МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Дербикова Ксения Сергеевна

Роль белка Aim23p и его концевых удлинений в митохондриальной трансляции у дрожжей

03.01.03 – Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Каменский Пётр Андреевич

Москва – 2019

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4
1. ВВЕДЕНИЕ 6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11
2.1 Общие черты митохондриальной трансляции 11
2.2 Особенности митохондриальных рибосом 15
2.3 Стадия инициации трансляции 18
2.4 Факторы инициации митохондриальной трансляции 21
2.5 Третий фактор инициации трансляции 23
2.6 IF3mt млекопитающих 25
2.7 N- и C-концевые удлинения IF3mt млекопитающих 31
2.8 Особенности трансляции в митохондриях дрожжей 35
2.9 Aim23p как третий фактор инициации трансляции митохондрий дрожжей 41
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 44
3.1 Материалы 44
3.1.1 Оборудование 44
3.1.2 Растворы 45
3.1.3 Коммерческие наборы 47
3.1.4 Штаммы 47
3.1.5 Плазмиды 48
3.1.6 Антибиотики 48
3.1.7 Эндонуклеазы рестриктазы 48
3.1.8 Питательные среды 48
3.1.9 Программные обеспечения 49
3.1.10 Олигонуклеотиды 49
3.2 Методы 53
3.2.1 Споруляция и деление тетрад 53
3.2.2 Химическая трансформация *S. cerevisiae* плазмидной ДНК 53
3.2.3 Дизрупция гена в клетках *S. cerevisiae* 53
3.2.4 Выделение митохондрий *S. cerevisiae* для получения митохондриальной РНК 54
3.2.5 Выделение РНК из митохондрий 54
3.2.6 Нозерн-блот гибридизация 55
3.2.7 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 55
3.2.8 Перекрестная ПЦР («overlap extension») 56
3.2.9 Очистка фрагментов ДНК после ПЦР 57
3.2.10 Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле в нативных условиях 57
3.2.11 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля 58

3.2.12 Переосаждение ДНК этиловым спиртом 58
3.2.13 Разрезание ДНК эндонуклеазами рестрикции и лигирование 58
3.2.14 Химическая трансформация *E. coli* 58
3.2.15 Электропорация клеток *E. coli* 59
3.2.16 Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* 59
3.2.17 Подготовка штаммов дрожжей к скринингу 59
3.2.18 Анализ роста дрожжей на селективных твердых средах 60
3.2.19 Подготовка клеточных лизатов к Вестерн-блот анализу 60
3.2.20 Выделение митохондрий *S. cerevisiae* для получения митохондриальных белков 60
3.2.21 Подготовка митохондриальных белков к Вестерн-блот анализу 61
3.2.22 Вестерн-блот анализ 61
3.2.23 Дизрупция гена IF3 в клетках *E. coli* 62
3.2.24 Скрининг и штаммов после дизрупции и трансдукции 62
3.2.25 Получение лизата P1 62
3.2.26 Трансдукция 62
3.2.27 Скрининг клонов 63
3.2.28 Получение рекомбинантных белков 63
3.2.29 Связывание факторов с рибосомой *E. coli* 63
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ 64
4.1 Разбалансировка трансляции при делеции Aim23p не связана с процессом транскрипции 64
4.2 Для функционирования Aim23p необходимо наличие хотя бы одного концевого удлинения фактора 67
4.3 Человеческий mtIF3 активен в митохондриях дрожжей вне зависимости от наличия концевых участков 72
4.4 IF3 *E. coli* с концевыми участками Aim23p выполняет роль третьего фактора инициации митохондриальной трансляции в клетках дрожжей 75
4.5 Aim23p ингибирует рост *E. coli* 77
4.6 Aim23p взаимодействует с рибосомами *E. coli* неканоническим образом 83
5. ВЫВОДЫ 86
6. БЛАГОДАРНОСТИ 87
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 88

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Δ - делеция;

AcONa – sodium acetate, ацетат натрия;

ATP – adenosine triphosphate, аденозинтрифосфат;

CAT – chloramphenicol acetyltransferase, кассета устойчивости к хлорамфениколу;

COB – cytochrome b, цитохром b;

COX – cytochrome oxidase, цитохромоксидаза;

CSM – complete suplement mixture, полная синтетическая основа для дрожжей;

CTD – C-terminal domain, С-концевой домен;

DMSO – dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид;

DTT – dithiothreitol, дитиотреитол;

FGRB – formaldehyde gel-running buffer, буфер для электрофореза;

fMet-tRNA – формилметионил-тРНК;

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;

IF1 – initiation factor 1, фактор инициации 1;

IF2 – initiation factor 2, фактор инициации 2;

IF2mt – mitochondrial initiation factor 2, митохондриальный фактор инициации 2;

IF3 – initiation factor 3, фактор инициации 3;

IF3mt – mitochondrial initiation factor 3, митохондриальный фактор инициации 3;

Ig – immunoglobulin, иммуноглобулин;

IPTG – isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид;

KanMX4 – kanamycin-resistance module, кассета, кодирующая ген устойчивости к генетицину;

LiAc – lithium acetate, ацетат лития;

$Mg(OAc)_2$ – magnesium acetate, ацетат магния;

MOPS – 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота;

MTS – mitochondrial targeting signal, сигнал митохондриального импорта;

NTD – N-terminal domain, N-концевой домен;

OE-PCR – overlap extension PCR, перекрестная ПЦР;

PBS - phosphate buffered saline, фосфатный буфер;

PEG – polyethylene glycol, полиэтиленгликоль;

PIPES – piperazine-N,N′-bis(2-ethanesulfonic acid), пиперазин-1,4-bis(2-этансульфоновая кислота);

PMSF – phenylmethanesulfonylfluoride, фенилметилсульфонилфторид;

RRF – ribosome-release factor, фактор терминации трансляции;

rpm – revolutions per minute, обороты в минуту;

SDS – sodium dodecylsulfate, додецилсульфат натрия ;

SSC – saline-sodium citrate, солевой раствор цитрата натрия;

TBE – Tris-borate-EDTA, Трис-борат-ЭДТА;

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethane, трис(гидроксиметил)аминометан;

TS – transfer solution, буфер для переноса;

WT – wild type, дикий тип;

YNB – yeast nitrogen base, дрожжевая азотистая основа;

АТФ – аденозинтрифосфат;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

БСР – большая субъединица рибосомы;

ГТФ – гуанидинтрифосфат;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

МСР – малая субъединица рибосомы;

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота;

НТО – нетранслируемая область;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота;

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота;

ТТФ – тимидинтрифосфат;

ЦТФ – цитидинтрифосфат;

ЭГТА – этилендиокси-бис-(этиленнитрило)тетрауксусная кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Митохондрии присутствуют практически во всех эукариотических клетках и являются мультифункциональными органеллами. Основной функцией митохондрий является синтез молекул АТФ путем окислительного фосфорилирования, однако, они также принимают участие и в других клеточных процессах, таких как метаболизм жирных кислот, синтез железо-серных кластеров, апоптоз (см. обзоры Green and Reed, 1998; Kroemer et al, 1998).

Митохондрии содержат собственный геном и характеризуются наличием всех необходимых компонентов аппарата экспрессии генов. Митохондриальная система трансляции сходна с бактериальной, однако имеет множество особенностей и эволюционирует независимо у разных групп организмов, что приводит к возникновению множества специфических черт. Несмотря на значительную вариабельность аппаратов трансляции, изменения имеют общие тенденции, в связи с чем в ходе эволюционного процесса независимо у разных организмов возникли сходные свойства системы. Адаптационные изменения претерпели различные элементы аппарата синтеза белка, в частности, белковые факторы трансляции, одному из которых (третьему фактору инициации, IF3mt) и посвящена настоящая работа.

Исследование трансляционного аппарата крайне важно с медицинской точки зрения. Нарушения системы реализации митохондриально-закодированной генетической информации являются одной из причин развития некоторых серьезных патологий человека, в частности, болезней Паркинсона и Альцгеймера. Кроме того, антибиотики, блокирующие бактериальную трансляцию, могут вызывать побочные эффекты в митохондриях, которым особенно подвержены люди со слабо патогенными или даже не проявляющимися фенотипически мутациями в генах митохондриальных белков. Детальное исследование особенностей отдельных элементов аппарата митохондриальной трансляции позволит моделировать лекарства, улучшающие митохондриальную функцию, а также разрабатывать антибиотики, не оказывающие влияние на работу митохондрий.

Степень разработанности темы. Третий фактор инициации трансляции бактерий (IF3) состоит из двух доменов, соединенных линкером. Для митохондриальных факторов (IF3mt) различных организмов показано наличие дополнительных N- и C-концевых удлинений, которые характерны не только для митохондриальных белков, но и для факторов хлоропластов (Yu and Spremulli, 1998). Согласно существующей теории, концевые удлинения фактора возникли в ходе эволюционного процесса как результат адаптации к изменяющейся системе трансляции. Был проведен ряд исследований роли

концевых удлинений IF3mt *in vitro*, тогда как изучение их роли в функционировании митохондрий *in vivo* вызывает ряд сложностей. Наиболее удобным объектом изучения митохондриальной трансляции являются дрожжи *S. cerevisiae* в связи с их способностью расти на средах со сбраживаемыми источниками углерода без функционально активных митохондрий.

В 2012 году сотрудниками нашей лаборатории был найден и охарактеризован третий фактор инициации митохондриальной трансляции *S. cerevisiae*, белок Aim23p. Согласно результатам компьютерного моделирования, дрожжевой фактор устроен по классической для митохондриальных факторов схеме, и также содержит дополнительные N- и C-удлинения. Современные методы позволяют провести анализ этих регионов *in vivo*.

Цель работы: анализ роли белка Aim23p в работе дрожжевых митохондрий, а также оценка вклада концевых удлинений данного белка в его функциональную активность.

Задачи работы:

1. Проанализировать влияние делеции концевых удлинений Aim23p на фенотип дрожжей;
2. Проверить способность человеческого IF3mt функционально заменять Aim23p в *S. cerevisiae*;
3. Оценить способность концевых удлинений Aim23p усиливать функциональную активность IF3 *E. coli* в клетках дрожжей;
4. Оценить способность Aim23p функционально заменять IF3 в клетках *E. coli*.

Научная новизна. В диссертационной работе впервые продемонстрирована роль концевых удлинений Aim23p *in vivo*. Согласно проведенным исследованиям, для функционирования дрожжевого фактора в митохондриях *S. cerevisiae* необходимо наличие хотя бы одного концевого участка. При этом человеческий IF3mt проявляет активность в данной системе вне зависимости от наличия у него концевых регионов.

Было показано, что бактериальный IF3 способен функционально заменять Aim23p в клетках дрожжей при добавлении к нему концевых удлинений митохондриального фактора. Данная модификация делает белок структурно схожим с IF3mt. Вопреки ожиданиям, делеция концевых регионов Aim23p не привела к повышению активности фактора в клетках *E. coli*. В ходе экспериментов *in vitro* продемонстрировано связывание Aim23p не только с малой субъединицей рибосомы, но и с целой органеллой, что не характерно для белков данной группы. Таким образом, митохондриальный фактор препятствует нормальному протеканию процесса трансляции и вызывает снижение скорости роста бактерий.

Продемонстрировано, что разбалансировка синтеза закодированных в митохондриях белков, связанная с делецией Aim23p, проявляется на стадии трансляции.

Научная и практическая значимость. Полученные данные вносят важный вклад в раскрытие особенностей функционирования аппарата трансляции в митохондриях, а также позволяют проанализировать эволюционную значимость адаптационных преобразований компонентов трансляционной системы. Полученные данные могут быть использованы в фундаментальных исследованиях, а также при разработке ряда лекарственных средств.

Личный вклад автора. Соискатель самостоятельно проанализировал литературу по теме исследования, спланировал и провёл все эксперименты, описанные в работе, обработал полученные данные и написал диссертационную работу. Автор принимал участие в подготовке статей к публикации и представлял результаты исследования на научных конференциях.

Методология и методы исследования. Исследования выполнены с использованием современных методов молекулярной биологии и микробиологии в системах *in vitro* и *in vivo*. При создании экспериментальных штаммов *E. coli* и *S. cerevisiae* использовались методы генной инженерии, анализ роста проводился на различных селективных питательных средах. Анализ состава белков и РНК проводили с помощью методов Вестерн- и Нозерн-блот гибридизации. Для экспериментов *in vitro* были созданы рекомбинантные факторы инициации трансляции. Работа выполнена с использованием современного оборудования.

Положения, выносимые на защиту

1. Роль Aim23p в клетках дрожжей отличается от классической функции третьего фактора инициации трансляции. Вероятно, данный белок может выступать не только как IF3mt *S. cerevisiae*, но и как мРНК-специфический трансляционный фактор, в связи с чем его отсутствие приводит к изменению эффективности трансляции отдельных видов мРНК;

2. Концевые удлинения играют ключевую роль в функционировании Aim23p. Делеция концевых регионов приводит к снижению активности фактора в митохондриях, тогда как добавление данных участков к IF3 *E. coli* позволяет ему функционально заменять Aim23p в клетках дрожжей;

3. Особенности структуры человеческого IF3mt позволяют ему вне зависимости от наличия у него концевых удлинений функционально заменять Aim23p. При делеции концевых участков белок сохраняет активность в митохондриях *S. cerevisiae*;

4. Aim23p не способен выполнять роль IF3 в клетках бактерий. При делеции концевых участков белок не проявляет никакой активности в *E. coli*, тогда как полноразмерный фактор препятствует нормальному протеканию процесса трансляции за счет стабилизации целой рибосомы.

Степень достоверности и апробация результатов. Все эксперименты были проведены минимум в трех биологических повторностях, где была продемонстрирована их воспроизводимость. По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Результаты работы были доложены на шести российских и международных научных конференциях.

Список статей, опубликованных по теме диссертации

1. **Derbikova K**, Kuzmenko A, Levitskii S, Klimontova M, Chicherin I, Baleva M, Krasheninnikov I, Kamenski P (2018) Biological and evolutionary significance of terminal extensions of mitochondrial translation initiation factor 3. *Int J Mol Sci.* **19**, № 3861;

2. Levitskii S, **Derbikova K**, Baleva MV, Kuzmenko A, Golovin AV, Chicherin I, Krasheninnikov IA, Kamenski P (2018) 60S dynamic state of bacterial ribosome is fixed by yeast mitochondrial initiation factor 3. *PeerJ* **6**: 5620;

3. **Derbikova KS**, Levitskii SA, Chicherin IV, Vinogradova EN, Kamenski PA (2018) Activation of yeast mitochondrial translation: who is in charge? *Biochemistry (Mosc),* **83**:87-97;

4. Kuzmenko A, **Derbikova K,** Salvatori R, Tankov S, Atkinson GC, Tenson T, Ott M, Kamenski P, Hauryliuk V (2016) Aim-less translation: loss of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation initiation factor mIF3/Aim23 leads to unbalanced protein synthesis. *Sci Rep* **6**:18749.

Материалы конференций

1. **Дербикова К.С.**, Кузьменко А.В., Левицкий С.А., Климонтова М.В., Каменский П.А., 2018. Функциональная значимость концевых участков IF3mt в трансляционных системах различных организмов. Тезисы докладов 22-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», с. 116;

2. **Дербикова К.С.**, Левицкий С.А., Кузьменко А.В., Климонтова М.В., Каменский П.А., 2017. Эволюционная роль концевых участков третьего фактора инициации трансляции митохондрий дрожжей *S. cerevisiae*. Тезисы докладов международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Москва, ИБХ РАН, 18–22 сентября 2017), с. 49;

3. **Дербикова К.С.**, Кузьменко А.В., Климонтова М.В., Каменский П.А., 2017. Функциональная заменяемость третьего фактора инициации трансляции в дрожжевой митохондриальной и бактериальной системах. Тезисы докладов 21-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», с. 94-95;

4. **Derbikova K.**, Kuzmenko A., Klimontova M., Kamenski P., 2016. Role of N- and C-terminal extensions of yeast mtIF3 on its activity *in vivo*. Тезисы докладов конференции «7th World congress on targeting mitochondria», p. 102;

5. **Дербикова К.С.**, Кузьменко А.В., Климонтова М.В., Каменский П.А., 2016. Влияние N- и С-концевых участков дрожжевого mtIF3 на функциональную активность фактора *in vivo*. Тезисы докладов 20-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века», с. 115.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Общие черты митохондриальной трансляции

Согласно эндосимбиотической теории, митохондрии произошли от древней свободноживущей α-протеобактерии (Gray et al, 2001) и присутствовали у последнего общего предка всех эукариот (Embley and Martin, 2006). Эволюция митохондрий происходит у разных видов независимо, что привело к появлению большого разнообразия типов организации митохондриальной ДНК, а также аппарата реализации генетической информации.

За многие миллионы лет эволюции большинство генов органеллы были перенесены в ядерный геном. Если геном α-протеобактерии содержит более 3600 генов, то митогеном человека кодирует всего лишь 13 полипептидов (Nierman et al, 2001). Синтез ядерно-закодированных генов осуществляется в цитоплазме, а затем готовые белки импортируются внутрь органеллы (Bjorkholm et al, 2015). Ядерное расположение большинства генов дает ряд преимуществ, среди которых участие в процессе рекомбинации при формировании половых клеток, а также отсутствие влияния большого количества активных форм кислорода, образующихся в процессе работы митохондрий. Тем не менее, в митохондриях всех известных организмов сохранилась собственная ДНК (мтДНК), кодирующая небольшое количество белков, а также некоторые РНК, и ее размер зависит от конкретного вида. Например, митохондриальный геном человека состоит из 16569 нуклеотидов и содержит информацию о 13 полипептидах, 2 рРНК и 22 тРНК (Anderson et al, 1981). Размер митохондриальной ДНК, в зависимости от вида, может варьировать от 6 до 2400 кб, а количество молекул может быть от нескольких единиц до многих тысяч копий. В митохондриальной ДНК разных организмов обнаружено различное количество генов, от 100 у представителей порядка *Jakobida* до всего лишь нескольких у паразитических протистов (Burger et al, 2003). В целом эволюция направлена на снижение количества закодированных в митохондриальной ДНК генов, однако корреляция между длиной генома и их количеством не прослеживается в связи с варьирующей длиной межгенных участков (Burger et al, 2003). Для примера, размер дрожжевой мтДНК примерно в 4,5 раз превышает размер мтДНК человека, но при этом кодирует на пять белков меньше. Эволюция митохондриального генома происходит быстро и непрерывно, что обуславливается высокой скоростью возникновения мутаций. Частота мутаций в митогеноме примерно в 45 раз выше, чем в человеческих аутосомах (Fu et al, 2014).

Существует несколько гипотез, объясняющих, почему некоторые гены все же сохранились в митохондриальном геноме, ведь наличие двух систем реализации генетической информации требует дополнительных затрат. Так, для поддержания митохондриальной генетической системы дрожжей необходимо около 250 белков, большинство из которых импортируются в органеллу (Sickmann et al, 2003; Andreoli et al, 2004; Chacinska et al, 2009; Neupert, 2015). Согласно одной из гипотез, в случае, если бы сохранившиеся в митохондриях белки были бы закодированы в ядерном геноме, их импорт был бы затруднен, поскольку большинство из них являются гидрофобными белками, входящими в состав электрон-транспортных цепей (von Heijne G., 1986; Bjorkholm et al, 2015). Это было подтверждено для белков Cytb и Cox1p, гены которых присутствуют во всех известных на данный момент геномах митохондрий (Claros et al, 1995). Аналогичные данные были получены и для гена *ATP9* дрожжей, кодирующего субъединицу *9/c* АТФ-синтетазы, белок Atp9p. При добавлении к белку сигнала импорта в митохондрии Atp9p пересекал внешнюю мембрану митохондрий, но не мог пересечь внутреннюю, в связи с чем подвергался деградации в межмембранном пространстве (Bietenhader et al, 2012). Однако следует отметить, что искусственный импорт в митохондрии некоторых молекул, в норме синтезируемых в органелле, возможен, и даже используется при разработке методов генной терапии супрессии мутаций в мтДНК (Patrushev et al, 2014). Например, было показано, что при переносе в ядро гена, кодирующего Atp8p субъединицу АТФ-синтетазы *S. cerevisiae*, осуществляется восстановление дыхательной функции дрожжей при условии наличия у белка искусственно добавленного сигнала импорта в митохондрии (Nagley et al, 1988). Другие же белки, например, цитохром *b*, не удалось импортировать, что говорит о наличии некоторых барьеров для функциональной релокации этого гена (Supekova et al, 2010).

У ряда организмов некоторые гены могут быть обнаружены в ядре, тогда как у других они закодированы в мтДНК. Так, дрожжевой ген *ATP9* расположен в митохондриях, тогда как у ряда нитчатых грибов и у большинства животных он закодирован в ядерном геноме (Déquard-Chablat et al, 2011; Bietenhader et al, 2012). При этом в некоторых случаях белок может быть закодирован более чем одним геном, как в случае генов *PaAtp9-5* и *PaAtp9-7,* кодирующих две копии субъединицы 9 АТФ-синтетазы у гриба *Podospora anserina* (Déquard-Chablat et al, 2011). Аналогичная субъединица у *Neurospora crassa* также кодируется двумя генами, однако один из них располагается в мтДНК, тогда как второй закодирован в ядре (Bittner-Eddy et al, 1994). Для ряда таких белков показано снижение степени гидрофобности закодированных в ядре полипептидов по сравнению с митохондриально-закодированными аналогами. Например, субъединица 6

АТФ-синтетазы содержит пять мембран-связывающих сегментов, тогда как у видов, обладающих ядерно-закодированным геном *ATP6*, первые три трансмембранных сегмента гораздо менее гидрофобны (Funes et al, 2002). Аналогичная тенденция прослеживается и для 9-й субъединицы АТФ-синтетазы (Bietenhader et al, 2012). Таким образом, данная модификация необходима при переносе митохондриального гена в ядерный геном.

