в которой комплексы I (и/или, возможно, II), III_2 , IV и V ассоциированы в строго определенной стехиометрии и которая может автономно выполнять весь цикл реакций от окисления субстрата до фосфорилирования АДФ, т. е. может «дышать» и производить АТФ (рис. 2).

Связующим звеном между дыхательной и фосфорилирующей частями в оксфосоме являются димеры или тетрамеры комплекса IV (см. рис. 2). Потенциальная способность комплекса IV связывать суперкомплексы (правда только дыхательные) между собой через формирование димеров и тетрамеров уже рассматривалась ранее в моделях дыхательных цепочек (Bultema et al., 2009; Wittig, Schägger, 2009; Miranda-Astudillo et al., 2018). Учитывая большое количество свободных форм комплекса IV (IVa/b и IV_2) после солиubilизации детергентом как в нашей (Ukolova et al., 2020), так и в других работах (Eubel et al., 2003; Krause et al., 2004; Acín-Pérez et al., 2008), можно предположить, что это связующее звено чувствительно к действию детергента и является местом разлома оксфосомы при солиubilизации. Чувствительны к действию детергента и димеры комплекса V, которые распадаются при солиubilизации митохондрий многих видов до мономеров (Schägger, Pfeiffer, 2000; Eubel et al., 2003). Такая чувствительность объясняет минорное содержание обнаруженного нами нового суперкомплекса IV_1Va_2 в митохондриях побегов гороха (Ukolova et al., 2020).

На существование подобной ассоциации в других видах и организмах указывают некоторые косвенные литературные данные. Так, в работе (Qiu et al., 1992) была показана возможность реконструкции ассоциации комплексов IV–V в протеолипосомах из высокоочищенных комплексов IV и V, изолированных из бычьего сердца. В исследованиях на дрожжах продемонстрировано, что отсутствие димер-специфичных субъединиц АТФ-синтазы в мутантных штаммах (т. е. отсутствие димеров АТФ-синтазы) уменьшает активность комплекса IV, снижает скорость синтеза АТФ, изменяет кинетический контроль комплекса IV над окислительным фосфорилированием (Boyle et al., 1999) и снижает стабильность суперкомплекса III_2IV_2 (Saddar et al., 2008). Эти факты позволяют предположить, что оксфосомная организация фосфорилирующей системы может иметь консервативные черты и являться универсальной для различных видов, но при

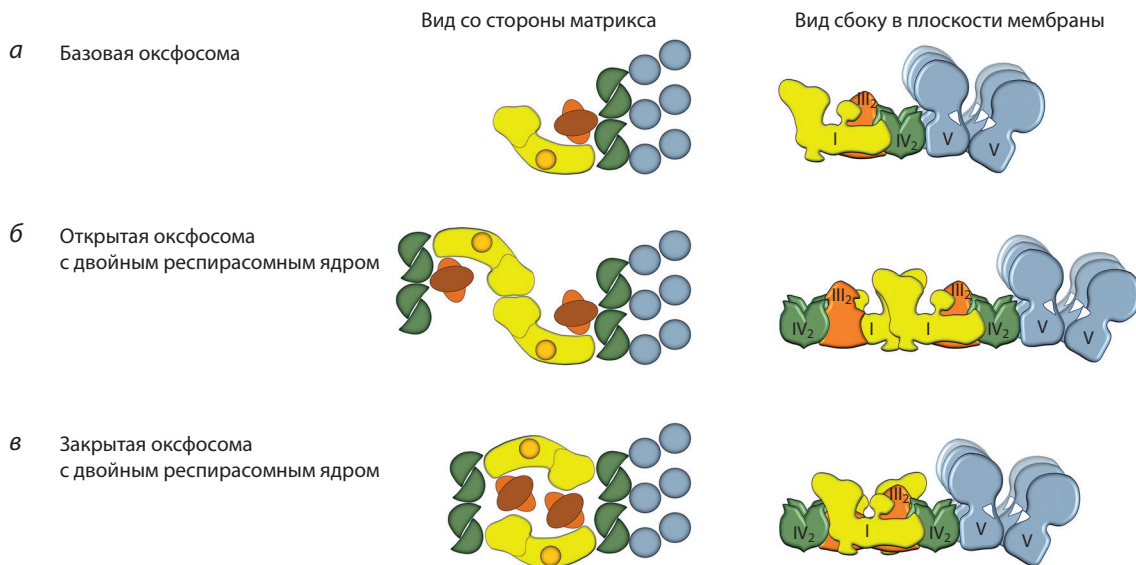


Рис. 2. Организация базовой оксфосомы и оксфосом с двойным респирасомным ядром открытого и закрытого типов.

Представлен схематический вид предполагаемых оксфосом митохондрий побегов гороха: с матриксной стороны внутренней мембраны митохондрий и профильная проекция (вид сбоку в плоскости мембраны). Цветовое обозначение см. на рис. 1. Мономеры комплекса IV на проекции со стороны матрикса представлены в виде темно-зеленых «половинок», последовательно связанных друг с другом в димеры и затем тетрамеры. На профильной проекции димеры расположены друг за другом. Светло-коричневый круг на матриксной стороне комплекса I и выступающая «ножка» на его боковой проекции представляют собой карбоангидразный домен, специфичный для растительного фермента.

этом, по-видимому, должна обладать и таксоноспецифичными особенностями.

Предполагаемая организация оксфосом

Все известные на сегодняшний день надмолекулярные структуры системы ОКСФОС имеют строго определенную стехиометрию и пространственную организацию. Для расчета стехиометрии оксфосом и разработки модели их организации *in vivo* необходимо учитывать количественное соотношение комплексов ОКСФОС и имеющиеся данные о структуре и пространственной организации дыхательных комплексов и суперкомплексов, а также димеров АТФ-синтазы.

Анализ литературных данных показывает, что соотношение комплексов может меняться в зависимости от организма, типа и физиологического статуса клетки (Schägger, 2002; Dubinin et al., 2011; Peters et al., 2012). Это означает, что модель организации системы ОКСФОС в каждом конкретном случае может иметь свои особенности. Тем не менее, учитывая высокую консервативность изученных суперструктур ОКСФОС, можно предположить, что основные принципы организации системы, а именно формирование оксфосом, оксфосомных цепочек и свободных суперкомплексов с определенными стехиометрией и пространственной архитектурой, должны сохраняться.

Точное соотношение комплексов I:II:III:IV:V определено пока только для митохондрий бычьего сердца и составляет округленно 1:1.5:3:6:3 (Schägger, 2002). При таком соотношении на каждые два комплекса I приходится три комплекса II, три димера III₂, шесть димеров IV₂ (или три тетрамера IV₄) и три димера V₂. На основании этих данных модель респирасомы для бычьих митохондрий, рассматривающая ассоциации только дыхательных

комплексов I, III и IV, постулирует, что строительными блоками для сети дыхательных суперкомплексов митохондрий млекопитающих являются большая суперкомплекс I₁III₂IV₄ (называемый сейчас респирасомой) и маленький суперкомплекс III₂IV₄, присутствующие во внутренней мембране в соотношении 2:1 (см. рис. 1, в). Точное соотношение комплексов ОКСФОС для митохондрий побегов гороха пока не определено, но, по нашим данным, две трети популяции комплекса III входят в состав респирасом (Ukolova et al., 2020), что согласуется с моделью Г. Шэггера. Это позволило разработать модель организации системы ОКСФОС на примере митохондрий проростков гороха, опираясь на соотношение комплексов, определенное для органелл бычьего сердца (см. рис. 1, е). Дальнейшее изучение содержания и соотношения ферментов энергетической системы побегов гороха позволит уточнить представленную модель организации.

Таким образом, используя приведенные выше данные, можно предположить, что основными структурными компонентами, или строительными блоками, системы ОКСФОС в митохондриях проростков гороха являются: базовая оксосома I₁III₂IV₄V₆, респирасома I₁III₂IV₄ и суперкомплекс III₂IV₄. Базовая оксосома представляет собой респирасому I₁III₂IV₄, связанную с тремя димерами АТФ-синтазы (см. рис. 2, а). Вторая респирасома I₁III₂IV₄ и суперкомплекс III₂IV₄ могут также ассоциировать с базовой оксосомой, образуя структуры более высокого порядка (см. рис. 1, е и рис. 2, б, в). Учитывая результаты Д.Б. Бултемы с коллегами (Bultema et al., 2009), которые при помощи электронной микроскопии показали наличие открытой и закрытой конформаций суперкомплекса I₁III₂ из митохондрий клубней картофеля, а также наши электрофоретические данные, указывающие на различие в