Локализация митохондриальных генов непосредственно в органелле позволяет осуществлять быстрое изменение уровня экспрессии гена в ответ на изменения состояния митохондрии (Allen, 2003; Bietenhader et al, 2012). Однако существует гипотеза, согласно которой перенос генов из митохондрий в ядро продолжается по сей день (Palmer, 1997).

На митохондриальных рибосомах (миторибосомах) синтезируются коровые белки комплексов дыхательной цепи. Данные белки относятся к классу трансмембранных, поэтому параллельно с их синтезом на миторибосомах происходит их ко-трансляционное встраивание во внутреннюю мембрану органеллы. Трансляция тесно сопряжена с процессами сборки данных комплексов, формирование которых требует также поступления в митохондрию компонентов, закодированных в ядре. Неудивительно, что весь процесс синтеза, доставки и сборки компонентов дыхательных комплексов требует тонкой регуляции во времени и пространстве. Например, синтез митохондриально-закодированных компонентов Fo-комплекса АТФ-синтетазы, белков Atp6 и Atp8, стимулируется субкомплексом F1, состоящим из закодированных в ядре субъединиц. Таким образом осуществляется адаптация уровня экспрессии закодированных в органелле компонентов АТФ-синтетазы к количеству субъединиц, синтезированных в цитоплазме (Herrmann et al, 2013). Нарушения в координации синтеза входящих в состав комплексов белков могут приводить к накоплению промежуточных продуктов и повышению количества губительных для клетки активных форм кислорода (Khalimonchuk et al, 2007).

Для реализации генетической информации, закодированной в митохондриальном геноме, необходимо наличие в органелле собственных систем репликации, транскрипции и трансляции. В митогеноме закодирована часть компонентов аппарата трансляции, такие как рРНК и тРНК, однако их недостаточно для создания полноценной системы. Остальные компоненты закодированы в ядерном геноме и импортируются внутрь митохондрии. Долгое время считалось, что митохондриальная система трансляции устроена по бактериальному типу, однако исследования последних лет показали, что хотя общая схема организации действительно напоминает бактериальную, все же митохондриальный трансляционный аппарат имеет множество особенностей. В связи с наличием в митохондриальном геноме всего лишь нескольких генов, в большинстве своем кодирующих гидрофобные компоненты электронтранспортной цепи, система экспрессии

митохондриальных генов адаптировалась под специфические нужды. Это привело к более высокой специализации систем по сравнению с бактериальными или эукариотическими цитоплазматическими.

Одной из отличительных черт митохондриальной системы трансляции является отклонение от стандартного генетического кода (Barrell et al, 1979; Cantara et al, 2013). Так, у дрожжей кодоны, начинающиеся с пары нуклеотидов ЦУ, кодируют аминокислоту треонин вместо лейцина (Osawa et al, 1992). В митохондриях довольно часто обнаруживаются альтернативные стартовые кодоны, например, в человеческих митохондриях в качестве стартовых используются кодоны АУУ и АУА (Fearnley and Walker, 1987). Что же касается стоп-кодонов, раньше предполагалось, что их последовательность отличается от классической, и в качестве терминирующих могут выступать кодоны АГГ и АГА. Однако позже было показано, что в данном случает при трансляции осуществляется сдвиг рамки на один нуклеотид, что приводит к остановке рибосомы на стандартном АУГ-кодоне (Temperley et al, 2010a).

Матричные РНК митохондрий различных организмов могут сильно различаться по своим параметрам. Например, мРНК пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* содержат длинные нетранслируемые участки (НТО), размер которых может составлять от нескольких десятков до нескольких сотен нуклеотидов. Они являются мишенями для связывания белковых активаторов трансляции, регулирующих экспрессию каждой отдельной мРНК. При этом дрожжевые молекулы лишены полиаденинoвых последовательностей на 3'-концах (Temperley et al, 2010b; Groot et al, 1974). Человеческие мРНК, напротив, полиаденилированы, тогда как длинные НТО у них отсутствуют, максимальная длина 5`-НТО составляет всего 3 нуклеотида (Herrmann et al, 2013; Montoya et al, 1981). Все митохондриальные мРНК, в отличие от бактериальных, лишены последовательности Шайна-Дальгарно, однако вместо нее может присутствовать альтернативная консенсусная последовательность, узнаваемая рибосомой. Например, в митохондриях человека из одиннадцати открытых рамок считывания полностью лишены лидерной последовательности восемь (Montoya et al, 1981). При этом было показано, что добавление нуклеотидов перед рамкой считывания снижает эффективность инициации. Распознавание стартового кодона осуществляется главным образом за счет кодон-антикодонового взаимодействия мРНК и инициаторной тРНК, и связывание рибосомы с безлидерной мРНК стимулируется фактором IF2mt, тогда как бактериальный фактор, напротив, в некоторых случаях препятствует такому взаимодействию (Christian and Spremulli, 2010; Tedin et al, 1999). В усилении связывания с лишенной лидерной последовательности мРНК принимает участие и фактор IF3mt (Christian and Spremulli,

2010). В митохондриях млекопитающих в качестве стартового выбирается ближайший к 5`-концу АУГ кодон (Christian and Spremulli, 2010), что возможно в связи с отсутствием вторичной структуры вокруг старт-кодона, препятствующей его распознаванию инициаторным комплексом (Jones et al, 2008). Некоторые митохондриальные мРНК могут содержать в своем составе интроны. Например, гены дрожжевых белков *COB* и *COX1* содержат до пяти и семи интронов соответственно, и данная особенность является видоспецифичной. В их удалении принимают участие как ядерно-, так и митохондриально-закодированные компоненты (Lipinski et al, 2010).

Количество видов тРНК в митохондриях, как правило, снижено, и каждая молекула способна распознавать несколько кодонов. Так, процесс трансляции в человеческих митохондриях протекает с участием 22 видов тРНК, при этом специализированная инициаторная тРНК отсутствует (Anderson et al, 1981). Обычно эти молекулы короче стандартных цитоплазматических (Suzuki and Nagao, 2011). Большинство митохондриальных тРНК формируют классическую вторичную структуру в виде листа клевера, однако, среди них встречаются и короткие модифицированные молекулы (Juhling et al, 2012; Wende et al, 2014). Количество контактов тРНК с миторибосомой у млекопитающих также снижено по сравнению с бактериальными (Brown et al, 2014). Подобные изменения требуют также эволюционных адаптаций других компонентов системы, в частности, аминоацил-тРНК-синтетаз (Chimnaronk et al, 2005). Некоторые тРНК претерпевают ряд модификаций. Например, для эффективной трансляции у дрожжей необходима модификация молекул, распознающих кодоны глутамина, глутамата и лизина белками Mss1, Mto1 и Mto2. Помимо митохондриальных тРНК в митохондриях различных организмов могут функционировать и цитоплазматические тРНК, импортирующиеся внутрь органеллы (Kamenski et al, 2007; Schneider, 2011).

2.2 Особенности митохондриальных рибосом

Структуру миторибосом с хорошим разрешением не удавалось получить долгое время. В первую очередь это связано с тем, что миторибосомы ассоциированы с внутренней мембраной органеллы, что существенно затрудняет получение кристаллов. Однако развитие криоэлектронной микроскопии позволило получить достаточно данных для создания трехмерных моделей миторибосом дрожжей (*S. cerevisiae*) и млекопитающих (*Sus scrofa*). Согласно полученным данным, существуют значительные различия между митохондриальными и бактериальными рибосомами. Более того, были обнаружены

значительные структурные вариации в организации миторибосом у разных групп организмов (Amunts et al, 2015; Desai et al, 2017; Greber et al, 2015) (Рис. 1).

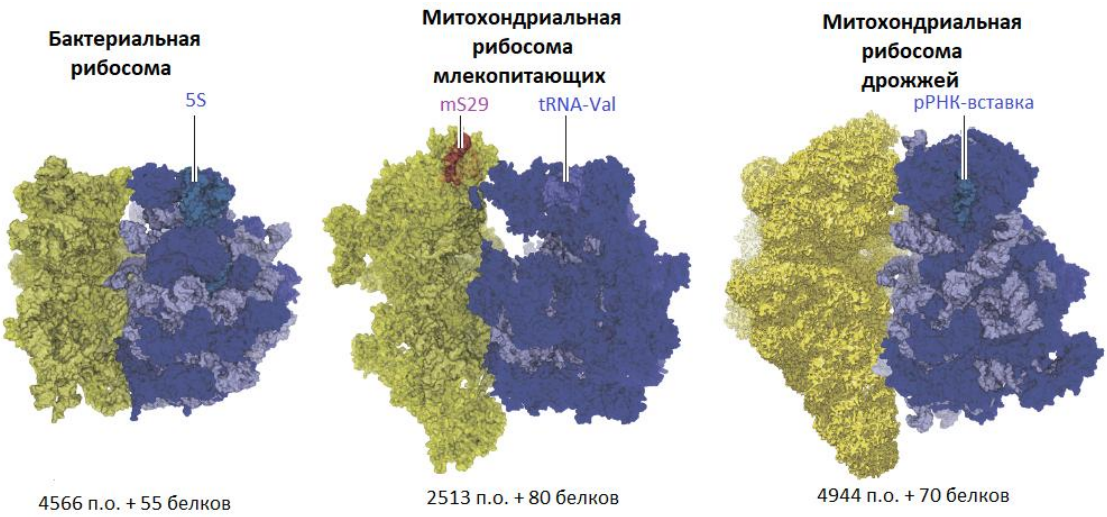

Рисунок 1. Сравнение структур бактериальной и митохондриальных рибосом. На рисунке желтым цветом обозначена малая субъединица рибосомы. Белки и рРНК большой субъединицы окрашены в фиолетовый и бледно-фиолетовый цвет соответственно. Отдельно отмечены 5S рРНК бактериальной рибосомы и заменяющие ее регионы митохондриальных рибосом (валиновая тРНК в случае миторибосом млекопитающих и рРНК-вставка в дрожжевой органелле). Красным цветом показана ГТФаза миторибосомы млекопитающих (mS29), расположенная в межсубъединичном пространстве (Ott et al, 2016).

Митохондриальные рибосомы, как и классические про- и эукариотические, включают в себя две субъединицы, большую (БСР) и малую (МСР), и состоят из РНК и белков. Однако соотношение этих молекул в органелле отличается от цитоплазматических. Для миторибосом характерно значительное увеличение количества белка по отношению к молекулам РНК - если для бактерий соотношение РНК : белок составляет 2:1, то у миторибосом млекопитающих, наоборот, белка в два раза больше, чем РНК (Amunts et al, 2015). Так, БСР бактерий включает в себя 34 белка, тогда как в больших субъединицах миторибосом дрожжей и млекопитающих их 46 и 53 соответственно. В миторибосомах некоторых организмов обнаружены дополнительные фрагменты РНК, не свойственные бактериальным рибосомам (Desai et al, 2017). Однако часто в органелле, напротив, утеряны отдельные фрагменты рРНК, и их отсутствие может стабилизироваться дополнительными фрагментами белков или же новыми специфическими митохондриальными белками, гомологи которых среди белков бактериальных рибосом не обнаружены. Например, в миторибосомах дрожжей и млекопитающих обнаружен специфический митохондриальный белок mL44, относящийся

к семейству рибонуклеаз III группы РНК-связывающих белков. В дрожжевых миторибосомах этот белок связывается с 5`-удлинением рРНК БСР. В рибосомах млекопитающих подобное удлинение отсутствует, однако, mL44 также обнаружен в аналогичном регионе органеллы, где он закрепляется за счет белок-белковых взаимодействий (Amunts et al, 2014). Среди специфических белков миторибосом встречаются гомологи белков, выполняющие различные функции, такие как связывание липидов (например, дрожжевой белок mL50) или оксидоредуктазы (человеческий mL42). Эти белки лишились своих каталитических и лиганд-связывающих центров, за исключением человеческой ГТФазы mS29 (Amunts et al, 2014; Amunts et al, 2015; Greber et al, 2015). Таким образом, дополнительные белки миторибосомы могли попасть в органеллу извне, и уже вторично лишиться своих функциональных центров (Ott et al, 2016).

Митохондриальные рибосомы различных организмов довольно сильно варьируют по размеру и коэффициенту седиментации и отличаются как от бактериальных 70S, так и эукариотических 80S рибосом. Для млекопитающих характерны миторибосомы с коэффициентом седиментации 55S, а для почкующихся дрожжей - 74S (Borst and Grivell,1971; O`Brien, 1971), при этом размер органелл млекопитающих больше бактериальных. Низкие коэффициенты седиментации связаны с пористостью митохондриальных рибосом, вызванной делецией отдельных фрагментов рРНК (Agrawal and Sharma, 2012, Sharma et al, 2003). В БСР миторибосом, за исключением растительных (Leaver and Harmey, 1976), отсутствует 5S рРНК, и частично ее отсутствие в человеческих миторибосомах компенсирует расположенная в этом участке валиновая тРНК, а в миторибосоме свиньи – фенилаланиновая (Brown et al, 2014; Greber et al, 2014a). Вероятно, в связи с тем, что их гены расположены в митогеноме в непосредственной близости от гена, кодирующего рРНК малой субъединицы, эти два гена котранскрибируются (Anderson et al, 1981). В дрожжевых миторибосомах отсутствие 5S рРНК компенсируется наличием специального выступа рРНК, вокруг которого формируется центральный протуберанец. В митохондриях дрожжей есть и другие дополнительные достаточно подвижные выросты рРНК, роль которых на данный момент не изучена.

Как уже отмечалось выше, трансляция в миторибосомах сопряжена с котрансляционным встраиванием новосинтезированного белка в мембрану митохондрии, что требует взаимодействия рибосом с мембраной и соответствующих модификаций органеллы. Довольно сильным изменениям подвергся туннель, через который осуществляется выход растущего полипептида, при этом различается он и в митохондриях

различных организмов. На цитоплазматических рибосомах синтезируется множество различных белков, что приводит к необходимости создания универсального туннеля для выведения растущих полипептидов различных типов. В случае же митохондрий в органелле синтезируется небольшое количество белков, большинство из которых локализуется во внутренней мембране. В связи с этим становится возможным модифицировать рибосомный туннель для облегчения синтеза гидрофобных полипептидов и их котрансляционного встраивания в мембрану (Ott and Herrmann, 2010). Внутренняя поверхность миторибосомного туннеля частично выстлана белками, в которых на поверхность выступают гидрофобные аминокислоты, образующие специфические контакты с растущим полипептидом, более близкие к условиям локализации мембранных белков (Brown et al, 2014). В миторибосомах дрожжей выход туннеля располагается в стороне от классического бактериального, и регионы вокруг туннеля выступают в качестве платформы для связывания факторов, облегчающих встраивание растущего пептида в мембрану органеллы (Pfeffer et al, 2015). Дрожжевой мембранный белок Mba1p является посредником между растущим пептидом и аппаратом интеграции в мембрану (Ott et al, 2006). В миторибосомах млекопитающих за взаимодействие с мембраной отвечает гомолог Mba1p, белок mL45, расположенный рядом с выходом туннеля (Greber et al, 2014b). Своим С-концом этот специфический митохондриальный белок заякоривается во внутренней мембране органеллы. На внутренней мембране располагаются и другие белки, облегчающие взаимодействие миторибосом с мембранами, в частности, инсертаза Oxa1 и белок Mdm38 (Hell et al, 2001; Jia et al, 2003; Frazier et al, 2006). Идентифицированы и дополнительные точки контакта миторибосомы с мембраной, в том числе, и среди РНК-регионов (Pfeffer et al, 2015). Помимо гидрофобных компонентов электрон-транспортной цепи, на миторибосомах *S. cerevisiae* синтезируется растворимый белок Var1p, что требует соответствующих адаптаций трансляционной машины. И, вероятно, данному требованию отвечает перенаправленный выходной канал большой субъединицы дрожжевой миторибосомы (Amunts et al, 2014).

Несмотря на различия в структуре рибосом, пептидил-трансферазный и декодирующий центры образованы консервативными последовательностями и лишены специфических митохондриальных элементов.

2.3 Стадия инициации трансляции

Трансляция включает в себя четыре стадии: инициацию, элонгацию, терминацию и рециклинг, каждая из которых протекает с участием специфических белковых факторов.

Инициация трансляции является одной из наиболее тонко регулируемых стадий процесса биосинтеза белка и служит главной мишенью для многих регуляторных механизмов, в связи с чем представляет особый интерес для ученых.

Процесс инициации трансляции включает в себя селекцию и правильное позиционирование в Р-сайте рибосомы стартового кодона и инициаторной тРНК (fMet-tRNA). При этом формируется преинициаторный комплекс, состоящий из МСР, факторов инициации и инициаторной тРНК, спаренной со стартовым кодоном мРНК. Регион инициации определяется наличием инициаторного кодона, а также его контекстом в мРНК. Наиболее важную роль у бактерий играет последовательность Шайна-Дальгарно, расположенная выше стартового кодона в 5`-НТО.

В бактериях процесс осуществляется с участием трех факторов инициации: IF1, IF2 и IF3.

Фактор IF1 состоит из 71 аминокислоты и формирует структуру β-бочки, состоящей из пяти тяжей, что по своей форме напоминает некоторые другие белки, среди которых нуклеаза стафилококка и белки холодового шока CspA and CspB (Sette et al, 1997). Тяжи 3 и 4 соединены нетипично подвижной для бочки петлёй. Часть схожих по структуре белков взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, что характерно и для IF1.

Фактор IF2 *E. coli* представляет собой белок размером 97 кДа и состоит из шести доменов, среди которых ГТФ-связывающий домен является самым консервативным (Mortensen et al, 1998). В целом С-регион, включающий в себя домены IV - VI, является консервативным, тогда как N-регион, продолжающийся до III домена, гораздо более вариабелен (Sørensen et al, 2001; Steffensen et al, 1997). У некоторых микроорганизмов, например, у представителей семейства *Enterobacteriaceae,* IF2 может быть представлен несколькими изоформами (Nyengaard et al, 1991).

IF3, третий фактор инициации трансляции, состоит из двух доменов, N- и C-, соединенных подвижным линкером (Biou et al, 1995). Этот фактор предотвращает преждевременную ассоциацию рибосомных субъединиц после терминации, являясь, таким образом, первым по времени участником процесса инициации. Фактор IF1 занимает место в А-сайте рибосомы, позволяя инициаторной тРНК локализоваться исключительно в Р-сайте рибосомы. Далее в формирующийся преинициаторный комплекс входят мРНК, а также стартовая тРНК в комплексе с фактором IF2, и происходит установка стартового кодона мРНК и fMet-tRNA в Р-сайте рибосомы. Гидролиз ГТФ приводит к конформационным изменениям IF2, стимулирующим его диссоциацию из тройственного комплекса. Процесс завершается присоединением БСР и высвобождением факторов инициации из сформировавшейся транслирующей рибосомы (Рис. 2).

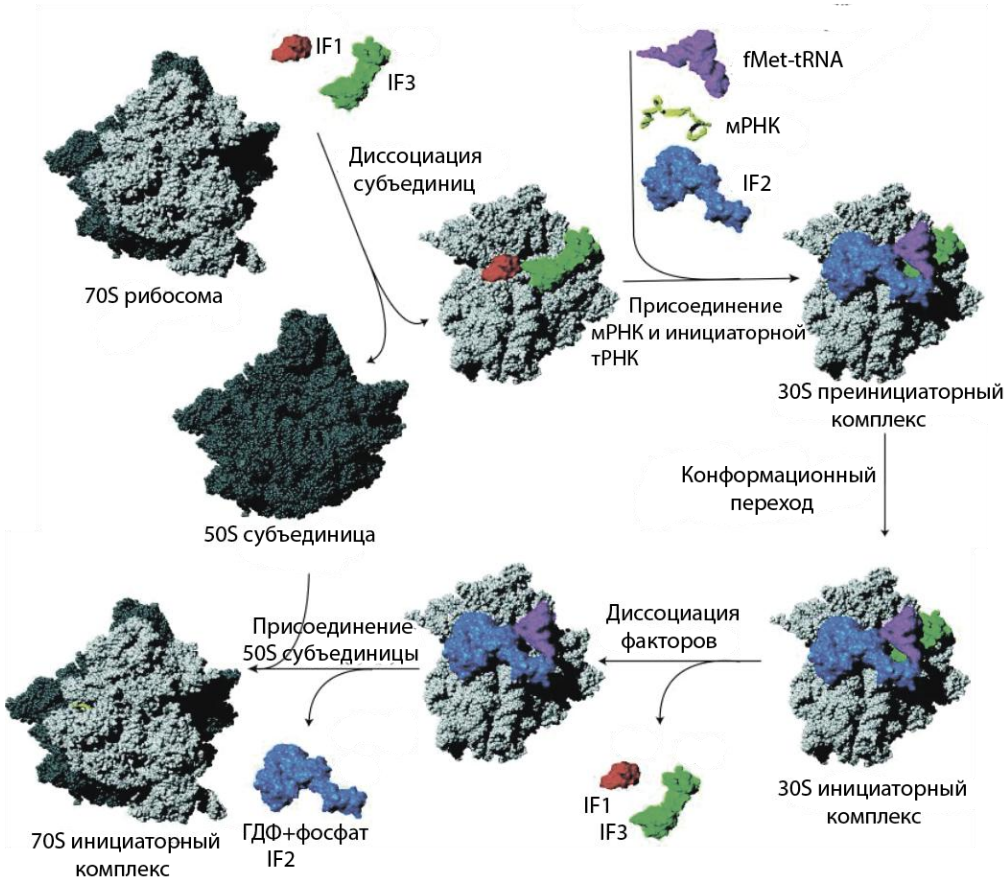

Рисунок 2. Инициация трансляции в клетках бактерий. БСР и МСР показаны тёмно-серым и светло-серым соответственно. Факторы инициации IF1, IF2, и IF3, мРНК и инициаторная тРНК показаны красным, синим, зеленым, желтым и фиолетовым соответственно. Компоненты размещены на рибосоме в соответствии с экспериментальными данными.

Для осуществления процесса трансляции диссоциация рибосомы на субъединицы осуществляется с участием инициаторного фактора IF3. Фактор IF1 связывается с МСР в А-сайте, тем самым блокируя присоединение тРНК к данному региону. На следующем этапе к рибосоме присоединяется матричная РНК, а также инициаторная тРНК в комплексе с фактором IF2, формируется преинициаторный комплекс. В ходе конформационного перехода осуществляется перестройка комплекса, что приводит к высвобождению IF1 и IF3. Фактор IF2 высвобождается из комплекса с затратой молекулы ГТФ. Затем происходит присоединение БСР с формированием 70S инициаторного комплекса, начинается стадия элонгации (Laursen et al, 2005).

Инициация трансляции в митохондриях сходна с бактериальной, но при этом обнаруживает ряд особенностей, как общих, так и видоспецифичных. Если высвобождение факторов инициации из бактериальной рибосомы осуществляется при гидролизе одной молекулы ГТФ, то в митохондриях млекопитающих, согласно биохимическим данным (Denslow et al, 1991) и анализу структуры миторибосом (Amunts

et al, 2015; Greber et al, 2015), по-видимому, может происходить гидролиз дополнительной молекулы ГТФ. Гидролиз осуществляется специфическим митохондриальным белком mS29, расположенным между головкой МСР и центральным протуберанцем БСР (Рис. 1). В отличие от митохондриальных рибосом млекопитающих, в миторибосомах дрожжей отсутствует гомолог mS29.

2.4 Факторы инициации митохондриальной трансляции

Митохондриальная система характеризуется рядом отличий в составе, структуре и функциональных особенностях инициаторных фактов по сравнению с бактериальными. Кроме того, отдельный интерес представляет возможность взаимозаменяемости факторов, что отражает степень их дивергенции. Был проведен ряд исследований функционирования факторов в гетерологичных системах. Согласно полученным экспериментальным данным, бактериальный IF3 *E. coli* стимулирует диссоциацию бычьих митохондриальных рибосом на субъединицы (Spremulli and Kraus, 1987; Denslow et al, 1988) и формирование инициаторных комплексов на митохондриальных рибосомах (Koc and Spremulli, 2002), тогда как бактериальный IF2 не активен по отношению к бычьим миторибосомам (Liao and Spremulli, 1990). Для митохондриальных же факторов прослеживается обратная ситуация. Если IF2mt функционирует в комплексе с рибосомами *E. coli* (Liao and Spremulli, 1991) то IF3mt не способен стимулировать связывание fMet-tRNA с бактериальными рибосомами в присутствии IF2 *E. coli*, но активен при замене бактериального IF2 на митохондриальный (Koc and Spremulli, 2002). Таким образом, митохондриальный IF3 выполняет свою функцию в контексте бактериальной системы трансляции только в присутствии IF2mt.

В отличие от бактерий, в митохондриях изученных эукариот не обнаружен первый фактор инициации трансляции; процесс осуществляется с участием двух факторов: IF2mt (Liao and Spremulli, 1990) и IF3mt (Koc and Spremulli, 2002), которые имеют значительные различия по сравнению с бактериальными. Их разнообразие также может варьировать у разных видов. Например, у протистов надтипа *Alveolates* и класса *Kinetoplastida* обнаружена дупликация IF2mt, у *Kinetoplastida* - фактора IF3mt , которые, по-видимому, выполняют различные функции в клетке (Atkinson et al, 2012). Не ясно, зачем этим организмам несколько белков, но они обладают и другими особенностями митохондриального аппарата. Многие альвеоляты и кинетопластиды в митохондриях синтезируют всего лишь три белка. Кроме того, у них обнаружены фрагментированные гены рРНК, которые собираются посттранскрипционно, они импортируют все или

большинство тРНК из цитоплазмы, иногда, вероятно, в аминоацилированной форме (Pino et al, 2010).

IF2mt, как и бактериальный фактор, формирует комплекс с инициаторной тРНК (fMet-tRNA) при этом связывание фактора со стартовой тРНК практически в 50 раз сильнее, чем с неформилированной молекулой (Spencer and Spremulli**,** 2004). Образование комплекса не ограничивается митохондриальной тРНК. Например, бычий IF2mt также имеет высокое сродство к дрожжевой цитоплазматической инициаторной тРНК и fMet-тРНК *E. coli* (Liao and Spremulli, 1991). В отсутствие формилированной инициаторной тРНК синтез митохондриально-закодированных генов также может осуществляться, однако количество продуктов трансляции снижено (Tibbetts et al, 2003).

В ходе исследований было выдвинуто предположение, что отсутствие IF1 в органелле может компенсировать специфическая вставка из 37 аминокислот, обнаруженная между V и VI доменами бычьего IF2mt (Spencer and Spremulli, 2005). Аналогичная вставка обнаружена у различных организмов от дрожжей до человека, однако ее размер сильно варьирует (Gaur et al, 2008). В комплексе IF2 со стартовой тРНК и рибосомой вставка второго фактора занимает участок рибосомы, в котором обычно располагается IF1 у бактерий (Yassin et al, 2011). Данное предположение было подтверждено в результате экспериментов по комплементации, продемонстрировавших, что бычий IF2mt способен компенсировать отсутствие факторов IF1 и IF2 в клетках *E. coli* (Gaur et al, 2008). Вставка может оказывать положительный эффект на трансляцию в отсутствие IF1, поскольку увеличивает аффинность второго фактора к рибосоме (Spremulli et al, 2004). Кроме того, она может служить дополнительной точкой фиксации IF2mt на рибосоме (Atkinson et al, 2012).

Потеря IF1mt универсальна для всех эукариот и произошла задолго до возникновения дополнительного участка внутри фактора IF2mt. Таким образом, появление вставки является результатом оптимизации системы трансляции в связи с отсутствием первого фактора. Однако этот участок гораздо меньше первого фактора: его размер в клетках человека составляет 37 аминокислотных остатков, тогда как IF1 *E. coli* в два раза длиннее (71 а.о.). Биоинформатический анализ дополнительного участка IF2mt показал, что гомология с IF1 прослеживается только у позвоночных животных. Теория компенсации на данный момент является общепринятой, но, тем не менее, такой механизм может быть верен не для всех эукариот (Atkinson et al, 2012).

С точки зрения эволюции такое слияние функций вполне объяснимо. Функционально два фактора демонстрируют синергичный эффект, при этом они пространственно сближены на рибосоме (Antoun et al, 2006). При этом энергетически

более выгодно импортировать в митохондрии один слитый белок, чем два отдельных. Однако наличие одного фактора вместо двух лишает возможности использовать некоторые механизмы регуляции трансляции. Видимо, увеличение возможностей трансляционной регуляции является одной из причин, по которой высшие организмы эволюционно развили более широкий набор инициаторных факторов (Gaur et al, 2008).

2.5 Третий фактор инициации трансляции

Третий фактор инициации трансляции необходим для жизнедеятельности клеток (Olsson et al, 1996) и выполняет ряд функций, среди которых предотвращение ассоциации рибосомных субъединиц после терминации (Gualerzi and Pon, 1990; Dottavio-Martin et al, 1979; Grunberg-Manago et al, 1975), пруфридинг инициаторной тРНК и старт-кодона в P-сайте рибосомы (Hartz et al, 1990; Sussman et al, 1996), позиционирование мРНК на малой субъединице (La Teana et al, 1995).

Бактериальный IF3 состоит из 180 аминокислот, кодируется геном *infC* (Olsson et al, 1996) и формирует два домена, N- и C-, соединенных подвижным линкером (Biou et al, 1995) (Рис. 3). Согласно структурным исследованиям, N-домен (NTD) связывается со стороны локтя fMet-tRNA, тогда как C-домен (CTD) взаимодействует со спиралями h23, h24 и h45 16S рРНК (Julián et al, 2011; Dallas and Noller, 2001; Hussain et al, 2016; Allen et al, 2005). C-домен выполняет все основные функции, тогда как N-домен необходим для увеличения сродства фактора к малой субъединице рибосомы. Линкер же, по-видимому, является связующим звеном между двумя доменами и не несет дополнительной функции (Petrelli et al, 2001). За формирование корректного инициаторного комплекса отвечают оба домена, и мутации в одном из доменов снижают корректирующую активность фактора (Maar et al, 2008; De Bellis et al, 1992; Bruhns and Gualerzi, 1980).

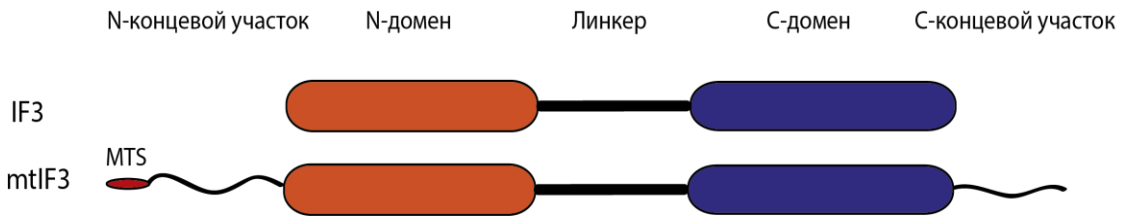

Рисунок 3. Схема строения третьего фактора инициации трансляции бактерий и митохондрий. N- и C-домены факторов окрашены в красный и синий цвет соответственно. Прямой линией обозначен линкерный регион, волнистыми линиями - концевые удлинения митохондриального фактора. Красным овалом обозначена сигнальная последовательность, необходимая для импорта фактора в митохондрию (MTS).

C-домен отвечает за связывание фактора с рибосомой (Sacerdot et al, 1999), и большинство остатков, ответственных за взаимодействие с рибосомой, располагаются именно в CTD (Garcia et al, 1995; Sette et al, 1999). Диссоциация рибосомы на субъединицы осуществляется за счет активности C-домена, тогда как N-домен вклада в диссоциацию практически не вносит (Ayyub et al, 2017). Предположительно, CTD связывается с платформой MCP, тем самым физически блокируя взаимодействие с большой субъединицей (Dallas and Noller, 2001). При связывании оказывается заблокированным мост B2b рибосомы, один из наиболее консервативных сайтов связывания двух субъединиц (Sharma et al, 2003). B2b включает нуклеотид 794 16S рРНК (Liiv and O'Connor, 2006), располагающийся вблизи предполагаемого сайта связывания IF3 с MCP (Dallas and Noller, 2001; Tapprich et al, 1989). Данное связывание предотвращает реассоциацию большой и малой субъединиц рибосомы. Исследования показывают, что N-домен может модулировать ассоциацию и диссоциацию IF3 из MCP посредством флуктуирующего взаимодействия с областью шеи субъединицы (Fabbretti et al, 2007).

Селекция корректной пары стартовый кодон - инициаторная тРНК с участием фактора IF3 осуществляется за счет смещения равновесия в сторону одной из конформаций фактора, что приводит к дальнейшему формированию инициаторного комплекса (Elvekrog and Gonzalez, 2013).

IF3 участвует в рибосомном рециклинге (Pavlov, 2008), предотвращая реассоциацию рибосомных субъединиц, диссоциированных трансляционными факторами EF-G и RRF (Zavialov et al, 2005) и способствуя последующей диссоциации тРНК и мРНК из рибосомы (Peske et al, 2005). Присоединение БСР к инициаторному комплексу и диссоциация IF3 строго регулируется инициирующим кодоном (Milon et al, 2008).

Третий фактор инициации митохондриальной трансляции найден не во всех живых организмах. Например, на данный момент отсутствуют данные относительно некоторых грибов и других низших эукариот. Ортологичные факторы митохондрий различных организмов, как и бактериальные, состоят из двух доменов, соединенных линкером, и, кроме того, имеют дополнительные N- и C-концевые участки (удлинения) (Рис. 3). Дополнительные концевые удлинения характерны и для других митохондриальных белков, однако функциональная роль некоторых из них до сих пор не ясна (Woriax et al, 1995; Koc et al, 2001).

Наиболее детально изучены IF3mt млекопитающих, в частности, человеческий.

2.6 IF3mt млекопитающих

Третий фактор инициации митотрансляции млекопитающих, подобно бактериальному ортологу, способствует как диссоциации рибосомы на субъединицы, так и образованию инициаторного комплекса на митохондриальных рибосомах в присутствие IF2mt, fMet-тРНК и мРНК (Koc and Spremulli, 2002). Митохондриальный фактор осуществляет сплиттинг 55S рибосомы на малую (28S) и большую (39S) субъединицы за счет смещения равновесия реакции ассоциации-диссоциации в сторону формирования отдельных субъединиц рибосом (Koc and Spremulli, 2002), в отличие от бактериального ортолога, который, связываясь со свободной MCP, пассивным образом препятствует ассоциации субъединиц.

Зрелый IF3mt человека состоит из 247 аминокислот (29 кДа) и устроен по классическому для данного фактора типу. Процент идентичности аминокислотной последовательности фактора по сравнению с бактериальными составляет 20-30%. Как и большинство IF3mt, человеческий фактор фланкирован дополнительными N- и C-концевыми удлинениями, и их размер составляет около 30 остатков аминокислот каждый (Bhargava and Spremulli, 2005) (Рис. 4). Перед фактором располагается 31-аминокислотная сигнальная последовательность импорта в митохондрии (MTS), которая отрезается после окончания процесса транспортировки белка в органеллу из цитозоля.

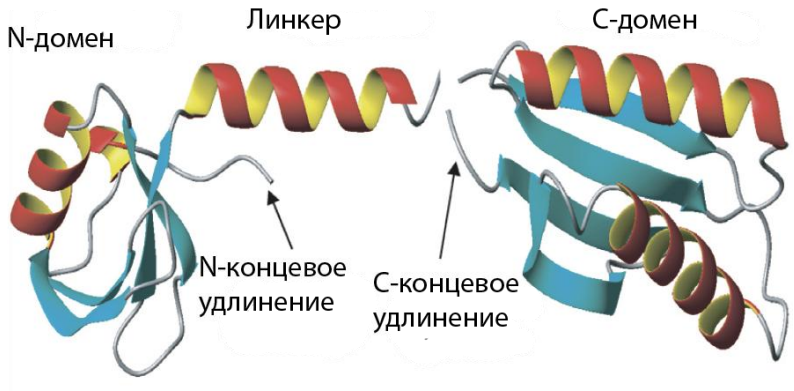

Рисунок 4. Модель строения митохондриального третьего фактора инициации трансляции. Желто-оранжевым окрашены участки, обладающие структурой α-спирали, бирюзовым показаны β-слои (Bhargava and Spremulli, 2005).

Было проведено моделирование трехмерной структуры человеческого IF3mt. N-терминальный домен характеризуется глобулярной α/β топологией, состоящей из одной α-спирали, расположенной напротив β-слоя, состоящего из четырех цепей, тогда как C-домен включает две α-спирали (H3 и H4), расположенные на поверхности β-слоя из четырех цепей (Koripella et al, 2019). Степень гомологии C-домена митохондриального

фактора человека и мыши составляет 72%. Домены бактериального фактора соединены подвижным линкером, который в кристаллической структуре частично образует спираль (Biou et al, 1995). Согласно исследованиям, линкерный участок должен быть подвижен, чтобы позволить фактору взаимодействовать с удаленными частями MCP (Dallas and Noller, 2001; Pioletti et al, 2001). Однако линкер IF3mt содержит два остатка пролина рядом с местом его соединения с С-доменом, что, скорее всего, снижает его гибкость и помогает поддерживать определенную ориентацию между доменами. Оба пролина являются консервативными для IF3mt млекопитающих, но не обнаружены в прокариотических IF3 (Koc and Spremulli, 2002). Была проанализирована пространственная организация С-участка. Согласно полученным данным, она представляет собой одиночную α-спираль, соединенную с основной частью фактора через подвижную петлю (Koripella et al, 2019). N-удлинение, по-видимому, формирует неупорядоченную структуру (Christian and Spremulli, 2009) (Рис. 5C).

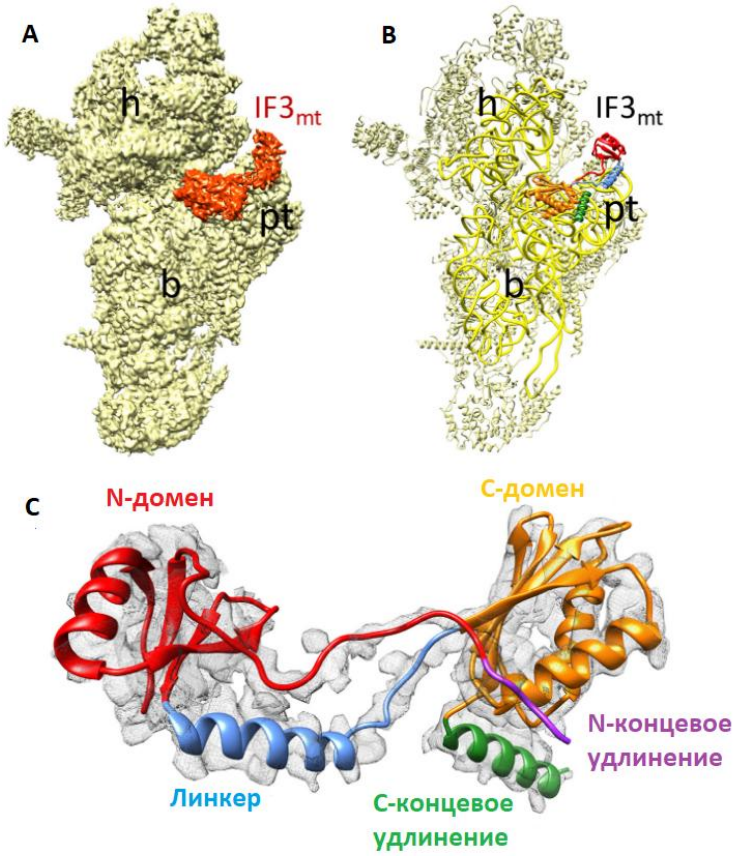

Рисунок 5. Крио-ЭМ структура комллекса 28S-IF3mt млекопитающих.

А) Трехмерная крио-ЭМ карта комплекса MCP с IF3mt со стороны, обращенной к БСР. Малая субъединица окрашена желтым, плотность, соответствующая IF3mt показана оранжевым.

B) Молекулярная интерпретация крио-ЭМ карты (A). 12S рРНК показана ярко-желтым, тогда как светло-желтым изображены белки 28S субъединицы. Буквой h обозначена головка МСР (head), буквой b - тело (body), pt - платформа (platform). Красным, оранжевым, зеленым и голубым изображены регионы IF3mt.

C) Модель IF3mt. Красным цветом показан N-домен фактора, оранжевым - C-домен, голубым - линкерный участок. В зеленый и фиолетовый цвет окрашены C- и N-концевые участки соответственно (Koripella et al, 2019).

Общая схема организации комплекса IF3mt:28S сходна с таковой для IF3:30S *E. coli* (Рис. 5 A, B) (Koripella et al, 2019, Hussain et al, 2016, Julian et al, 2011, Lopez-Alonso et al, 2017). Однако основные точки контакта фактора с МСР значительно различаются у бактериального и митохондриального фактора. У IF3 *E. coli* эти участки располагаются вблизи спирали H3, в области петель и частично в H4. Для митохондриального же белка мутации в ключевых точках спирали H4 не изменяют активности, то есть данный регион не играет большой роли в функционировании фактора (Christian and Spremulli, 2009). Замены ряда аминокислот в центре спирали H3 IF3 *E. coli* приводят лишь к легкому снижению эффективности формирования инициаторного комплекса (Petrelli et al, 2003). У митохондриального фактора аналогичные аминокислоты (170, 171 и 175) располагаются в основании спирали, и мутации в этих участках приводят к отсутствию активности фактора в образовании инициаторного комплекса, что может быть обусловлено неспособностью модифицированного фактора осуществлять диссоциацию рибосомы. При этом способность связываться с 28S субъединицей сохраняется. Таким образом, предположительно, аминокислоты в основании H3 не вступают в прямой контакт с МСР, но могут располагаться на поверхности фактора, взаимодействующей с БСР в процессе диссоциации рибосомы на субъединицы (Christian and Spremulli, 2009). Как уже упоминалось, бактериальный IF3 блокирует межсубъединичный мост B2b. IF3mt оказывает аналогичный эффект на митохондриальную рибосому, и, вероятно остатки 170, 171 и 175 играют ключевую роль в данном взаимодействии (Christian and Spremulli, 2009).