структуре двух высокомолекулярных суперкомплексов с составом $I_2III_4IV_n$, можно предположить возможность формирования «открытых» и «закрытых» оксфосом с двойным респирасомным ядром (см. рис. 2, б, в). Эти две формы, вероятно, переходят одна в другую и таким образом участвуют в регуляции активности системы ОКСФОС. Маленький суперкомплекс III_2IV_4 , по-видимому, *in vivo* может ассоциировать с комплексом II или альтернативными НАД(Ф)Н-дегидрогеназами, поставляющими электроны от окисляемых субстратов на комплекс III₂ (см. рис. 1, е). Пространственная организация предполагаемых оксфосом разработана с учетом имеющихся данных криоэлектронной микроскопии о структуре индивидуальных комплексов и суперкомплексов ОКСФОС в митохондриях растений (см. рис. 2).

Пока неясно, насколько ассоциировано состояние энергетической системы у проростков гороха и какую долю занимают оксфосомные участки в митохондриях этого, а также других видов и организмов. Соотношение и состав свободных и ассоциированных с олигомерными рядами АТФ-синтазы дыхательных суперкомплексов и комплексов могут зависеть от физиологического статуса и энергетических потребностей клетки. Например, в клетках с более высокой потребностью в энергии (клетки мышц, сердца, мозга млекопитающих) логично ожидать более ассоциированное «оксфосомное» состояние энергетической системы митохондрий, нацеленное на производство большего количества АТФ.

Субкомпартаментационная локализация компонентов ОКСФОС

Внутренняя мембрана митохондрий подразделяется на два морфологически и предположительно функционально различных субкомпартамента: кристный и домен внутренней пограничной мембраны. Показано, что комплексы ОКСФОС преимущественно локализуются в кристном отделе (Gilkerson et al., 2003; Vogel et al., 2006). Так, по данным Р.В. Гилкерсона с соавторами (Gilkerson et al., 2003), около 94 % комплекса III дыхательной цепи и АТФ-синтазы находится в кристах, и лишь 6 % – в пограничной мембране. Имеющиеся литературные сведения позволяют предположить преимущественную локализацию оксфосом в кристном отделе, где они могут образовывать высокоорганизованные оксфосомные цепочки или «патчи» (см. рис. 1, е). В то же время результаты Ф. Вогеля с коллегами (Vogel et al., 2006) указывают на то, что во внутренней пограничной мембране АТФ-синтаза тоже присутствует в виде димеров, что предполагает формирование оксфосом и в этом субкомпарменте. Оксфосомы и отдельные суперкомплексы внутренней пограничной мембраны могли бы эффективно поддерживать потенциал- и АТФ-зависимые процессы, протекающие наиболее активно в этом отделе, например транслокацию и сборку белка.

Факты, подтверждающие функциональную обоснованность оксфосомной модели

Первой гипотезой, предложившей механизм протонного сопряжения окисления и фосфорилирования в «жестко» фиксированной ассоциации ферментов ОКСФОС и получившей в дальнейшем экспериментальные подтвержде-

ния, была гипотеза локального сопряжения Р. Вильямса (Williams, 1961). Согласно этой концепции, упорядоченная «сборка» ферментов в мембране создает условия для формирования протонов в высокой локальной концентрации и их прямого (без пересечения гидрофобного мембранного барьера) переноса к АТФ-синтазе (Williams, 1961; Skulachev, 1982). Любопытно, что концепция Р. Вильямса была предложена в том же году, что и хемиосмотическая гипотеза П. Митчелла (ставшая впоследствии теорией), и явилась альтернативой последней. Гипотеза П. Митчелла (Mitchell, 1961) постулировала, что протоны H^+ транспортируются протонными помпами через внутреннюю мембрану митохондрий в основную водную фазу и не связываются с мембраной, формируя делокализованный электрохимический потенциал, который и используется АТФ-синтазой (Skulachev, 1982). Впоследствии этот механизм трактовался в пользу свободного, диссоциированного, распределения ферментов в мембране, т. е. в пользу «жидкостной» модели организации.