C-домен человеческого IF3mt расположен на малой субъединице рибосомы вблизи P-сайта и взаимодействует с рядом компонентов 12S ррНК, среди которых спирали h24, h44 и h45 (Koripella et al, 2019). Ряд аминокислотных остатков, формирующих данные контакты, являются консервативными, и обнаружены как у бактерий, так и в человеческих митохондриях, несмотря на низкую степень гомологии двух белков (около 25%) (Koripella et al, 2019; Hussain et al, 2016; Koc and Spremulli, 2002). Именно C-домен IF3mt расположен таким образом, что он блокирует консервативные межсубъединичные мостики B2a и B2b, препятствуя ассоциации двух субъединиц рибосомы. Кроме того, он

препятствует стыковке с MCP специфического белка большой субъединицы миторибосомы mL40. Все это делает невозможным присоединение большой субъединицы до формирования преинициаторного комплекса (Koripella et al, 2019). C-домен IF3mt стимулирует формирование инициаторного комплекса, вносит основной вклад в связывание фактора с MCP, однако, в отличие от бактериального фактора, N-домен также играет большую роль в этих процессах (Haque and Spremulli, 2008; Petrelli et al, 2001). По-видимому, важную роль в данном связывании играют электростатические взаимодействия между IF3mt и 12S рРНК малой субъединицы (Christian and Spremulli, 2009). C-домен берет на себя основную нагрузку в процессе диссоциации рибосомы на субъединицы, однако максимальный эффект наблюдается от работы полноразмерного белка, при этом N-домен лишь усиливает связывание с MCP, а следовательно, усложняет его замещение большой субъединицей (Haque and Spremulli, 2008; Koripella et al, 2019). Линкер также увеличивает способность C-домена осуществлять диссоциацию, а кроме того, совместно они стимулируют диссоциацию тРНК при отсутствии мРНК в формирующемся инициаторном комплексе (эта активность не свойственна цитоплазматическим факторам). Область платформы малой субъединицы является одной из наиболее консервативных областей и сходна у бактерий и митохондрий. С этой областью связывается C-домен третьего фактора трансляции (Sharma et al, 2003; Cavdar et al, 2001), однако, C-домен митохондриального фактора связывается с MCP значительно лучше бактериального (Haque and Spremulli, 2008). Вероятно, это связано с тем, что на краях платформы располагаются специфические митохондриальные белки, с которыми и взаимодействует митохондриальный фактор (Bhargava and Spremulli, 2005)

N-домен IF3mt связывается с малой субъединицей ближе к краю платформы, так же, как это происходит и в бактериальной системе. Однако, в отличие от последнего случая, участок взаимодействия митохондриального фактора расположен ближе к MCP, что позволяет создавать множественные контакты с элементами рибосомы. Если связывание бактериального фактора с MCP осуществляется через белки S11, S13 и S19, то у митохондриальной рибосомы обнаружен гомолог только белка S11. Кроме того, N-домен IF3mt взаимодействует со спиралью h23 12S рРНК (Koripella et al, 2019). Более тесный контакт N-домена с MCP миторибосомы подтверждает его предполагаемую роль в усилении связывания фактора с рибосомой. Это подтверждается и тем, что изолированный C-домен гораздо легче вытесняется из комплекса с малой субъединицей по сравнению с полноразмерным фактором. При этом N-домен связывается с MCP с высокой аффинностью (Haque and Spremulli, 2008), тогда как NTD бактериального фактора не способен отдельно взаимодействовать с 30S субъединицей (Petrelli et al, 2001)

N-домен важен для точности выбора стартового кодона, а также он стимулирует конформационные изменения в МСР перед связыванием fMet-tRNA (Ayyub et al, 2017; Ayyub et al, 2018). Совместно с С-доменом, N-домен вносит вклад в кинетику формирования инициаторного комплекса, а также правильное позиционирование старт-кодона в Р-сайте рибосомы (Haque and Spremulli, 2008).

Линкер человеческого IF3mt проходит через спираль h23 12S рРНК по направлению к Р-сайту рибосомы (Koripella et al, 2019). В отличие от бактериального фактора, взаимодействующего с МСР через одну аминокислоту, митохондриальный белок формирует несколько точек взаимодействия с малой субъединицей, таким образом, усиливая связывание (Koripella et al, 2019; Hussain et al, 2016). Ряд взаимодействующих аминокислотных остатков консервативен среди млекопитающих. Линкерный участок IF3mt принимает участие в связывании фактора с МСР, диссоциации 55S-рибосом и формировании инициаторного комплекса, в отличие от линкера бактериального фактора, выполняющего исключительно роль связующего звена между N- и С-доменами (Haque and Spremulli, 2008; Petrelli et al, 2001).

IF3mt стимулирует формирование комплекса IF2mt со стартовой тРНК (Haque and Spremulli, 2008). В данном взаимодействии принимают участие оба домена, при этом N-домен является несколько более важным, чем С-домен. С-домен фактора располагается близко к антикодону и месту соединения D- и антикодоновой петель, тогда как N-домен расположен около акцепторного черешка и D-петли (Haque and Spremulli, 2008) возле остатка A790 (Fabbretti et al, 2007), который взаимодействует с антикодоновой петлей инициаторной тРНК в Р-сайте (Selmer et al, 2006). Интересно, что IF3mt усиливает образование комплекса IF2mt с инициаторной тРНК почти в 10 раз, и данный эффект наблюдается только для формилированной тРНК (Haque and Spremulli, 2008).

По-видимому, фактор IF3mt также принимает участие в рециклинге рибосомы, который осуществляется после высвобождения новосинтезированного пептида. В процессе также задействованы специфические митохондриальные белки RRF1mt и EF-C2mt, участвующий только в рециклинге (Tsuboi et al, 2009). IF3mt остается в комплексе с МСР, предотвращая реассоциацию рибосомы до формирования преинициаторного комплекса.

Существует две модели, описывающие диссоциацию рибосомы фактором IF3mt, пассивная и активная (Рис. 6). Согласно первой, фактор пассивно связывается с малой субъединицей при спонтанной диссоциации, препятствуя реассоциации субъединиц. Согласно второй, наиболее вероятной модели, полная рибосома находится в равновесии комплекса субъединиц с третьим фактором, который, в свою очередь, находится в

равновесии с парой свободная БСР и МСР в связи с IF3mt. Таким образом, третий фактор играет более активную роль в диссоциации 55S рибосомы, чем простое связывание с 28S субъединицей (Christian and Spremulli, 2009).

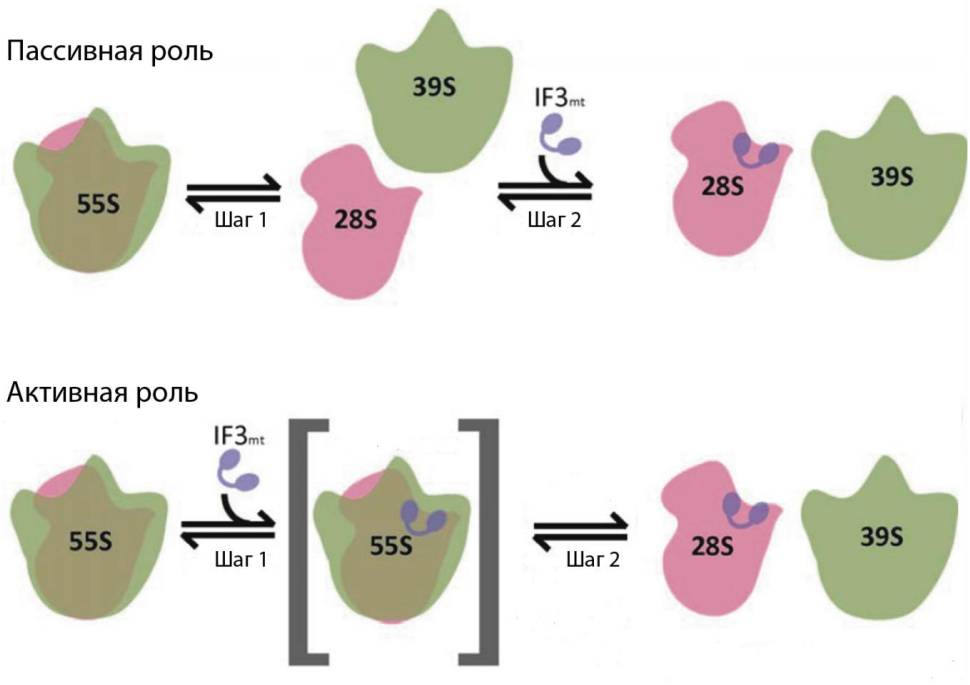

Рисунок 6. Механизмы диссоциации митохондриальных рибосом фактором IF3mt.

Согласно пассивной модели, субъединицы находятся в равновесии с целой рибосомой (шаг 1). IF3 связывается со свободной 28S субъединицей, тем самым предотвращая ее реассоциацию с 39S субъединицей (шаг 2).

В активной модели IF3 взаимодействует с 55S рибосомой с образованием тройственного комплекса 28S:IF3mt:39S (шаг 1), который затем диссоциирует на комплекс 28S:IF3mt и свободную 39S субъединицу (шаг 2). По (Christian and Spremulli, 2009), с изменениями.

Анализ базы данных продемонстрировал наличие гомологов человеческого фактора у мышей и быка (степень сходства составляет 65-70%). Также гомологи фактора обнаружены у *Fugu rubripes* (рыба фугу) и *Drosophila melanogaster*, тогда как гомологи у *Caenorhabditis elegans* не детектированы. Вероятно, *C. elegans* также содержит третий фактор, однако данный белок не является высококонсервативным, что усложняет поиск возможных кандидатов на его роль (Koc and Spremulli, 2002). IF3mt животных в основном содержат концевые участки, при этом N-участок у рыбы фугу значительно длиннее по сравнению с факторами млекопитающих, тогда как С-участки примерно одинаковые. Что же касается фактора *D. melanogaster*, то он содержит очень короткие концевые участки. В ходе анализа генома дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (Wood et al, 2002) был

детектирован IF3mt, процент идентичности которого с человеческим фактором составляет 20,9%, а с IF3 *E. coli* – 25%. Однако, концевые участки у данного фактора не обнаружены (Koc and Spremulli, 2002).

2.7 N- и C-концевые удлинения IF3mt млекопитающих

Помимо основной части, IF3mt содержит дополнительные N- и C-концевые удлинения, состоящие в случае человеческого фактора из 31 и 33 аминокислот соответственно. Ряд заряженных аминокислот C-участка, предположительно играющие ключевую роль в функциональной активности региона, являются консервативными среди позвоночных и частично у некоторых насекомых, тогда как аналогичной консервативности N-удлинения не прослеживается (Christian and Spremulli, 2009). Было проведено множество исследований *in vitro*, демонстрирующих функциональную роль этих участков.

В ходе экспериментов было показано, что делеция концевых участков способствует увеличению эффективности связывания инициаторной тРНК с бычьими миторибосомами, а также небольшому увеличению активности фактора в образовании комплексов с мРНК (Bhargava and Spremulli, 2005). Аналогичные исследования были проведены с использованием бактериальных 70S рибосом, где были продемонстрированы схожие результаты. Таким образом, наблюдаемый эффект не зависит от типа рибосом. Важно отметить, что N-концевое удлинение IF3mt человека взаимодействует с остатком A424 петли h24 12S рРНК, ответственным за взаимодействие с антикодоновой областью инициаторной тРНК. Вероятно, N-домен через свое удлинение влияет на связывание тРНК с P-сайтом рибосомы (Koripella et al, 2019). В целом взаимодействие с петлей h24, по-видимому, увеличивает сродство фактора к МСР.

Селекция стартового кодона является одной из важных функций третьего фактора инициации трансляции (Meinnel et al, 1999). В клетках *E. coli* этот эффект, по-видимому, связан с конформационными изменениями в субъединице, а не с прямым взаимодействием фактора с fMet-tRNA в P-сайте (Hartz et al, 1989). Для митохондрий же селекция прослеживается довольно слабо, и делеция концевых участков на нее не влияет. Вероятно, пруфридинг не так необходим в митохондриях, и даже может блокировать трансляцию некоторых мРНК, поскольку стартовые кодоны в митохондриях довольно вариативны (Bhargava and Spremulli., 2005). Кроме того, было показано, что при мутации, при которой происходит замена стартового кодона гена ATP6 с АУГ на ГУГ, наблюдается эффективная трансляция (Dubot et al, 2004; Chomyn et al, 1985). Таким образом, прослеживается большая «толерантность» по отношению к стартовому кодону. При этом

в митохондриях млекопитающих одна и та же метиониновая тРНК выступает и в качестве стартовой, и в качестве элонгаторной (Bhargava and Spremulli., 2005). В бактериальной трансляционной системе селекция инициаторной тРНК человеческим IF3mt, лишенным концевых участков, осуществляется более строго, чем полноразмерным фактором или бактериальным IF3, что может быть невыгодно в митохондриальной системе. Таким образом, концевые участки могли возникнуть в ходе эволюционного процесса для ослабления селекции в трансляционном аппарате митохондрий, что дает больше возможностей для синтеза белка в митохондриях (Ayyub et al, 2018).

Несмотря на низкий уровень пруфридинга относительно пары кодон - инициаторная тРНК, IF3mt осуществляет селекцию тРНК на наличие консервативных трех ГЦ-пар в антикодоновой петле (Ayyub et al, 2018). Данный регион необходим для связывания инициаторной тРНК в Р-сайте рибосомы (Hartz et al, 1990), и концевые удлинения IF3mt влияют на эту активность фактора. Удаление N-концевого участка, а также N-концевого участка вместе с N-доменом или С-концевого участка с С-доменом приводит к снижению эффективности распознавания мутантной тРНК, лишенной данной канонической последовательности. Однако в комплексе IF3mt с малой субъединицей миторибосомы N-домен удален от антикодоновой петли тРНК и не может напрямую с ней взаимодействовать. Влияние данного региона фактора, вероятно, оказывает косвенную роль в распознавании консервативных ГЦ-пар (Koripella et al, 2019). Было высказано предположение, что связывание третьего фактора инициирует конформационные перестройки в MCP, что стимулирует распознавание этого региона тРНК консервативными остаткам рРНК малой субъединицы за счет А-минорных взаимодействий. Аналогичное влияние фактора IF3 на 16S рРНК было продемонстрировано и для *E. coli* (Dallas and Noller, 2001; Lancaster and Noller, 2005; Korostelev et al, 2006, Selmer et al, 2006). Однако удаление обоих концевых участков, напротив, приводит к максимальной степени селекции модифицированной тРНК (Ayyub et al, 2018).

Одна из особенностей митохондриального фактора – диссоциация fMet-tRNA, связанной с 28S субъединицей в отсутствие мРНК. Это показано для митохондриального IF3, но не для бактериального. Делеция N-концевого участка IF3mt практически не влияет на способность фактора диссоциировать комплекс, тогда как при удалении С- или обоих концевых участков данная активность не наблюдается. С-концевое удлинение является единственным регионом IF3mt млекопитающих, не взаимодействующим напрямую с MCP. Однако при этом его α-спираль располагается таким образом, что в рибосоме она оказывается в стерическом столкновении с акцепторным черешком тРНК и с доменом VI

IF2mt, тем самым, по-видимому, препятствуя связыванию инициаторной тРНК в Р-сайте рибосомы в отсутствие мРНК (Koripella et al, 2019). В комплексе с рибосомой и связанной с ней мРНК, два консервативных лизина (Lys194 и Lys197) С-домена ориентированы в сторону мРНК. Вероятно, при связывании с матричной молекулой передается сигнал на С-концевое удлинение, которое меняет свою конформацию, тем самым позволяя инициаторной тРНК войти в Р-сайт рибосомы (Koripella et al, 2019) (Рис. 7). Таким образом, одна из вероятных функций концевых удлинений IF3mt – способность фактора диссоциировать комплекс тРНК с МСР при отсутствии в системе мРНК (Bhargava and Spremulli., 2005).

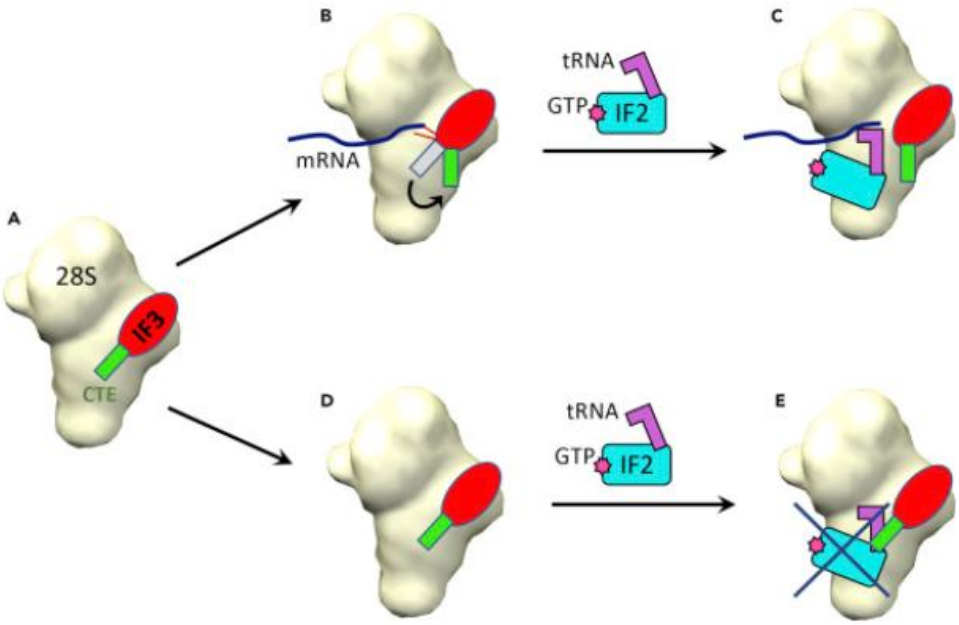

Рисунок 7. Предполагаемая роль С-домена и С-концевого удлинения в формировании инициаторного комплекса в митохондриях млекопитающих. Зеленым обозначено С-удлинение фактора IF3mt (показан красным), серым окрашена позиция региона до изменения конформации. Фиолетовым цветом показана инициаторная тРНК, синим - мРНК, голубым - фактор IF2mt в комплексе с ГТФ (розовый).

A) IF3mt, связанный с МСР, с С-удлинением в прямой позиции, как показано на структуре.

B) В присутствии мРНК положение IF3mt меняется, что позволяет связаться комплексу IF2mt:тРНК:ГТФ.

C) 28S преинициаторный комплекс сформирован.

D) В отсутствии мРНК С-концевой участок остается в исходном положении и стерически блокирует связывание комплекса IF2mt:тРНК:ГТФ (E) (Koripella et al, 2019).

Полноразмерный IF3mt слабо взаимодействует с большой субъединицей рибосомы. При моделировании было показано, что С-концевое удлинение расположено вдали от края

платформы и направлено в сторону межсубъединичной части 55S рибосомы, хотя, при этом оно не имеет прямого контакта с элементами рибосомы (Koripella et al, 2019). Анализ константы диссоциации различных вариантов фактора с большой и малой субъединицей, а также с целой рибосомой, показал, что концевые участки IF3mt практически не влияют на эффективность связывания фактора с МСР, но, по-видимому, играют важную в роль в предотвращении неспецифического связывания с большой субъединицей (Haque et al, 2008; Ayyub et al, 2018). Кроме того, данная делеция приводит к формированию 55S инициаторного комплекса, из которого легче высвобождается второй фактор (Haque et al, 2008). В целом делеция концевых участков у человеческого IF3mt приводит к усилению акцептирования тРНК Р-сайтом рибосомы (Ayyub et al, 2018), что может способствовать формированию некорректного инициаторного комплекса.

Согласно механизму, предложенному Л. Шпремулли и соавторами, при инициации трансляции образуется комплекс, состоящий из малой субъединицы, двух факторов инициации, тРНК и мРНК. Первым с 28S-субъединицей связывается матричная РНК. Если тРНК входит в комплекс раньше мРНК, третий фактор инициации стимулирует диссоциацию рано связавшейся транспортной РНК (Spremulli, 2005). Именно IF3mt отвечает за правильное позиционирование мРНК на рибосоме (Liao and Spremulli, 1989) - связывание IF3 вблизи платформы МСР способствует перегруппировке мРНК, что облегчает правильное размещение стартового кодона в Р-сайте (La Teana et al, 1995). Затем к комплексу присоединяется тРНК.

После образования преинициаторного комплекса происходит присоединение большой субъединицы с высвобождением факторов инициации и образованием 55S рибосомы (Рис. 8). Как уже упоминалось, делеция концевых участков IF3mt значительно увеличивает сродство фактора к 39S субъединице. В таких условиях две субъединицы легко, но некорректно связываются, при этом связь с IF2mt дестабилизируется, и он выходит из реакции. Таким образом, наличие концевых участков снижает аффинность фактора к богатой белками 39S-субъединице, препятствуя неправильному связыванию субъединицы с инициаторным комплексом (Haque et al, 2008).

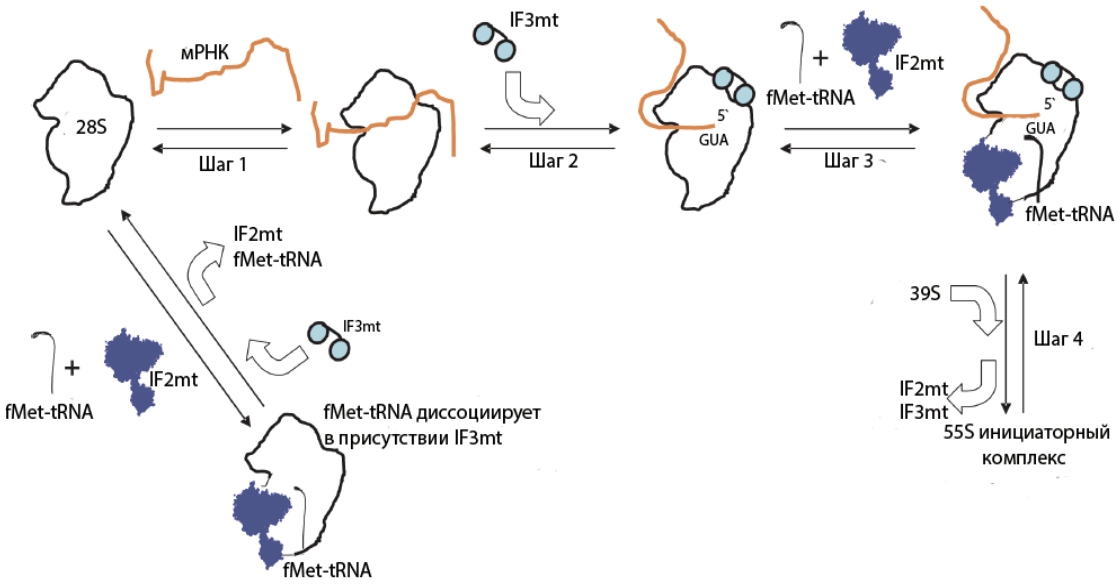

Рисунок 8. Предполагаемая роль IF3mt в формировании инициаторного комплекса в митохондриях млекопитающих.

Оранжевым изображена матричная РНК, синим - фактор IF2mt, голубым - IF3mt.

При образовании комплекса МСР:IF2mt:инициаторная тРНК в отсутствие мРНК происходит его диссоциация при взаимодействии с фактором IF3mt.

Полноценный инициаторный комплекс формируется в том случае, если первой с МСР связывается матричная РНК (шаг 1). После этого осуществляется присоединение к комплексу фактора IF3mt (шаг 2) и инициаторной тРНК в комплексе с IF2mt (шаг 3). Затем происходит присоединение БСР с формированием 55S инициаторного комплекса (Bhargava and Spremulli, 2005).

Описанные выше эксперименты были проведены в системе *in vitro*, тогда как исследование активности фактора в функционирующей живой системе вызывает сложности из-за неспособности клеток животных функционировать в отсутствие работающих митохондрий. Для проведения соответствующих экспериментов необходимо использование других организмов.

2.8 Особенности трансляции в митохондриях дрожжей

Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются модельным организмом для изучения митохондриальной трансляции. Для дрожжей разработана система внесения направленных изменений в геном митохондрий, что открывает большие возможности в изучении генетики органеллы (Johnston et al, 1988; Fox et al, 1988; Bonnefoy and Fox, 2007). Кроме того, существует множество методов изучения и изменения ядерного генома дрожжей, в связи с чем исследования трансляции могут осуществляться в полном объеме. Еще одно удобство в работе с дрожжами заключается в том, что *S. cerevisiae* могут расти

без функционально активных митохондрий, используя энергию, полученную при утилизации сбраживаемых источников углерода, например, глюкозы. Выращивание в таких условиях позволяет вносить изменения в трансляционный аппарат митохондрий, не нарушая скорости роста клеток, а затем переводить штамм на среду с несбраживаемым источником углерода и наблюдать эффект от внесенных изменений.

Митохондриальные рибосомы дрожжей состоят из двух субъединиц, малой (37S), образованной 15S рРНК, и большой (54S), в остове которой расположена 21S рРНК (Рис. 9). Помимо этого в миторибисоме обнаружено 73 белка и одна тРНК (Desai et al, 2017). Эволюционные изменения дрожжевых миторибосом, по-видимому, в отличие от других организмов, не сопровождаются сокращением количества рРНК (Amunts et al, 2014).

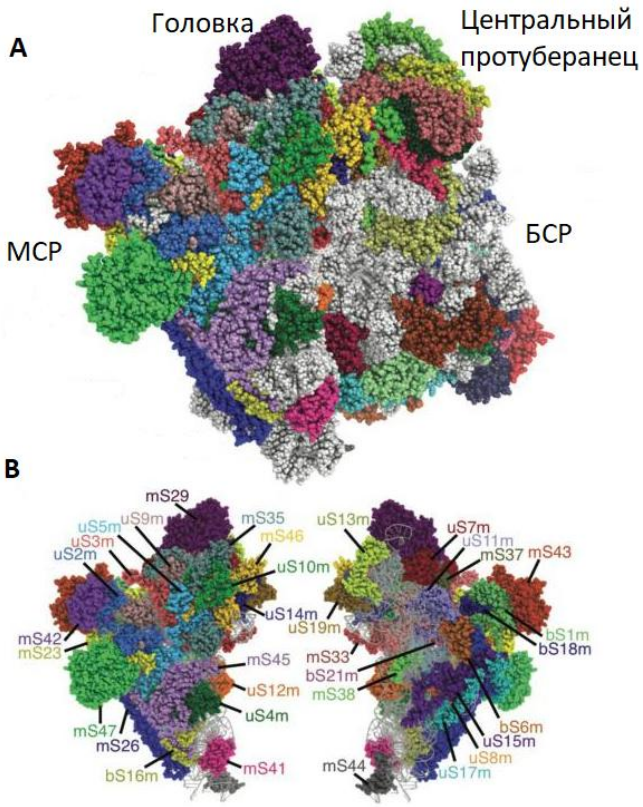

Рисунок 9. Структура дрожжевой миторибосомы. Разными цветами окрашены различные рибрсомальные белки.

A) Структура полноразмерной рибосомы.

B) Рибосомные белки MCP дрожжевой миторибосомы (Desai et al, 2017).

15S рРНК состоит из 1649 нуклеотидов и формирует в целом структуру, сходную с бактериальной 16S рРНК, хотя и обладает рядом отличий. Так, спирали h6, h8, h17, h21, h33 и h39 короче бактериальных эквивалентов, но это компенсируется добавлением трех добавочных сегментов, h16-ES, h17-ES и h41-ES, а также удлинениями спиралей h9, h44 и

5′ и 3′-хвостов (Desai et al, 2017). Это отличает дрожжевую миторибосому от органеллы млекопитающих, где в аналогичной 12S рРНК редуцированы намного более крупные участки (Amunts et al, 2015). Среди белков МСР дрожжевой миторибосомы представлены гомологи почти всех бактериальных белков за исключением bS20. Также в малой субъединице найдены 14 специфических митохондриальных белков, и гомологи семи из них обнаружены в миторибосомах млекопитающих (Desai et al, 2017). Большинство дрожжевых гомологов рибосомных белков содержат дополнительные N- и C-концевые удлинения, отвечающие, по-видимому, за взаимодействия внутри органеллы. Аналогичные удлинения обнаружены и у белков млекопитающих, однако они значительно отличаются по длине, последовательности и структуре, что говорит об их возникновении после расхождения организмов от общего предка. Добавление специфических митохондриальных белков и удлинений приводит к изменениям морфологии субъединицы, несвойственным другим рибосомам. Большой протуберанец примыкает к выходу мРНК и формируется гетеродимером из белков mS42 и mS43, гомологов супероксиддисмутазы (Desai et al, 2017).

Субъединицы миторибосомы соединяются несколькими пластичными межсубъединичными мостиками, которые регулируют их подвижность. Большинство бактериальных мостиков, за исключением B1a/b и B4, присутствуют и в дрожжевой миторибосоме. Кроме того, обнаружено еще 9 митоспецифических мостика из класса A, только два из которых обнаружены в миторибосомах млекопитающих. Такое обилие межсубъединичных мостиков в целом снижает конформационную подвижность субъединиц дрожжевой миторибосомы по сравнению с органеллами млекопитающих (Desai et al, 2017).

В процессе трансляции мРНК оборачивается вокруг спирали 28 15S рРНК, формирующей шею МСР. Как и у бактерий, прохождение осуществляется через узкий вход между головкой и плечом субъединицы, образованный белками uS3m , uS4m и uS5m. Также вклад в архитектуру внешнего входа мРНК вносят специфические митохондриальные белки mS35 и mS45. В A-сайте мРНК проходит через верхнюю борозду петли 44, где нуклеотиды G644, A1584 и A1585 (эквиваленты бактериальных G530, A1492 и A1493) и петля uS12m формируют декодирующий центр малой субъединицы, и этот регион является консервативным (Desai et al, 2017). Участок, включающий E-сайт, подвергся ряду изменений по сравнению с бактериальными рибосомами, поскольку в данном участке располагается сайт распознавания последовательности Шайна-Дальгарно, тогда как случае митохондриальных мРНК она отсутствует. В районе выхода мРНК расположена широкая V-образная щель,

фланкированная с одной стороны выступом, состоящим из гетеродимера mS42/mS43, с другой - удлинениями ряда рибосомных белков, среди которых bS6m, uS15m, uS17m, bS18m и bS21m (Desai et al, 2017). Ряд белков выходного канала взаимодействуют с 5`-НТО митохондриальной мРНК, а также с трянсляционными активаторами (см. ниже), и, предположительно, выступают в качестве платформы для последних (Desai et al, 2017; Green-Willms et al, 1998; Haffter and Fox, 1992; Haffter et al, 1991).

Митохондриальная ДНК дрожжей представлена в виде кольцевой молекулы размером около 85,5 kb (Foury et al, 1998). В ней закодированы две рибосомные РНК (21 и 15S), 24 молекулы транспортных РНК, 7 матричных РНК, одна из которых является бицистронной (Faye and Simon, 1983a; Faye and Simon, 1983b), и 9S РНК-компонент РНКазы Р (Рис. 10). Геном содержит большое количество некодирующих областей. В ДНК митохондрий дрожжей располагаются гены восьми белков, среди которых большую часть составляют белки электронтранспортной цепи – Cox1p, Cox2p и Cox3p (компоненты комплекса IV дыхательной цепи, цитохром-оксидазы), Cytb (компонент комплекса III дыхательной цепи, убихинол-цитохром с – редуктазы), а также компоненты АТФ-синтетазы – Atp6, Atp8, Atp9 и ген рибосомного белка Var1p.

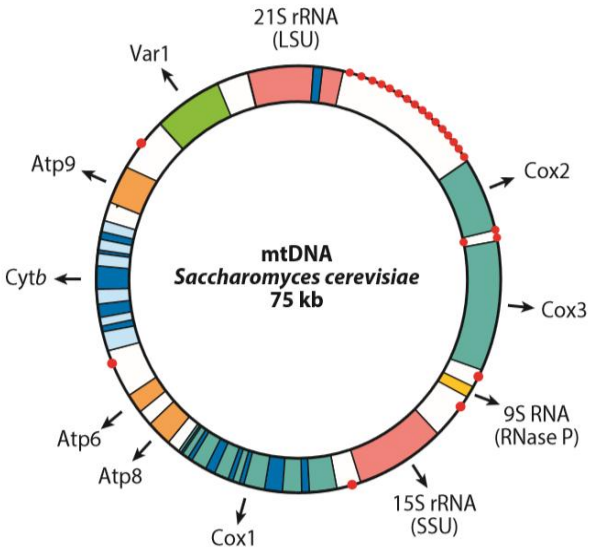

Рисунок 10. Организация митохондриального генома дрожжей.

Дрожжевой митохондриальный геном кодирует 2 рРНК, 24 тРНК, 7 мРНК и 9S РНК компонент РНКазы Р. Окрашенными регионами показаны различные гены, тРНК изображены красными точками (Ott et al, 2016).

Как указывалось выше, дрожжевые митохондриальные мРНК характеризуются наличием длинных НТО, размер которых может варьировать от нескольких десятков до нескольких сотен нуклеотидов (Bordonne et al,1988; Wiesenberger et al, 1995). Дрожжевые

мРНК не полиаденилированы (Groot et al, 1974), процессинг осуществляется благодаря наличию специфической 12-нуклеотидной последовательности на конце молекулы (Hofmann et al, 1993). Кроме того, на 5`-НТО, по-видимому, расположены консенсусные участки, которые могут выступать аналогами бактериальных последовательностей Шайна-Дальгарно (Green-Willms et al, 1998).

Для представителей классов *Saccharomycetes* и *Schizosaccharomycetes* характерно наличие системы регуляции митохондриальной трансляции, основанной на работе специфичных белков – активаторов трансляции (Costanzo et al, 2000). Каждый трансляционный активатор регулирует трансляцию определенной митохондриальной мРНК (Herrmann et al, 2013). Общее количество описанных к настоящему времени активаторов составляет около двух десятков. В какой-то степени данные белки берут на себя функции классических факторов инициации. Большинство белковых активаторов распознают и взаимодействуют непосредственно с НТО мРНК. Кроме того, существует множество активаторов, взаимодействующих с IF2mt, рибосомами (Krause-Buchholz et al, 2004; Krause-Buchholz et al, 2005) или внутренней мембраной митохондрии (Naithani et al, 2003). Некоторые из них также взаимодействуют с растущим пептидом (Рис. 11).

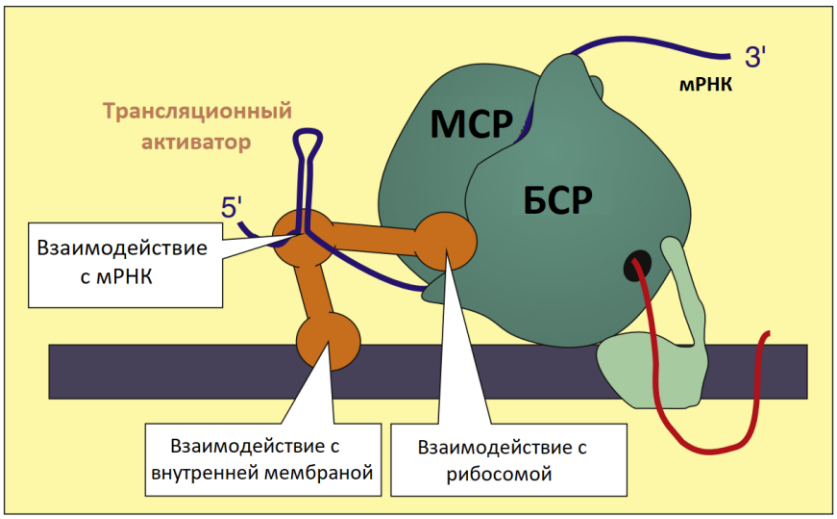

Рисунок 11. Взаимодействие трансляционных активаторов с различными компонентами трансляционного аппарата.

В основном, трансляционные активаторы взаимодействуют с 5`-НТО мРНК, однако в некоторых случаях они могут взаимодействовать с растущим пептидом. Было показано взаимодействие с рибосомой, в частности, с белками малой субъединицы. Кроме того, активаторы часто ассоциированы с мембраной, что, предположительно, позволяет локализовать трансляцию вблизи внутренней мембраны. Также некоторые активаторы, регулирующие трансляцию разных генов, взаимодействуют друг с другом, что позволяет сбалансировать между собой компоненты дыхательных комплексов (Herrmann et al, 2013).

Трансляционные активаторы некоторых генов, например, *COX1*, *COX2* и *COX3*, взаимодействуют между собой, что позволяет сбалансировать уровни экспрессии трех субъединиц цитохром С оксидазы. Трансляционные активаторы обычно присутствуют в клетках в низких количествах, тем самым ограничивая экспрессию своей целевой РНК. Данные белковые факторы играют крайне важную роль в регуляционной системе митохондрий дрожжей, на что указывает полная остановка окислительного фосфорилирования при делеции гена любого из активаторов. Активаторы частично компенсируют отсутствие последовательности Шайна-Дальгарно, способствуя правильному позиционированию миторибосомы на мРНК (Williams et al, 2007). Количество молекул определенного активатора может варьировать в зависимости от внешних условий, и его изменение приводит к модификации интенсивности трансляции митохондриально закодированных белков. (Marykwas and Fox, 1989) Это дает дополнительную возможность регуляции активности работы митохондрий. Кроме того, ряд активаторов обладает способностью стабилизировать митохондриальные мРНК, например, активатор цитохрома *b* Cbp1 (Islas-Osuna et al, 2002).

Регулировка уровня трансляции некоторыми активаторами основывается на принципе обратной связи. Например, активатор мРНК *COX1*, белок Mss51p, необходим для осуществления процесса трансляции, и, по-видимому, связывается с 5`-НТО *COX1*. Кроме того, он взаимодействует с растущим Cox1p и стабилизирует его. При этом до осуществления сборки комплекса активатор сохраняет свою связь с белком, таким образом, теряя возможность стимулировать синтез нового Cox1p. Запуск синтезанового Cox1p осуществляется только при высвобождении Mss51p после сборки комплекса цитохром *c*-оксидазы (Herrmann et al, 2013) (Рис. 12).

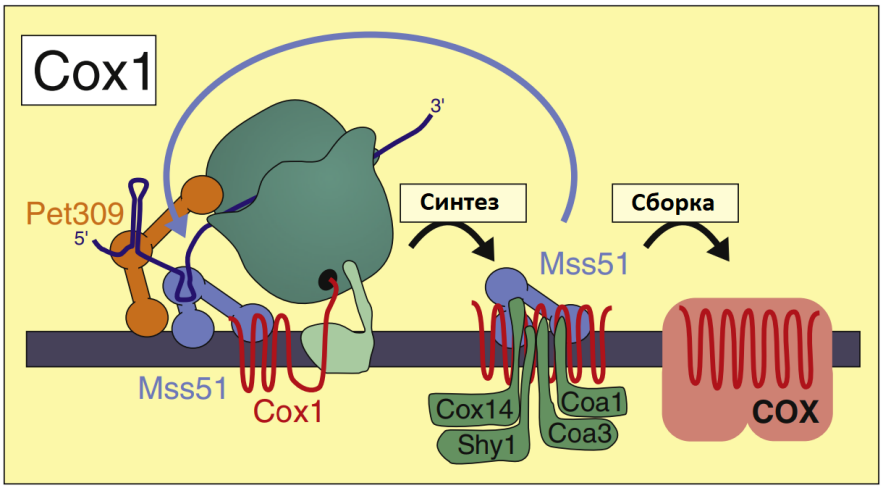

Рисунок 12. Контроль синтеза Cox1 по принципу обратной связи.

мРНК *COX1* является мишенью двух трансляционных активаторов, Pet309 и Mss51p. Мембранно-ассоциированный белок Mss51, вероятно, связывается с 5`-НТО мРНК *COX1*. Кроме того, он связывается с растущим пептидом и стабилизирует его вместе с рядом других факторов сборки. До окончания процесса трансляции Mss51p остается связанным с растущим пептидом и не может стимулировать синтез новой молекулы. Только при сборке комплекса Cox1p с другими компонентами цитохром оксидазы Mss51 высвобождается и активирует синтез нового Cox1p (Herrmann et al, 2013).

В связи с наличием трансляционных активаторов снижено влияние факторов инициации на селекцию инициаторного кодона и стартовой тРНК, а также возникает возможность осуществлять инициацию с помощью элонгаторной метиониновой тРНК (Tibbetts et al, 2003).

2.9 Aim23p как третий фактор инициации трансляции митохондрий дрожжей

Несмотря на то, что пекарские дрожжи являются модельным объектом для изучения работы митохондрий, ученые долгое время не могли обнаружить в клетках этого организма ортолог IF3mt, что связано с высокой степенью дивергенции фактора. В 2012 году был применен чувствительный алгоритм PSI-Blast и обнаружен кандидат на роль третьего фактора инициации митохондриальной трансляции *S. cerevisiae* – белок Aim23p, кодируемый рамкой считывания YJL131C (Atkinson et al, 2012). Ранее было показано, что продукт данного гена необходим для обеспечения митохондриальной функции и, вероятно, связан со сборкой дыхательных комплексов (Hess et al, 2009). Для подтверждения функционирования белка в качестве третьего фактора инициации митохондриальной трансляции авторы сравнивали потребление кислорода штаммом дикого типа и штамма с делецией по гену *AIM23*, оценивали митохондриальный мембранный потенциал клеток, а также показали способность Aim23p связываться с малой субъединицей бактериальной рибосомы. В экспериментах по комплементации было показано, что IF3mt делящихся дрожжей *S. pombe* компенсирует отсутствие Aim23p в клетках *S. cerevisiae*.

Как и другие представители семейства IF3, Aim23p состоит из двух доменов, соединенных подвижным линкером. Регион между доменами увеличен по сравнению с большинством аналогов на 19 аминокислот и, судя по всему, эта вставка увеличивает H2 спираль линкера. Множественное выравнивание с ортологами выявило наличие консервативных аминокислот как в N-, так и в C- доменах, большинство из которых расположены внутри глобулы и, вероятно, вовлечены во внутримолекулярные

взаимодействия, стабилизирующие архитектуру молекулы. Множество функционально важных для взаимодействия с рибосомой сайтов кластеризуются вокруг спирали H3, некоторые из которых сохраняются и в Aim23p (Sette et al, 1999; Atkinson et al, 2012). Для данного фактора показано обогащение заряженными аминокислотами, характерное и для других представителей семейства IF3. Данная особенность помогает фактору взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами РНК и характерна для рибосомных белков (Lin et al, 2002).

Помимо основной части Aim23p содержит два концевых удлинения (участка), N- и C-, длиной 60 и 32 аминокислот соответственно. Концевые участки также богаты заряженными аминокислотами (Atkinson et al, 2012). Перед N-концевым участком располагается сигнал митохондриального импорта (MTS) размером в 32 аминокислоты (Рис. 13).

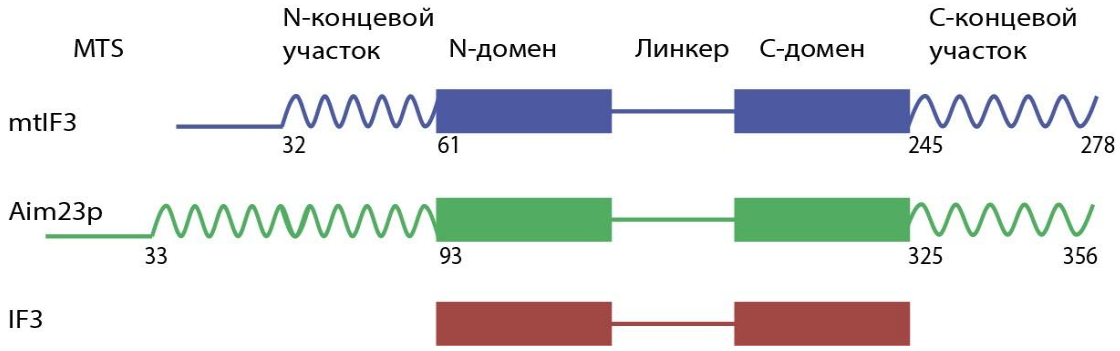

Рисунок 13. Сравнительная схема третьего фактора инициации трансляции бактерий и митохондриальных факторов человека и дрожжей.

Прямоугольниками обозначены домены факторов, линией между ними - линкерный регион. Волнистыми линиями показаны N- и C-концевые удлинения. Прямой линией перед C-удлинением митохондриальных факторов изображен сигнал импорта в митохондрии (MTS). Синим и зеленым цветом окрашены митохондриальные факторы человека и дрожжей соответственно, красным - IF3 *E. coli*. Цифрами отмечены пограничные аминокислоты между регионами.

Согласно проведенным исследованиям, мутации, дестабилизирующие мРНК IF3mt, ассоциированы с развитием болезни Паркинсона (Abahuni et al, 2007; Anvret et al, 2010; Behrouz et al, 2010). Аналогичный скрининг компонентов, супрессирующих фенотипический эффект деффекта третьего фактора может быть проведен в более удобной, модельной дрожжевой системе на примере белка Aim23p (Atkinson et al, 2012). Однако при этом необходимо учитывать отличия дрожжевой и человеческой систем митотрансляции.