Несмотря на огромный объем экспериментальных данных, подтверждающих хемиосмотическую гипотезу, постепенно накапливались аргументы и в пользу концепции локального сопряжения, а следовательно, в пользу физической ассоциации дыхательных ферментов и АТФ-синтазы, а именно: 1) была показана взаимозависимая регуляция между митохондриальной АТФ-синтазой и комплексами дыхательной цепи (Tu et al., 1981; Krasinskaya et al., 1984); 2) получено доказательство существования неравновесно связанной с мембраной фракции ионов водорода, образующейся локально в результате работы протонных помп дыхательной цепи (Antonenko et al., 1993; Motovilov et al., 2009); 3) выявлено участие фракции мембраносвязанных протонов в синтезе АТФ (Солодовникова и др., 2004; Еремеев, Ягужинский, 2015); 4) обнаружены катализаторы высвобождения мембраносвязанных протонов с внешней поверхности внутренней мембраны, с их помощью показана возможность переключения фосфорилирующей системы из режима локального сопряжения в режим трансмембранного переноса протонов (Yaguzhinsky et al., 2006). Представленные данные поддерживают оксфосомную гипотезу и предполагают, что система ОКСФОС может использовать как локализованный, так и делокализованный электрохимические потенциалы ионов водорода.

Заключение

Новые открытия в отношении физической и функциональной организации фосфорилирующей системы митохондрий периодически заставляют пересматривать имеющиеся представления, что приводит к переходу нашего понимания ее устройства и функционирования на новый уровень. Появляющиеся модели либо полностью отрицают предыдущие, как это было в конце 1970-х – начале 1980-х гг., в период смены «твердой» модели на «жидкостную» (см. рис. 1, а, б), либо базируются на них, дополняя и уточняя их, как, например, в случае модели дыхательных цепочек, которая возникла в результате развития модели респирасомы (см. рис. 1, в, г).

В настоящее время, несмотря на активное получение данных о пространственной организации, структуре и

функциональной активности дыхательных суперкомплексов и олигомерной АТФ-синтазы, надмолекулярная организация системы ОКСФОС *in vivo* остается не до конца ясной. Последние результаты, полученные нами на митохондриях этиолированных побегов гороха, указывают на возможность физической ассоциации дыхательных суперкомплексов и димерной АТФ-синтазы (Ukolova et al., 2020). Эта информация привела к пересмотру имеющихся современных представлений об организации системы ОКСФОС (Wittig, Schägger, 2009; Acín-Pérez, Enríquez, 2014; Miranda-Astudillo et al., 2018) и разработке новой субкомпарментационной оксфосомной модели (см. рис. 1, e).

Модель предполагает существование *in vivo* высокоорганизованных ассоциаций между олигомерными рядами АТФ-синтазы и дыхательными суперкомплексами, которые представляют собой оксфосомные цепочки или «патчи», преимущественно локализованные в кристном субкомпарменте. Такая оксфосомная организация позволяет расширить функциональные возможности системы и значительно увеличить эффективность ее работы. Во-первых, ассоциация олигомерной АТФ-синтазы с дыхательными суперкомплексами дает возможность использовать не только протоны, находящиеся в общей водной фазе межмембранного пространства, но и мембраносвязанные протоны, образующиеся в высокой локальной концентрации в результате работы дыхательных ферментов оксфосом. Во-вторых, такая организация предполагает новые возможности для регуляции активности системы (например, путем перехода открытой, возможно более активной формы оксфосомы в закрытую или посредством изменения соотношения ассоциированных с АТФ-синтазами и свободных суперкомплексов). В-третьих, «заякоренность» дыхательных суперкомплексов на олигомерных рядах АТФ-синтазы может в той или иной степени определять морфологию мембраны. Дальнейшие исследования позволят уточнить и визуализировать надмолекулярную структуру системы ОКСФОС в митохондриях различных изучаемых объектов *in vivo*.

Список литературы / References

Еремеев С.А., Ягузинский Л.С. О локальном сопряжении систем электронного транспорта и синтеза АТФ в митохондриях. Теория и эксперимент. *Биохимия*. 2015;80(5):682-688.
[Eremeev S.A., Yaguzhinsky L.S. On local coupling of electron transport and ATP-synthesis system in mitochondria. Theory and experiment. *Biochemistry (Moscow)*. 2015;80(5):576-581. DOI 10.1134/S0006297915050089.]