Данная система позволяет провести исследование активности IF3mt и его производных живой клетке, что имеет важное значение для современной науки и медицины. Данная работа посвящена изучению роли концевых удлинений фактора Aim23p дрожжей *S. cerevisiae* в системе *in vivo*.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Материалы

3.1.1 Оборудование

- Storm Imager 685 (GE Healthcare);
- Автоматические пипетки (Eppendorf);
- Амплификатор C1000 (BioRad);
- Бумага extra thick blot paper;
- Гомогенизатор Fast Prep (MP Biomedicals);
- Гомогенизатор Даунса;
- Источник постоянного тока (BioRad);
- Камера для вертикального электрофореза (BioRad);
- Камера для горизонтального электрофореза (BioRad);
- Качалки культуральные термостатируемые (Infors HT и NBS);
- Колонка microbio-spin 6;
- Колонка для хроматографии 1 мл Ni-NTA sepharose fast flow;
- Кюветы для измерения оптической плотности (Sartsted);
- Кюветы для электропорации (Eppendorf);
- Ламинар (BioSan);
- Магнитная мешалка;
- Микроцентрифуга-вортекс FV-2400 с роторами для микроцентрифужных пробирок и микропробирок в «стрипах» (BioSan);
- Штатив для пробирок и микропробирок в «стрипах» (BioSan);
- Насос перистальтический (KNF);
- Мембрана Hybond-N+ (GE Healthcare);
- Нитроцеллюлозная мембрана;
- Прибор для электропереноса (BioRad);
- Прибор для электропорации *E. coli* Pulser (BioRad);
- Прибор Typhoon для проявления экрана для радиоавтографирования (GE Healthcare);
- Прибор для создания градиента;
- Стеклянные шарики «ColiRoller» (Novagen);
- Сухожаровый шкаф ED-115 (Binder);

- Термостат водяной Sky Line TW2.03 (Elmi);
- Фильтры Millex-GS на 0.22 мкм и 0.45 мкм (Millipore);
- Прибор для создания градиентов и фракционирования Gradient Station (BioComp);
- Спектрофотометр NanoPhotometer™ P 330 для измерения в УФ/видимом спектре в нанообъёмах (Implen);
- Спектрофотометр для измерения оптической плотности культуры;
- Стаканы для гибридизации;
- Микропланшетный ридер Tecan Infinite;
- Термостат твердотельный СН-100 (BioSan);
- Термостат воздушный;
- Трансиллюминатор UVR;
- Хроматограф AKTA purifier;
- Центрифуга для низкоскоростного центрифугирования K70D (MLW Janetzki);
- Центрифуга для высокоскоростного центрифугирования Allegra 64R (Beckman);
- Центрифуга для пробирок объёмом 1,5 – 2 мл (Eppendorf centrifuge 5417R);
- Цифровой ультразвуковой дезинтегратор (Branson);
- Шейкер BioSan.

3.1.2 Растворы

- 50 % раствор PEG400;
- 1M раствор IPTG;
- Буфер для ускоренного гидролиза ДНК (Thermo Scientific);
- Буфер для Т4 ДНК-лигазы (10-кратный): 400 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl2, 100 mM DTT, 5 mM ATP (Thermo Scientific);
- Раствор 1M LiAc;
- Раствор бромистого этидия (1%);
- Раствор ДНК спермы лосося (2 мг/мл);
- Буфер для выделения митохондрий при получении митохондриальной РНК: 0,6 M mannitol, 20 mM HEPES KOH pH 7,4, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 г/л BSA;
- Буфер для ресуспендирования митохондрий: 0,6 M mannitol, 20 mM HEPES KOH pH 7,4;
- Тризол;
- Формальдегид 37%;

- Хлороформ 100%;
- Раствор гликогена 20 мг/мл;
- Раствор для амплификации: 75 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 20 mM (NH4)2SO4, 0.01 % (v/v) Tween 20, 2.5 mM MgCl2, по 200 nM ATP, GTP, TTP, CTP, 2.5 единицы смеси Taq/Pfu ДНК-полимераз;
- Буфер для разделения РНК: 0,5x MOPS, 2,6 M formaldehyde, 2,2 M formamide;
- FGRB: 0,2 M MOPS (pH 7,0), 0,1 M AcONa, 50 mM EDTA;
- Буфер для полинуклеотидкиназы (Fermentas);
- Буфер для Northern blot гибридизации: 0,1% SDS, 5x Denhardt`s solution, 5xSSC;
- Denhardt`s solution (100X): 2% Ficoll 400, 300mM NaCl, 2% polyvinylpyrrolidone, 2% BSA;
- SSC (20X): 0.3 M sodium citrate, 3 M NaCl;
- TBE (10X): 0,89 M Tris base, 0,89 M boric acid, 20 mM EDTA, pH 8.0;
- Inoue transformation buffer: 10 mM PIPES pH 6,7, 55 mM $MnCl_2x4H_2O$, 15 mM $CaCl_2x2H_2O$, 250 mM KCl;
- 10% раствор глицерина;
- Раствор для скрининга дрожжей: 0,2 M LiAc, 1% SDS;
- Буфер для выделения митохондрий при получении митохондриальных белков: 20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 0,6 M sorbitol, 1 mM PMSF;
- Буфер Laemmli: 60 mM Tris pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 2,5% β-mercaptoethanol, 0,02% bromophenol blue;
- TS: 47.9 mM Tris-base, 38.6 mM glycine, 0.0385% SDS, 20% methanol;
- PBS: 1.7 mM KH_2PO_4, 5.2mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl;
- PBST: PBS, 0,1% Tween;
- Вторичные антитела для Вестерн-блота: ECL Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey);
- ECL SuperSignal (Thermo Fisher Scientific);
- Проявитель фирмы Kodak;
- Фиксатор фирмы Kodak;
- Раствор 10% арабинозы;
- Раствор 10% глюкозы;
- LLP+: 10 mM TrisHCl pH 7,0, 60 mM KCl, 60 mM NH_4Cl, 5 mM $Mg(oAc)_2$, 7 mM β-меркаптоэтанол, 0,25 mM ЭДТА;
- Раствор для трансдукции: 10 mM $CaCl_2$, 5mM $MgSO_4$;

- Раствор 1 М цитрата натрия pH 5,5;
- Раствор 1 для очистки рекомбинантного белка: 25 mM sodium phosphate buffer pH 7,4, 500 mM NaCl, 25 mM imidasole;
- Натрий фосфатный буфер: 1 М Na_2HPO_4, М NaH_2PO_4;
- Раствор 2 для очистки рекомбинантного белка: 25 mM sodium phosphate buffer pH 7,4, 500 mM NaCl, 300 mM imidasole.

3.1.3 Коммерческие наборы

- Набор для очистки ПЦР-продуктов «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen);
- ДНК-маркеры 1kb Ladder (Fermentas);
- Белковые маркеры (Fermentas);
- Набор для выделения ДНК из агарозного геля «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen);
- Набор для выделения плазмидной ДНК «QIAprep Spin Miniprep Kit» (Qiagen).

3.1.4 Штаммы

E. coli

- MG 1655 (K-12 F^- λ^- ilvG$^-$ rfb-50 rph-1);
- Top10 (F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^-);
- Rosetta (DE3) pLysS (F^- ompT $hsdS_B$(R_B^- m_B^-) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam^R);
- BY4743 MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0.

S. cerevisiae

- D273-10B – MATα mal;
- Dau1 MATα mal, ade2, ura3 (D273-10B derivative);
- DUL2 Mat a, lys2, ura3 (D273-10B derivative).

3.1.5 Плазмиды

- pRS317;
- pACDH;
- pBAD;
- pKD46;
- pKD3;
- pET32a.

3.1.6 Антибиотики

- Карбенициллин;
- Хлорамфеникол;
- Тетрациклин;
- Генетицин.

3.1.7 Эндонуклеазы рестрикции

- NdeI;
- XhoI;
- HindIII;
- XbaI;
- EcoRI;
- NcoI.

3.1.8 Питательные среды

- LB (Luria Bertrani): 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% хлорид натрия;
- SOB (super optimal broth): 2% триптон, 0.55% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 20 мМ Mg^{2+};
- TB (terrific broth); 1.2% триптон, 2.4% дрожжевой экстракт, 72мМ K_2HPO_4 и 17мМ KH_2PO_4, 0,4% глицерол;
- YEPD 1%: 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 1% ацетат калия;
- SPM: 0,3% ацетат калия, 0,02% раффиноза;

- YPD: 2% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 2% глюкоза;
- YPGal: 2% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 2% галактоза;
- YPGly: 2% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 3% глицерин;
- CSM-lys: 6.7 г/л дрожжевая азотистая основа (YNB), 2% глюкоза, минимальная синтетическая среда (CSM, complete supplement mixture) без лизина (Таблица 1).

Таблица 1. Состав минимальной синтетической среды CSM без лизина.

компонент	мг/л
L-метионин	20
L-аденин	10
L-фенилаланин	50
L-аргинин	50
L-треонин	100
L-аспартат	80
L-триптофан	50
L-гистидин	20
L-тирозин	50
L-изолейцин	50
L-урацил	20
L-лейцин	100

3.1.9 Программные обеспечения

- Программа Vector NTI.

3.1.10 Олигонуклеотиды

Таблица 2. Олигонуклеотиды для полимеразной цепной реакции.

1	Клонирование *AIM23* в pRS317	pRS317_AIM23_F	gcatAAGCTTggctatcatgcatccattg
2		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
3	Для OE-PCR, синтез продукта с делецией MTS, получение N-фланка *AIM23*.	pRS317_AIM23_F	gcatAAGCTTggctatcatgcatccattg
4		oAIM23_toMTSfromN_rev	atccacggacctgatgtt
5	Для OE-PCR, синтез продукта с делецией MTS, получение фрагмента от N-концевого удлинения до C-фланка *AIM23*	oAIM23_toMTSfromN_fwd	aggtccgtggatATGaatgcatcatctaccacag
6		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
7	Для OE-PCR, синтез продукта с делецией N-	pRS317_AIM23_F	gcatAAGCTTggctatcatgcatccattg

8	концевого удлинения, получение N-фланка и MTS *AIM23*	oAIM23_toNfromORF_rev	gtctctgctgaagtattttg
9	Для OE-PCR, синтез продукта с делецией N-концевого удлинения, получение фрагмента от N-домена до C-фланка *AIM23*	oAIM23_toNfromORF_fwd	tacttcagcagagactggagcaccgggacag
10		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
11	Для OE-PCR, синтез продукта с делецией C-концевого удлинения, получение C-фланка *AIM23*	oAIM23_toCfromFLANK_fwd	aaaggacgttaaaccataaatagaagcaaatgacatcag
12		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
13	Для OE-PCR, синтез продукта с делецией C-концевого удлинения, получение продукта от N-концевого удлинения до C-домена	pRS317_AIM23_F	gcatAAGCTTggctatcatgcatccattg
14		oAIM23_toCfromFLANK_rev	tggtttaacgtcctttggta
15	Для OE-PCR, получение продукта он N-домена до C-домена	oAIM23_toNfromORF_fwd	tacttcagcagagactggagcaccgggacag
16		oAIM23_toCfromFLANK_rev	tggtttaacgtcctttggta
17	Для OE-PCR, синтез гибридного фактора, получение IF3	oAIM23_beginIF3w/o_start_fwd	aaaggcggaaaacgagttc
18		oAIM23_endIF3w/o_stop_rev	ctgtttcttcttaggagcg
19	Для OE-PCR, синтез гибридного фактора, получение N-фланка *AIM23*	pRS317_AIM23_F	gcatAAGCTTggctatcatgcatccattg
20		oAIM23toFlanks_fromIF3_rev	cgttttccgcctttcatatccacggacctgatg
21	Для OE-PCR, синтез гибридного фактора, получение N-фланка и MTS *AIM23*	pRS317_AIM23_F	gcatAAGCTTggctatcatgcatccattg
22		oAIM23toMTS_fromIF3_rev	cgttttccgcctttgtctctgctgaagtatttttgt
23	Для OE-PCR, синтез гибридного фактора, получение IF3, получение фрагмента от N-фланка до N-домена	pRS317_AIM23_F	gcatAAGCTTggctatcatgcatccattg
24		oAIM23toN_fromIF3_rev	cgttttccgcctttagtaatcaggatttttttcctg
25	Для OE-PCR, синтез гибридного фактора, получение IF3, получение C-концевого удлинения и C-фланка *AIM23*	oAIM23_toIF3_fromC_fwd	tcctaagaagaaacagcaaaacaacgataagag
26		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
27	Для OE-PCR, синтез гибридного фактора, получение IF3, получение C-фланка *AIM23*	oAIM23_toIF3_fromFlank_ fwd	tcctaagaagaaacagtaaatagaagcaaatgacatcagaat
28		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
29	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt во фланках *AIM23*, получение N-фланка и MTS *AIM23*	pRS317_AIM23_ApaI_F	gcatGGGCCCggctatcatgcatccattg
30		h_mtIF3_N_rev	tgtgctggtgctgtgtctctgctgaagtatttg

31	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt во фланках *AIM23*, получение человеческого IF3mt	h_mtIF3_N_fwd	acagcaccagcacagttg
32		h_mtIF3_C_rev	gtcatttgcttctatttactgatgcagaacatttgattc
33	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt во фланках *AIM23*, получение IF3mt без C-участка	h_mtIF3_C_fwd	taaatagaagcaaatgacatca
34		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
35	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt без N-концевого удлинения во фланках *AIM23*, получение N-фланка и MTS *AIM23*	pRS317_AIM23_ApaI_F	gcatGGGCCCggctatcatgcatccattg
36		mtIF3_h_ORF_rev	ccttcattctgggtgtctctgctgaagtatttttg
37	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt во фланках *AIM23*, получение фрагмента от N-домена mtIF3 до C-фланка *AIM23*	mtIF3_h_ORF_fwd	acccagaatgaaggaaaaaag
38		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
39	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt во фланках *AIM23*, получение фрагмента от N-фланка *AIM23* до C-домена IF3mt	pRS317_AIM23_ApaI_F	gcatGGGCCCggctatcatgcatccattg
40		mtIF3_h_dC_rev	tttgctgaaagcacgaagaa
41	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt во фланках *AIM23*, получение C-фланка *AIM23*	mtIF3_h_dC_fwd	cgtgctttcagcaaataaatagaagcaaatgacatcag
42		pRS317_AIM23_R	gcaTCTAGAcagcatttcggggcaac
43	Для OE-PCR, синтез модифицированного человеческого IF3mt с делецией N- и C-концевых участков во фланках *AIM23*, получение фрагмента от N-домена до C-домена	mtIF3_h_ORF_fwd	acccagaatgaaggaaaaaag
44		mtIF3_h_dC_rev	tttgctgaaagcacgaagaa
45	Для скрининга генов pRS317	M13_fwd	gtaaaacgacggccagt
46		M13_rev	ggaaacagctatgaccatg
47	Для получения кассеты KanMX4	KanMX_Aim23mod_fwd	cccgcgacggtaagaacttta
48		KanMX_Aim23mod_rev	gaatcctggtactttaatgataag
49	Для скрининга замены гена кассетой KanMX4	AIM23upfl_668_fwd	gaattaacccctcatatcatctcaaagaccg
50		KanMX4_id_rev	gagggtattctgggcctccatgtc
51	Для получения гена IF3 для эксперимента в *E. coli*	IF3_Ec_pACDH_fwd	tcagccatggctaaaggcggaaaacgagttc
52		IF3_Ec_pACDH_rev	tcaggaattcctactgtttcttcttaggagcga
53	Для получения гена *AIM23*ΔNΔC для эксперимента в *E. coli*	AIM23_DNDNC_pACDH_fwd	tcagccatggcttggagcaccgggaca
54		AIM23_DNDNC_pACDH_rev	tcaggaattcctatggtttaacgtcctttggta

55	Для получения гена *AIM23* для эксперимента в *E. coli*	Aim23full_pACDH_fwd	tcagccatggctaatgcatcatctaccac ag
56		Aim23full_pACDH_rev	tcaggaattcctacatttcattcatttttttct ctg
57	Для получения кассеты CAT	infC_cat_short_fwd	tgcaacaagagattcgcagccgcagtctt aaac
58		infC_155aa_cat_short_rev	ccattatacgacaaaccggcggctcggc gttag
59	Для скрининга дизрупции *E. coli* и трансдукции. ПЦР-продукт образуется только в случае сохранения IF3	IF3_internal_fwd	caggaagttcgcttaacagg
60		IF3_181down_rev	ggttagcgtgcttgtgc
61	Для скрининга дизрупции *E. coli* и трансдукции. Праймеры отжигаются на фланки. ПЦР-продукт при делеции и при сохранении IF3 различаются по размеру	IF3_75up_fwd	gacgtaaatgaagtgatcgagaag
62		IF3_181down_rev	ggttagcgtgcttgtgc
63	Для экспрессии Aim23p	Aim23_NdeI_fwd	gactCATATGaatgcatcatctacca caga
64		Aim23_XhoI_rev	ctagCTCGAGcatttcattcatttttttc tct
65	Для экспрессии Aim23p без Концевых участков	Aim23_N_NdeI_fwd	gactCATATGtggagcaccgggac aga
66		Aim23_C_XhoI_rev	ctagCTCGAGtggtttaacgtcctttg gta
67	Для экспрессии IF3 *E. coli*	IF3_NdeI_fwd	atgcCATATGaaaggcggaaaacg agttc
68		IF3_XhoI_rev	actgCTCGAGctgtttcttcttaggag cg
69	Для скрининга экспрессионного вектора	T7t	gctagttattgctcagcgg
70		pETupst	atgcgtccggcgtaga
71	Для Нозерн-блот гибридизации	VAR1	gaccaatccggtgaacaaccggattggc
72		COX1	gcacccattgataatacatagtgaaaatg tccca ccacgtag
73		COX2	aactcagaacatgctccatagaagacac
74		COX3	taccagcatagaatactgaaccataaacac
75		COB	agtattacctcttactacacttctatcagta
76		ATP6/8	gaatcattaataagaaaccatatgttaatt gattca taaaataaaatggaactaattgtggc
77		ATP9	tactaggtctttaattgatgggtttctt
78		21S rRNA	ctatattaccctgttatccctagcgtaact

3.2 МЕТОДЫ

3.2.1 Споруляция и деление тетрад

Штамм *S. cerevisiae* D273-10B выращивали в питательной среде YEPD 1% в течение 24 часов. Полученную культуру пересевали на агаризованную споруляционную среду SPM и инкубировали 120 часов. Небольшое количество клеток переносили в раствор следующего состава: 20 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,2, 0,5 мг/мл зимолиаза, 1,2 М сорбитол. 20 мкл суспензии переносили на чашку Петри с селективной средой и проводили деление тетрад на установке для микродиссекции (Singer Instruments).

3.2.2 Химическая трансформация *S. cerevisiae* плазмидной ДНК

Штамм дрожжей (Dul2 или Dau1) засевали в 2 мл питательной среды YPD (при необходимости добавляли антибиотик) и выращивали при 30ºС в течение ночи. Культуру разводили до значения оптической плотности 0,2 с расчетом 5 мл культуры на одну реакцию. Инкубировали при перемешивании при 30ºС до значения OD_{600} 0,8-1,0, клетки собирали с помощью центрифугирования при 3000×g в течение 5 минут при 4 ºС. Далее все процедуры проводили на льду. Осадок дважды промывали деионизованной водой, максимально избавлялись от остатков жидкости. Осадок ресуспендировали реакционной смеси (см. Таблицу 3).

Таблица 3. Состав реакционной смеси для химической трансформации *S. cerevisiae*.

50 % раствор PEG400	240 мкл
Раствор 1М LiAc	36 мкл
Раствор ДНК спермы лосося (2 мг/мл)	50 мкл
Плазмидная ДНК	600 нг
Суммарный объем	360 мкл

Тепловой шок проводили при 42ºС в течение 40 минут. Клетки собирали центрифугированием при 12000×g 20 секунд, ресуспендировали в 100 мкл деионизованной воды и высевали на чашки Петри с селективной питательной средой.

3.2.3 Дизрупция гена в клетках *S. cerevisiae*

Кассету KanMX4 для дизрупции получали с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовали дрожжи штамма BY4743. Кассета состояла из гена устойчивости к генетицину, фланкированного участками ДНК, расположенными выше и ниже гена *AIM23*. Таким образом, в ходе рекомбинации ген *AIM23* заменялся на ген устойчивости к генетицину.

Проводили химическую трансформацию (см. выше), в реакционную смесь добавляли около 3000 нг кассеты KanMX4. После теплового шока клетки собирали с помощью центрифугирования и дважды промывали деионизованной водой, а затем ресуспендировали в 1 мл среды YPD и инкубировали 4 часа при 37ºC при 200 rpm. Суспензию осаждали и высевали на чашки Петри с YPD с добавлением генетицина в концентрации 400 мкг/мл.

3.2.4 Выделение митохондрий *S. cerevisiae* для получения митохондриальной РНК

Штаммы *S. cerevisiae* Dau1 и Dau1ΔAIM23 инкубировали в среде YPGly до значения оптической плотности 2-3. Культуру объемом 1 литр центрифугировали в течение 5 минут при 3000×g, осадок дважды промывали деионизованной водой. Осадок взвешивали и ресуспендировали в буфере для выделения митохондрий (0,6 M mannitol, 20 mM HEPES KOH pH 7,4, 2 mM ЭГТА, 1 mM PMSF, 1 г/л BSA) с расчетом 2 мл буфера на 1 грамм клеток. К осадку добавляли шарики для разрушения клеток (диаметр 0,44-0,45 мм) в объеме равном 2/3 объема осадка. Далее все процедуры проводили при охлаждении. Клетки разрушали в гомогенизаторе, разрушение проводили со скоростью 4 м/с в течение 15 секунд дважды с перерывом в 2 минуты. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 минут при 1000×g, супернатант переносили в чистую пробирку. Шарики несколько раз промывали буфером от остатков клеточного лизата, и полученную смесь также переносили в пробирку. Раствор центрифугировали 15 минут при 12000×g. Аккуратно смывали буфером загрязнения с осадка митохондрий, органеллы ресуспендировали в 1 мл буфера следующего состава: 0,6 M mannitol, 20 mM HEPES KOH pH 7,4.

Для выделения РНК суспензию осаждали 3 минуты при 18000×g при 4°C и удаляли супернатант.

3.2.5 Выделение РНК из митохондрий

Для выделения РНК фракцию митохондрий, полученную с 300 мл дрожжевой культуры, растворяли в 1,5 мл тризола и ресуспендировали до прозрачности раствора. Смесь центрифугировали в течение 10 минут при 12000×g при 4°C. К супернатанту добавляли хлороформ с расчетом 0,2 мл хлороформа на 1 мл тризола. Перемешивали в шейкере в течение 15 секунд. Раствор инкубировали в течение 2-3 минут при комнатной температуре, а затем осаждали в течение 10 минут при 12000×g при 4°C. Из полученной смеси отбирали верхнюю фракцию и добавляли к ней 2 мкл гликогена с концентрацией 20 мг/мл и изопрпанол с расчетом 0,5 мл изопропанола на 1 мл тризола. Смесь инкубировали

10 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 12000×g при 4°C. Осадок, состоящий из молекул РНК, дважды промывали 75% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 20 мкл деионизованной воды.

3.2.6 Нозерн-блот гибридизация

Образцы РНК готовили к разделению в буфере следующего состава: 0,5x MOPS, 2,6 М формальдегид, 2,2 М формамид. Смесь инкубировали 15 минут при 65°C, затем охлаждали на льду. Перед нанесением к смеси добавляли бромфеноловый синий и ксиленцианол.

Разделение молекул РНК проводили в денатурирующем агарозном геле следующего состава: 1xFGRB, 1% агароза, 2,4 М формальдегид при напряжении 130 В.

Гель отмывали 10 минут в деионизованной воде, а затем дважды – в буфере SSC. Перенос РНК на мембрану Hybond-N+ проводили в течение 12 часов, а затем фиксировали с помощью действия ультрафиолетового света по 3 минуты с каждой стороны мембраны. Для дальнейшего эксперимента мембрану разделяли на отдельные полосы, каждая из которых включала в себя две дорожки: РНК штамма дикого типа и штамма с делецией гена *AIM23*.

В качестве метки для гибридизации использовали олигонуклеотиды, комплементарные РНК, закодированным в митохондриальном геноме. Мечение олигонуклеотидов проводили с помощью 32γ-АТФ при участии полинуклеотидкиназы фирмы Fermentas по фирменному протоколу. Полученную метку очищали на колонке microbio-spin 6.

Для проведения гибридизации полосы мембраны помещали в стаканы для гибридизации, добавляли 10 мл буфера для гибридизации (0,1% SDS, 5x Denhardt`s solution, 5xSSC) и инкубировали при медленном перемешивании при 60°C не менее 20 минут. Затем добавляли меченые олигонуклеотиды и проводили отжиг метки при 42°C в течение 12 часов. Для удаления остатков метки мембрану промывали дважды по 5 минут при перемешивании в буфере следующего состава: 1% SDS, 2xSSC, а затем в буфере с 1xSSC и 0,1xSSC. Радиоактивное излучение детектировали на приборе Storm Imager 685 (GE Healthcare).

3.2.7 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для проведения амплификации готовили реакционную смесь следующего состава: 75 мМ Трис-HCl (pH 8.8 при 25°C), 20 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.01 % (v/v) Tween 20, 2.5 мМ $MgCl_2$, по 200 нМ АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ, 2.5 единицы смеси Taq/Pfu ДНК-полимераз.

Полимеразу Pfu добавляли в случаях, когда необходима повышенная точность синтеза. Соотношение Pfu:Taq составляло 1:100. К реакционной смеси добавляли в качестве матрицы 100 – 200 нг геномной ДНК или 10 – 20 нг плазмидной ДНК, а также по 300 – 500 нМ праймеров. В таблице 4 представлены параметры ПЦР.

Таблица 4. Параметры полимеразной цепной реакции.

Стадия	**Температура, °С**	**Продолжительность, сек**	**Количество циклов**
Первичная денатурация	95	180	1
Денатурация	95	15	10-30
Отжиг праймеров	Температура отжига праймеров	15-30	
Синтез	72	30 сек на 1 тыс. нуклеотидов	
Финальный синтез	72	300	1

При различиях в температуре отжига праймеров реакцию проводили при более низкой температуре. Для проведения амплификации использовали прибор «C1000» фирмы BioRad.

3.2.8 Перекрестная ПЦР («overlap extension»)

Гены *AIM23* и человеческого IF3mt, содержащие различные сочетания концевых участков, а также ген гибридного фактора, состоящего из гена IF3 *E. coli*, фланкированного концевыми участками *AIM23*, получали с помощью метода перекрестной ПЦР. На первом этапе синтезировались фрагменты, необходимые для соединения. Праймеры зоны сшивки одного из фрагментов содержат участок начала второго фрагмента, таким образом, после амплификации в конце одного из сшиваемых участков оказаывается фрагмент начала второго участка. Затем проводили перекрестный ПЦР, благодаря которому данные участки соединялись (Рис. 14).

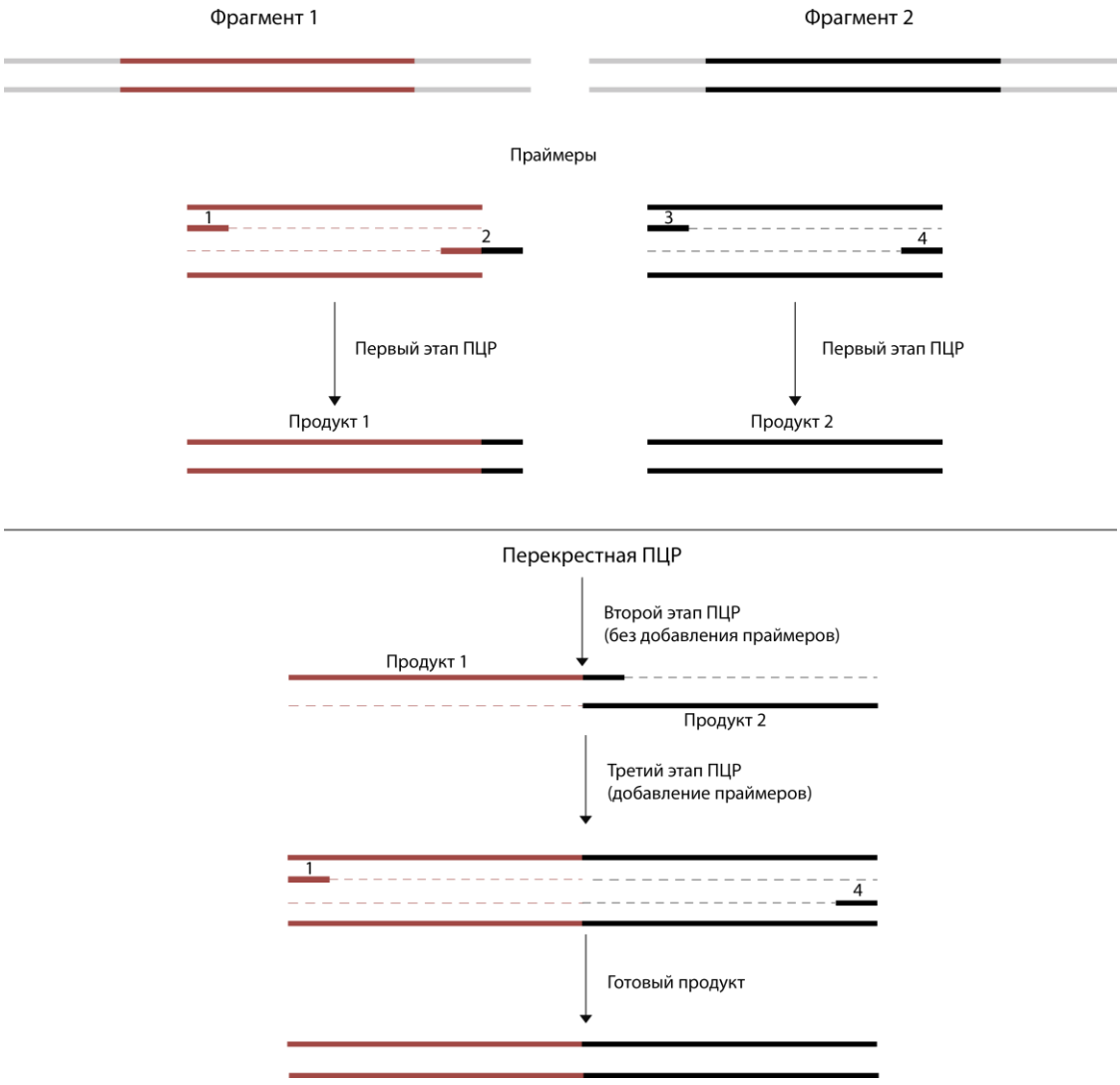

Рисунок 14. Схема перекрёстной ПЦР. Номерами 1, 2, 3 и 4 обозначены праймеры. Пунктирными линиями показано направление синтеза. Праймеры комплементарны участку фрагмента такого же цвета.

3.2.9 Очистка фрагментов ДНК после ПЦР

Очистку ПЦР-продуктов проводили с помощью набора «QIAquick PCR Purification Kit» фирмы Qiagen в соответствии с протоколом.

3.2.10 Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле в нативных условиях

Разделение нуклеиновых кислот проводили в 1% агарозном геле, приготовленном на основе 0,5х буфера TBE с добавлением 1 мг/л бромистого этидия при напряжении 5 В/см. В качестве маркеров использовали маркеры 1kb Ladder фирмы Fermentas. Анализ проводили с помощью трансиллюминатора.

3.2.11 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Участки геля, содержащие ДНК, вырезали с помощью стерильного скальпеля, а затем проводили очистку с помощью набора «QIAquick Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen в соответствии с протоколом.

3.2.12 Переосаждение ДНК этиловым спиртом

К раствору ДНК добавляли деионизованную воду до общего объема 100 мкл. В качестве соосадителя использовали гликоген в концентрации около 1 мкг/мкл. К раствору ДНК с гликогеном добавляли 1/10 объема раствора 3М ацетата натрия pH 5,2 и 3 объема 96% этилового спирта. Смесь центрифугировали в течение 15 минут при 25000×g при 4ºС. Супернатант сливали, к осадку добавляли ½ общего объема 80% спирта и центрифугировали 5 минут в тех же условиях. Супернатант удаляли, осадок сушили и растворяли в необходимом количестве буфера или деионизованной воды.

3.2.13 Разрезание ДНК эндонуклеазами рестрикции и лигирование

Молекулы ДНК разрезали с помощью эндонуклеаз рестрикции для ускоренного гидролиза в универсальном буфере FastDigest фирмы Fermentas в соответствии с инструкцией. Для инактивации эндонуклеаз рестрикции смесь инкубировали 10 минут при 80ºС.

Для проведения реакции лигирования в смесь добавляли АТФ до концентрации 0,5 мМ и 0,3 u/мкл Т4 ДНК-лигазы фирмы Fermentas, инкубировали 30 минут при 22 ºС. Для инактивации ферментов смесь инкубировали 5 минут при 70ºС.

Молярное соотношение вектор: ген во время клонирования составляло 1:3-1:5 в расчете на 50 нг вектора.

3.2.14 Химическая трансформация *E. coli*

Приготовление химически компетентных клеток

Клетки штамма *E. coli* Top10 засевали в 25 мл среды LB и инкубировали 7,5 часов при 37ºС при перемешивании в 250 rpm. Полученную суспензию засевали в 250 мл питательной среды SOB в объеме 500 мкл, инкубировали при 18ºС при 200 rpm до значения оптической плотности 0,55. Далее все процедуры проводили при 4ºС. Клетки на 10 минут переносили на лед, а затем собирали с помощью центрифугирования при 2500×g 10 минут. Супернатант сливали, давали стечь остаткам жидкости 2 минуты. Осадок аккуратно ресуспендировали в 80 мл Inoue transformation buffer (10 mM PIPES pH 6,7, 55 mM $MnCl_2x4H_2O$, 15 mM $CaCl_2x2H_2O$, 250 mM KCl), центрифугировали в тех же

условиях, удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 20 мл буфера, по каплям добавляли 1,5 мл DMSO при перемешивании. Смесь инкубировали 10 минут на льду, затем готовили аликвоты по 200 мкл и замораживали с помощью жидкого азота. Хранили при температуре -80ºС, перед использованием аликвоты размораживали на льду.

Процедура трансформации

К размороженной аликвоте клеток добавляли плазмиду, аккуратно ресуспендировали и инкубировали 30 минут на льду. Тепловой шок проводили при 42ºС 30 секунд, затем добавляли 1 мл теплой жидкой среды LB и инкубировали 40 минут при 37ºС. Клетки высевали на чашки Петри с селективной питательной средой.

3.2.15 Электропорация клеток *E. coli*

Приготовление компетентных клеток

Клетки штамма засевали в жидкую среду LB и инкубировали в течение 12 часов при 37ºС. Культуру разводили до значения OD_{600} 0,2 с расчетом 2 мл на реакцию и инкубировали при 37ºС при перемешивании в 180 rpm до OD_{600} 0,6-0,8. Далее процедуры проводили на льду. Клетки осаждали 5 минут при 4500×g, промывали один раз деионизованной водой, а затем ½, ¼ и 1/8 объема 10% глицерола. Клетки с 2 мл культуры ресуспендировали в 50 мкл 10% глицерола.

Процедура трансформации

К аликвоте компетентных клеток добавляли раствор ДНК, аккуратно ресуспендировали и проводили электропорацию в кюветах с шириной щели 0,2 см при напряжении 2,5 кВ и сопротивлении 25 мкФ (сила электрического поля 12500 $В \times см^{-1}$). К суспензии добавляли 1 мл жидкой среды LB и инкубировали 40 минут при 37ºС. Клетки высевали на чашки Петри с селективной питательной средой.

3.2.16 Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit фирмы Qiagen в соответствии с инструкцией.

3.2.17 Подготовка штаммов дрожжей к скринингу

Небольшое количество клеток ресуспендировали в 100 мкл раствора следующего состава: 0,2 М LiAc, 1% SDS. Смесь инкубировали 5 минут при 70ºС, добавляли 300 мкл 96% этилового спирта, а затем центрифугировали 3 минуты при 15000×g. Тщательно

отбирали супернатант, осадок промывали в 300 мкл 70% спирта и центрифугировали в тех же условиях. Супернатант отбирали, осадок ресуспендировали в 10 мкл деионизованной воды. Перед добавлением в смесь для амплификации раствор центрифугировали 15 секунд при 15000×g и отбирали для реакции 2 мкл супернатанта с растворенной ДНК.

3.2.18 Анализ роста дрожжей на селективных твердых средах

Штамм дрожжей засевали в 2 мл жидкой питательной среды и инкубировали при 30ºC в течение 12 часов. Отбирали 1 мл культуры и центрифугировали при 3000×g 5 минут, дважды промывали стерильной деионизованной водой и ресуспендировали в 1 мл воды. Измеряли оптическую плотность суспензии при длине волны 600 нм и разводили до значений OD 0,1, 0,01 и 0,001. На чашки Петри, содержащие различные агаризованные питательные среды высевали по 5 мкл полученных суспензий и инкубировали при 30ºC. Каждые 24 часа фиксировали рост дрожжей.

3.2.19 Подготовка клеточных лизатов к Вестерн-блот анализу

Клетеки дрожжей выращивали в 10 мл жидкой селективной питательной среды. Клетки собирали с помощью центрифугирования при 3000×g в течение 5 минут, разводили в буфере PBS в объеме, равном двум объемам клеточной массы, а также добавляли шарики для разрушения клеток (диаметр 0,44-0,45 мм) в объеме равном объему осадка. Клетки разрушали при помощи гомогенизатора MP Fast Prep при скорости 4 м/с в течение 30 секунд дважды. Раствор центрифугировали при 16000×g в течение 5 минут и измеряли количество белка в супернатанте по методу Бредфорда. Для Вестерн-блот детекции использовали объем жидкости, содержащий 10 нг белка.

3.2.20 Выделение митохондрий *S. cerevisiae* для получения митохондриальных белков

Штамм дрожжей засевали в 150 мл питательной среды YPGal и выращивали при 30ºC до значения оптической плотности 3. Клетки собирали с помощью центрифугирования при 3000×g в течение 5 минут, промывали 300 мл стерильной деионизованной воды и осаждали центрифугированием в тех же условиях. Далее все процедуры проводили при 4ºC. Осадок взвешивали и добавляли с расчетом 2 мл на 1 г клеток буфер следующего состава: 20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 0,6 M sorbitol, 1 mM PMSF, а также шарики для разрушения клеток (диаметр 0,44-0,45 мм) в объеме равном объему осадка. Клетки разрушали при помощи гомогенизатора MP bast prep при скорости 4 м/с в течение 20 секунд дважды. Собирали жидкую фракцию в отдельную пробирку. Шарики несколько раз промывали буфером, переносили жидкость с обломками клеток в

пробирку. Суспензию центрифугировали 3000×g 5 минут, супернатант переносили в пробирку для высокоскоростного центрифугирования. Митохондрии осаждали при 12000×g 15 минут, лишние остатки клеток смывали с осадка буфером и ресуспендировали фракцию митохондрий в 150 мкл буфера. Для дополнительной очистки использовали гомогенизатор Даунса.

3.2.21 Подготовка митохондриальных белков к Вестерн-блот анализу

Фракцию митохондрий, содержащую 100 мкг белка центрифугировали 5 минут при 18000×g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 40 мкл буфера Laemmli, прогрвали 3-5 минут при 95ºC. 6 мкл смеси наносили на 12% полиакриламидный гель и проводили электрофоретическое разделение молекул при постоянной силе тока 25 mA.

3.2.22 Вестерн-блот анализ

Гель с митохондриальными белками инкубировали 15 минут в TS буфере. Нитроцеллюлозную мембрану и тщательно смачивали буфером TS и помещали на полиакриламидный гель. Конструкцию проложили сверху и снизу смоченной TS буфером бумагой extra thick blot paper, с помощью шпателя Дригальского удаляли пузырьки воздуха. Перенос проводили в приборе для полусухого переноса в течение 30 минут при напряжении 25В. Проверку эффективности переноса проводили с помощью окрашивания мембраны красителем Poncean S.

Отмытую от красителя мембрану инкубировали 30 минут в буфере PBS с 5% молоком, а затем промывали буфером PBST. Растворяли в PBST первичные антитела против Aim23p (α-AIM23 serum) и инкубировали в этой смеси мембрану при перемешивании 70-80 rpm 30-60 минут. Мембрану трижды промывали PBST в течение 5 минут, а затем инкубировали 30 минут в буфере PBST с растворенными вторичными антителами (ECL Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody) при перемешивании в тех же условиях. Мембрану трижды отмывали буфером PBST, а затем инкубировали 5 минут в растворе ECL, сливали излишки смеси и заворачивали в пленку. При красном свете мембрану перенесли на фотопленку, время экспозиции составляло 1-10 минут. Фотопленку перенесли в проявитель фирмы Kodak, затем промыли дистиллированной водой и переносили в раствор фиксатора. Пленку промывали и высушивали.

3.2.23 Дизрупция гена IF3 в клетках *E. coli*

Штамм *E. coli*, несущий плазмиду с геном рекомбиназы под контролем арабинозного промотора, засевали в среду LB с добавлением антибиотиков и растили 12 часов. Культуру разводили в 200 раз с расчетом 10 мл на одну реакцию и инкубировали в среде SOB с добавлением антибиотиков и 10 mM арабинозы при 30ºC до значения OD_{600} 0,6-0,8. Далее все операции проводили при 4ºC. Клетки собрали с помощью центрифугирования 5 минут при 4000×g. Осадок промыли 1, ½ и ¼ объемами 10% глицерола. Клетки, полученные с 10 мл культуры ресуспендировали в 50 мкл глицерола. Добавили 100 нг кассеты, несущей ген устойчивости к хлорамфениколу, проводили электропорацию, затем клетки ресуспендировали в среде SOB с 0,1 mM IPTG и инкубировали 2 часа. Половину клеток высевали на чашки Петри со средой LB, содержащий тетрациклин, хлорамфеникол и 0,5 мМ IPTG. Инкубировали при 37ºC, а затем проводили скрининг клонов.

3.2.24 Скрининг и штаммов после дизрупции и трансдукции

Скрининг проводили с помощью двух пар праймеров: IF3_75up_fwd и IF3_181down_rev, IF3_internal_fwd и IF3_181down_rev. Первая праймеров отжигается на фланках IF3, что позволяет нам точно получить продукт амплификации. ПЦР-продукт фрагмента, в котором произошла замена IF3 на ген устойчивости к хлорамфениколу, будет отличаться по размеру от исходного. В случае второй пары, один из праймеров отжигается внутри удаляемого региона. Таким образом, в случае удачного прохождения трансдукции этот продукт будет отсутствовать.

3.2.25 Получение лизата P1

50 мкл культуры бактерий инокулировали в 5 мл питательной среды LB, содержащей 0,2% глюкозы и 5 mM $CaCl_2$. Смесь инкубировали при перемешивании 1 час при 37ºC. Добавляли 100 мкл бактериофага P1. Инкубировали при перемешивании 3 часа при 37ºC. Суспензию центрифугировали 10 минут при 9200×g, отобрали бактериофаги, находящиеся в верхней фракции, и избавлялись от остатков клеток с помощью фильтра с порами диаметром 0,45 мкн.