Лузиков В.Н. Принципы контроля за формированием структур, осуществляющих дыхательные функции митохондрий. *Ученые биол. химии*. 2009;49:77-106.
[Luzikov V.N. Principles of control over formation of structures responsible for respiratory functions of mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. 2009;74(13):1443-1456. DOI 10.1134/s0006297909130021.]

Солодовникова И.М., Юрков В.И., Тоньшин А.А., Ягузинский Л.С. О локальном сопряжении процессов дыхания и фосфорилирования в митохондриях печени крысы. *Биофизика*. 2004;49(1):47-56.
[Solodovnikova I.M., Iurkov V.L., Ton'shin A.A., Yaguzhinskii L.S. Local coupling of respiration processes and phosphorylation in rat liver mitochondria. *Биофизика = Biophysics*. 2004;49(1):47-56. (in Russian)]

Acín-Pérez R., Enríquez J.A. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1837(4):444-450. DOI 10.1016/j.bbabi.2013.12.009.

Acín-Pérez R., Fernández-Silva P., Peleato M.L., Pérez-Martos A., Enríquez J.A. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell*. 2008;32(4):529-539. DOI 10.1016/j.molcel.2008.10.021.

Allen R.D., Schroeder C.C., Fok A.K. An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J. Cell Biol*. 1989;108(6):2233-2240. DOI 10.1083/jcb.108.6.2233.

Antonenko Y.N., Kovbasnjuk O.N., Yaguzhinsky L.S. Evidence in favor of the existence of a kinetic barrier for proton transfer from a surface of bilayer phospholipid membrane to bulk water. *Biochim. Biophys. Acta*. 1993;1150(1):45-50.

Boyle G.M., Roucou X., Nagley P., Devenish R.J., Prescott M. Identification of subunit g of yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem*. 1999;262(2):315-323. DOI 10.1046/j.1432-1327.1999.00345.x.

Bultema J.B., Braun H.P., Boekema E.J., Kouril R. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1787(1):60-67. DOI 10.1016/j.bbabi.2008.10.010.

Chaban Y., Boekema E.J., Dudkina N.V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014;1837(4):418-426. DOI 10.1016/j.bbabi.2013.10.004.

Chance B., Williams G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem*. 1956;17:65-134. DOI 10.1002/9780470122624.ch2.

Dubinín J., Braun H.P., Schmitz U., Colditz F. The mitochondrial proteome of the model legume *Medicago truncatula*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1814(12):1658-1668. DOI 10.1016/j.bbapap.2011.08.008.

Enríquez J.A. Supramolecular organization of respiratory complexes. *Annu. Rev. Physiol*. 2016;78:533-561. DOI 10.1146/annurev-physiol-021115-105031.

Eubel H., Jansch L., Braun H.P. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol*. 2003;133(1):274-286. DOI 10.1104/pp.103.024620.

Gilkerson R.W., Selker J.M., Capaldi R.A. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*. 2003;546(2-3):355-358. DOI 10.1016/s0014-5793(03)00633-1.

Guigas G., Weiss M. Effects of protein crowding on membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016;1858(10):2441-2450. DOI 10.1016/j.bbamem.2015.12.021.

Hackenbrock C.R., Chazotte B., Gupte S.S. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr*. 1986;18(5):331-368. DOI 10.1007/BF00743010.

Keilin D. Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 1930;106(746):418-444. Available at: <http://www.jstor.org/stable/81448>.

Keilin D., Hartree E. Cytochrome and cytochrome oxidase. *Proc. R. Soc. B*. 1939;127(847):167-191. DOI 10.1098/rspb.1939.0016.

Keilin D., Hartree E.F. Activity of the succinic dehydrogenase-cytochrome system in different tissue preparations. *Biochem. J*. 1949;44(2):205-218. DOI 10.1042/bj0440205.

Krasinskaya I.P., Marshansky V.N., Dragunova S.F., Yaguzhinsky L.S. Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria. *FEBS Lett*. 1984;167(1):176-180. DOI 10.1016/0014-5793(84)80856-x.

Krause F., Reifschneider N.H., Vocke D., Seelert H., Rexroth S., Dencher N.A. "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J. Biol. Chem*. 2004;279(46):48369-48375. DOI 10.1074/jbc.M406085200.

- Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 2019;88:515-549. DOI 10.1146/annurev-biochem-013118-110903.
- Lehninger A. Respiratory-energy transformation. *Rev. Mod. Phys.* 1959;31:136-146. DOI 10.1103/RevModPhys.31.136.
- Lenz G., Genova M.L. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;748:107-144. DOI 10.1007/978-1-4614-3573-0_5.
- Miranda-Astudillo H., Colina-Tenorio L., Jiménez-Suárez A., Vázquez-Acevedo M., Salin B., Giraud M.F., Remacle C., Cardol P., González-Halphen D. Oxidative phosphorylation supercomplexes and respirasome reconstitution of the colorless alga *Polytomella* sp. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2018;1859(6):434-444. DOI 10.1016/j.bbabi.2018.03.004.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961;191:144-148. DOI 10.1038/191144a0.
- Motovilov K.A., Yurkov V.I., Volkov E.M., Yaguzhinsky L.S. Properties and new methods of non-equilibrium membrane bound proton fraction research under conditions of proton pump activation. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* 2009;3(4):478-487. DOI 10.1134/S1990747809040163.
- Nübel E., Wittig I., Kerscher S., Brandt U., Schägger H. Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics.* 2009;9(9):2408-2418. DOI 10.1002/pmic.200800632.
- Peters K., Nießen M., Peterhänsel C., Späth B., Hölzle A., Binder S., Marchfelder A., Braun H.-P. Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 2012;79(3):273-284. DOI 10.1007/s11103-012-9911-4.
- Qiu Z.H., Yu L., Yu C.A. Spin-label electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry studies of the interaction between mitochondrial cytochrome *c* oxidase and adenosine triphosphate synthase complex. *Biochemistry.* 1992;31(12):3297-3302. DOI 10.1021/bi00127a036.
- Rich P.R. A generalised model for the equilibration of quinone pools with their biological donors and acceptors in membrane-bound electron transfer chains. *FEBS Lett.* 1981;130(2):173-178. DOI 10.1016/0014-5793(81)81113-1.
- Saddar S., Dienhart M.K., Stuart R.A. The F₁F₀-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome *bc*₁-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery. *J. Biol. Chem.* 2008;283(11):6677-6686. DOI 10.1074/jbc.M708440200.
- Schägger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002;1555(1-3):154-159. DOI 10.1016/s0005-2728(02)00271-2.
- Schägger H., Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 2000;19(8):1777-1783. DOI 10.1093/emboj/19.8.1777.
- Schlame M. Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2021;1862(1):148305. DOI 10.1016/j.bbabi.2020.148305.
- Skulachev V.P. The localized $\Delta\mu/H^+$ problem. The possible role of the local electric field in ATP synthesis. *FEBS Lett.* 1982;146(1):1-4. DOI 10.1016/0014-5793(82)80692-3.
- Strecker V., Wumaier Z., Wittig I., Schägger H. Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics.* 2010;10(18):3379-3387. DOI 10.1002/pmic.201000343.
- Tu S.L., Okazaki H., Ramirez F., Lam E., Marecek J.F. Mutual regulation between mitochondrial ATPase and respiratory chain activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981;210(1):124-131. DOI 10.1016/0003-9861(81)90172-7.
- Ukolova I.V., Kondakova M.A., Kondratov I.G., Sidorov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2020;1861(11):148264. DOI 10.1016/j.bbabi.2020.148264.
- Vogel F., Bornhövd C., Neupert W., Reichert A.S. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 2006;175(2):237-247. DOI 10.1083/jcb.200605138.
- Vonck J. Supramolecular organization of the respiratory chain. In: Sazanov L. (Ed.). *A Structural Perspective on Respiratory Complex I*. Dordrecht: Springer, 2012;247-277. DOI 10.1007/978-94-007-4138-6_12.
- Williams R.J. Possible functions of chains of catalysts. *J. Theor. Biol.* 1961;1:1-17. DOI 10.1016/0022-5193(61)90023-6.
- Wittig I., Schägger H. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(6):672-680. DOI 10.1016/j.bbabi.2008.12.016.
- Yaguzhinsky L.S., Yurkov V.I., Krasinskaya I.P. On the localized coupling of respiration and phosphorylation in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1757(5-6):408-414. DOI 10.1016/j.bbabi.2006.04.001.

Благодарности. Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01233а.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.07.2021. После доработки 17.09.2021. Принята к публикации 18.09.2021.