3.2.26 Трансдукция

2 мл бактериальной культуры осаждали с помощью центрифугирования 2 минуты при 14100×g. Клетки ресуспендировали в 1 мл следующего раствора: 10 mM $CaCl_2$, 5mM $MgSO_4$. К 100 мкл аликвотам добавляли 1, 10 или 100 мкл лизата P1 и инкубировали 30 минут при 37 ºC без перемешивания. Реакцию останавливали добавлением 1 мл LB и 200

мкл 1 М цитрата натрия pH 5,5, инкубировали 1 час при 37 ºС при 170 rpm. Клетки собирали с помощью центрифугирования и высевали на чашки Петри с питательной средой LB с добавлением 6,25 мкг/мл тетрациклина, 34 мкг/мл хлорамфеникола, 50 мкг/мл карбенициллина, 0,02% арабинозы и 5мМ цитрата натрия. Проводили 3 пересева полученных клонов на аналогичной среде, а затем проводили скрининг.

3.2.27 Скрининг клонов

Поиск клонов, в которых ген *AIM23* заменён на кассету KanMX4 проводили с помощью ПЦР с праймерами Aim23upfl_668fwd и KanMX4_id_rev.

3.2.28 Получение рекомбинантных белков

Для экспрессии использовали штамм *E. coli* Rosetta. Экспериментальные гены были внесены в клетки экспрессионного штамма в составе вектора pET32a, содержащего ген устойчивости к ампициллину. Штаммы выращивали в 200 мл среды ТВ при 37°С до значения оптической плотности 0,7-1. Экспрессию индуцировали добавлением 0,25 mM IPTG и проводили в течение 4 часов при температуре 30°С. Суспензию центрифугировали 5 минут при 4500×g, осадок промывали буфером PBS. Клетки собирали с помощью центрифугирования и замораживали с помощью жидкого азота, хранили при температуре -80°С.

Размороженные осадки ресуспендировали в буфере следующего состава: 25 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,4, 500 мМ NaCl, 25 мМ имидазол. Растворение осадка проводили из расчета 20 мл буфера на 1 литр культуры бактерий. Разрушение клеток проводили с помощью воздействия ультразвука (20% амплитуда, импульс 10 секунд) и центрифугировали 25 минут часов при 25000×g при 4 ºС. Очистку рекомбинантных белков проводили на хроматографе AKTA purifier с применением колонки 1 мл Ni-NTA sepharose fast flow. Элюировали белки буфером следующего состава: 25 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,4, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол.

3.2.29 Связывание факторов с рибосомой *E. coli*

При охлаждении смешивали 25 pmol рибосом и 250 pmol белка в буфере LLP+, инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем смесь разделяли с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы от 10 до 40% в буфере LLP+. Образец центрифугировали в градиенте 18 часов при 80000×g при 4ºС. Аликвоты отбирали с помощью фракционатора.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Разбалансировка трансляции при делеции Aim23p не связана с процессом транскрипции

Как уже упоминалось, дрожжевой митохондриальный белок Aim23p является ортологом третьего фактора инициации трансляции бактерий и кодируется геном *AIM23*. Ген *infC*, кодирующий бактериальный IF3, является геном домашнего хозяйства, его делеция является летальной для организма, и можно было бы ожидать, что удаление *AIM23* из генома дрожжей будет приводить к полной остановке работы митохондрий. Однако было обнаружено, что данная модификация генома приводит не к остановке роста дрожжей, а вызывает лишь его задержку на среде с несбраживаемым источником углерода, для роста на которой необходимо наличие функционально-активных митохондрий. Было выдвинуто предположение, что данная задержка роста связана с медленной адаптацией штамма к изменившимся условиям, однако что именно происходит внутри клеток, оставалось неясным.

Дрожжевая мтДНК кодирует всего лишь 8 белков, что позволяет легко проанализировать эффективность синтеза каждого из них. Согласно проведенным исследованиям, делеция *AIM23* не приводит к тотальному нарушению процесса синтеза закодированных в митохондриях белков, а лишь вызывает его разбалансировку. В экспериментах по оценке синтеза митохондриально-закодированных белков *de novo*, количество белков Cox1p, Cox2p и Cox3p уменьшается, тогда как количество Atp6, Atp8 и Atp9 увеличивается в штамме с делецией *AIM23* (Aim23Δ) по сравнению со штаммом дикого типа (WT). Любопытно, что количества двух оставшихся митохондриальных белков, Var1p и Cob1p, не зависят от наличия или отсутствия Aim23p Данная разбалансировка может быть вызвана изменениями в транскрипции, трансляции или же стабильности митохондриально-закодированных белков. С помощью метода pulse-chase было показано, что за исключением белка Atp8 количество продуктов митохондриальной трансляции не изменяется в течение двух часов эксперимента. Таким образом, разбалансировка трансляции не может быть связана с изменением стабильности синтезируемых полипептидов штамма-делетанта. Вопрос о том, является ли разбалансировка результатом изменений в процессе транскрипции или трансляции, оставался открытым.

Для решения этой проблемы мы провели анализ уровня митохондриальной мРНК в штамме *S. cerevisiae* дикого типа и штамме с делецией *AIM23* с помощью метода Нозерн-

блот гибридизации, основанного на комплементарном взаимодействии радиоактивно меченных дезоксирибонуклеотидов с конкретными мРНК с последующей радиоавтографической детекцией. Экспериментальные штаммы дрожжей конструировались на основе штамма D273-10B, лишенного полиморфизмов, влияющих на функционирование митохондрий, что позволяет исключить влияние этих полиморфизмов на правильную интерпретацию результатов.

Для данной работы был взят гаплоидный штамм Dau1, полученный путем споруляции с последующим делением тетрад штамма D273-10b. При создании штамма с делецией *AIM23* с помощью метода ПЦР была получена кассета KanMX4, содержащая ген устойчивости к антибиотику генетицину, фланкированный ДНК-регионами, расположенными выше и ниже гена *AIM23* в дрожжевом геноме. Полученная последовательность была внесена в клетки дрожжей с помощью метода литий-ацетатной трансформации, и далее в клетках с использованием естественных механизмов гомологичной рекомбинации осуществлялось замещение гена *AIM23* кассетой, содержащей ген устойчивости к генетицину. Отбор клонов, в которых произошла замена, проводили высевом на чашки Петри с питательной средой YPD, содержащей 400 мкг/мл генетицина. Наличие кассеты в геноме полученных клеток, а также отсутствие гена *AIM23* проверяли с помощью метода аналитической ПЦР. Известно, что нарушения митохондриального аппарата трансляции могут приводить к редукции (ρ^-) или полному отсутствию (ρ°) митохондриального генома. Кроме того, есть риск возникновения мутаций и в других частях генома. Для проверки отсутствия подобных изменений в полученный штамм был внесен в составе вектора ген *AIM23*, и продемонстрировано восстановление фенотипа штамма дикого типа (данные не представлены). Таким образом, мы показали, что эффекты, наблюдаемые нами в экспериментальном штамме, действительно имеют причиной отсутствие гена *AIM23.*

Для решения поставленной задачи полученный штамм выращивали на среде, содержащей глицерин в качестве субстрата. Поскольку глицерин является несбраживаемым источником углерода, для получения энергии дрожжам необходимо осуществлять процесс клеточного дыхания, а значит, рост в данных условиях требует наличия в клетках функционально активных митохондрий. Митохондрии экспериментальных штаммов использовали для получения фракции митохондриальной РНК, а затем проводили электрофоретическое разделение полученных молекул в денатурирующем агарозном геле и переносили их на мембрану Hybond-N+. Количество индивидуальных видов митохондриальных мРНК детектировали с помощью радиоактивно-меченых ДНК-зондов, комплементарных фрагменту молекулы, а затем

проводили сравнительный анализ. В случае полицистронных мРНК *COB* и *COX1* зонды подбирались таким образом, чтобы они гибридизовались на места соединения экзонов. В таком случае мы могли детектировать только зрелую мРНК. На графике представлено соотношение количества каждой мРНК в штамме с делецией *AIM23* по отношению к количеству в штамме дикого типа (Рис. 15).

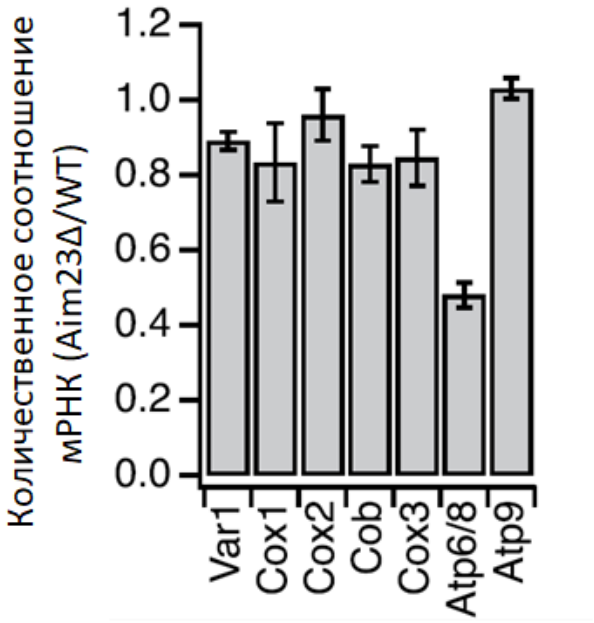

Рисунок 15. Результаты радиоавтографического анализа количества митохондриально-закодированных мРНК, нормализованных относительно 21S рРНК. Atp6/8 - бицистронная РНК, кодирующая белки Atp6 и Atp8. На графике представлено соотношение количества мРНК в штамме с делецией *AIM23* по отношению к штамму дикого типа.

Из графика видно, что за исключением бицистронной мРНК Atp6/8, количество продуктов транскрипции при делеции *AIM23* практически не изменяется. В случае с молекулой Atp6/8, ее количество в модифицированном штамме снижено. Этот результат оказался неожиданным, поскольку количество обоих белков, кодируемых этой РНК, напротив, возрастает в штамме Aim23Δ. Причина этого явления на данный момент не выяснена.

Таким образом, нарушение соотношения количества закодированных в митохондриях белков, вызванная делецией гена *AIM23*, не связано с изменениями в транскрипции. С другой стороны, как уже упоминалось выше, было показано, что стабильность закодированных в митохондриях белков также не изменяется с удалением из дрожжевого генома гена *AIM23*. Таким образом, наблюдаемый феномен связан с

активностью Aim23p в процессе трансляции, и разбалансировка синтеза митохондриально-закодированных белков проявляется именно на этой стадии.

Роль Aim23p в клетках дрожжей, по-видимому, отличается от классической функции третьего фактора инициации трансляции. Возможно, данный белок может выступать не только как IF3mt *S. cerevisiae*, но и как мРНК-специфический трансляционный фактор, в связи с чем его отсутствие приводит к изменению эффективности трансляции отдельных видов мРНК. Специфическое действие Aim23p на мРНК *COX1* и *COX2* было показано в нашей лаборатории (И.В.Чичерин, А.В.Кузьменко, данные на рецензии в международном журнале). С другой стороны, основные функции третьего фактора, а именно диссоциацию рибосомы на субъединицы и стимуляцию связывания инициаторной тРНК, Aim23p осуществляет, как и бактериальный IF3 (Chicherin et al, 2019).

Необычные результаты были показаны и для делящихся дрожжей *S. pombe*, у которых делеция IF3mt не приводит к критическим изменениям фенотипа и не вызывает полную остановку трансляции митохондриальных белков (Kim et al, 2010). При этом важно отметить, что данный организм не может существовать без функционально активных митохондрий. Кроме того, по данным биоинформатического анализа, IF3mt отсутствует у ряда организмов (Atkinson et al, 2012). Наконец, по неопубликованным данным, полученным И.В.Чичериным в нашей лаборатории, IF3mt не является необходимым для жизнедеятельности клеток человека, и эффекты делеции его гена в отношении человеческих митохондрий фенотипически выражены даже слабее, чем эффекты делеции гена *AIM23* в отношении органелл дрожжей. При этом в экспериментах *in vitro* для человеческого IF3mt показаны почти все активности, характерные для его бактериального ортолога (Haque et al, 2008). Суммируя вышесказанное, можно выдвинуть предположение, что в системе митохондриальной трансляции каноническая функция третьего фактора инициации по каким-то причинам стала необязательной, зато как минимум у дрожжей этот белок приобрел дополнительные, мРНК-специфические функции.

4.2 Для функционирования Aim23p необходимо наличие хотя бы одного концевого удлинения фактора

Как было описано в разделе «Обзор литературы», третий фактор инициации трансляции состоит из двух доменов (N- и C-), соединенных линкером. Кроме того, митохондриальные IF3 почти всех изученных организмов содержат дополнительные N- и C-концевые удлинения. Был проведен ряд исследований данных регионов человеческого

IF3mt *in vitro*, а также в гетерологичной бактериальной системе, тогда как данные о фенотипических проявлениях подобных изменений в митохондриях отсутствуют. В данной работе мы проанализировали роль концевых участков Aim23p при работе фактора в клетках *S. cerevisiae in vivo*.

В этом и последующих экспериментах для работы был выбран гаплоидный штамм Dul2, являющийся производным штамма D273-10b. Методом, аналогичным описанному выше, был создан штамм с делецией *AIM23* (Aim23Δ). С помощью модификации метода ПЦР «overlap extension» были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие различные варианты фактора Aim23p: полноразмерный фактор, белок, лишенный N-, C- или обоих концевых участков, а также фактор, в котором произведена делеция сигнала импорта в митохондрии (MTS) (Рис. 16). Последний использовался в качестве одного из отрицательных контролей, при котором происходит синтез фактора, однако его транпортировка внутрь органеллы не осуществляется.

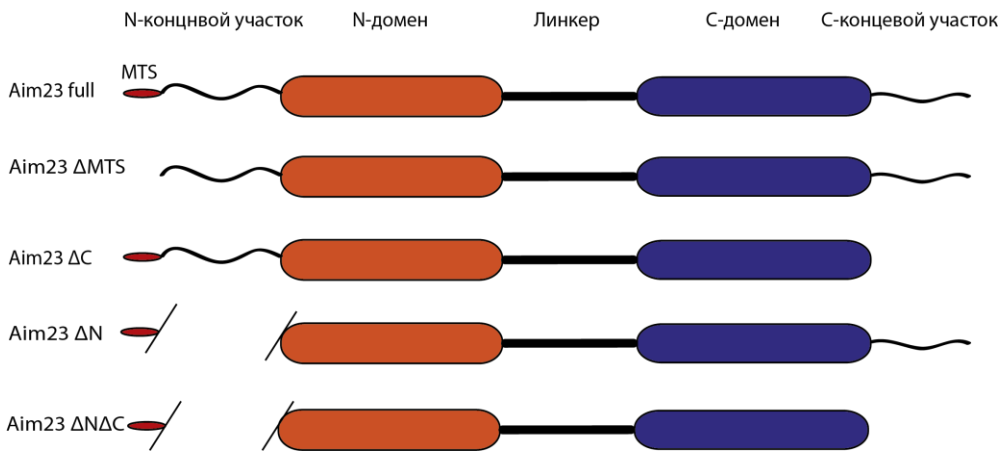

Рисунок 16. Варианты модифицированного Aim23p, использовавшиеся в работе. Красным и синим представлены N- и C-домены соответственно. Прямой линией изображен линкерный регион, волнистой линией показаны концевые удлинения. Красным овалом обозначена сигнальная последовательность MTS.

Мутантные версии были клонированы в нативном геномном окружении под контролем собственного промотора гена *AIM23*. Полученные фрагменты были внесены в составе челночного вектора в клетки штамма Aim23Δ с помощью литий-ацетатной трансформации (Рис. 17). Клоны, несущие плазмиду, отбирались на селективной среде. В качестве отрицательного контроля использовался штамм, трансформированный вектором без вставок.

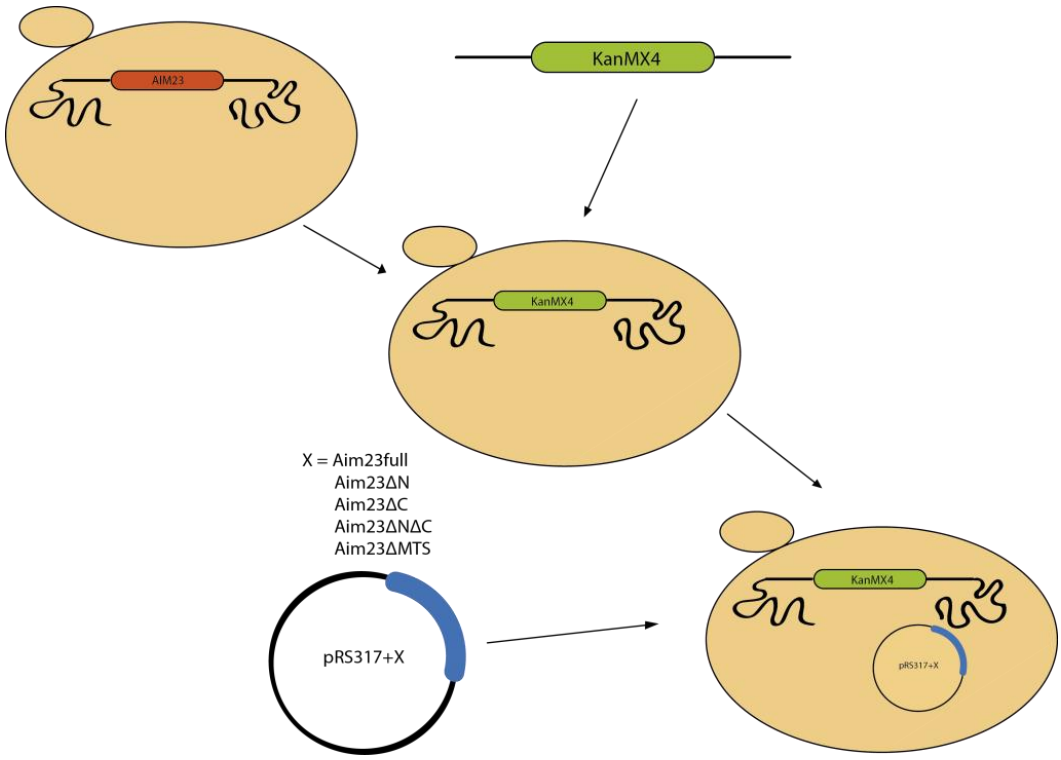

Рисунок 17. Схема создания штаммов *S. cerevisiae* с заменой *AIM23*. После внесения линейной ДНК, кодирующей ген устойчивости к генетицину (кассета KanMX4), дрожжи выращивали на селективной среде. Позитивные клоны трансформировали вектором pRS317 с одним из вариантов гена *AIM23*.

Полученные штаммы с различными вариантами гена *AIM23* выращивали на синтетической среде CSM-lys, содержащей глюкозу в качестве субстрата и не содержащей лизина (на такой среде могут расти только клетки с каким-либо вариантом вектора pRS317, содержащего маркерный ген *LYS3*). При росте на глюкозе в качестве источника углерода дрожжи получают энергию за счет гликолитического расщепления сахара, и митохондриальные нарушения не проявляются фенотипически. Культуры отмывали от остатков глюкозы, разводили до значений OD600 0,1, 0,01 и 0,001 и высевали 5 мкл суспензий на агаризованную питательную среду. Тестирование работы митохондрий проводили на питательной среде, содержащей глицерин в качестве единственного источника углерода. Рост на глицерине требует осуществления процесса дыхания, а значит, работы митохондрий. Таким образом, нарушения в митохондриях ведут к изменениям в скорости роста дрожжей, которые мы можем отследить в данном эксперименте. В качестве контроля дрожжи выращивали на аналогичной среде с глюкозой. Все исследования проводились в трех биологических повторностях.

При инкубации на среде с глюкозой рост экспериментальных штаммов, как и ожидалось, был одинаковым (данные не представлены). Однако картина сильно отличалась при выращивании дрожжей на глицерине (Рис. 18).

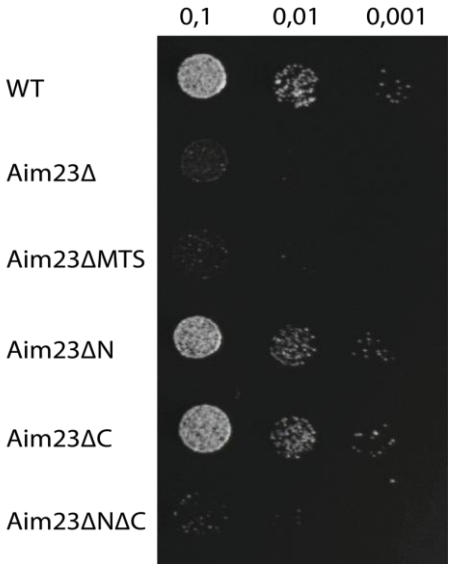

Рисунок 18. Рост штаммов дрожжей с модифицированным геном *AIM23* на среде с несбраживаемым источником углерода через 48 часов при температуре 30°C. Числа сверху указывают значение OD600 в разведениях. Слева обозначены версии фактора в клетках. WT - штамм с геном *AIM23* на плазмиде; Aim23Δ - отрицательный контроль; Aim23ΔMTS, Aim23ΔN, Aim23ΔC, Aim23ΔNΔC - штаммы, содержащие фактор с делецией сигнала импорта в митохондрии, N-, C- или обоих концевых участков соответственно.

В случае штамма Aim23Δ мы наблюдали задержку роста по сравнению со штаммом дикого типа (WT), что подтверждает данные, полученные ранее в этом же временном интервале роста. При делеции одного из концевых удлинений, как N- (Aim23ΔN), так и C- (Aim23ΔC), скорость роста штаммов была сравнима с таковой в случае штамма дикого типа. Таким образом, для функционирования фактора достаточно наличия одного из двух концевых участков. Удаление же обоих концевых удлинений (штамм Aim23ΔNΔC) приводило к резкому снижению скорости роста дрожжей и делало его сходным с фенотипическим проявлением Aim23Δ, из чего следует, что для работы в митохондриях Aim23p должен содержать хотя бы одно концевое удлинение. Аналогичный рост продемонстрировал и штамм Aim23ΔMTS, что было ожидаемо: версия Aim23p не должна импортироваться в митохондрии, следовательно, фенотип такого штамма должен быть идентичен фенотипу штамма-делетанта по гену *AIM23*. Тем не менее, оставалась небольшая вероятность того, что для митохондриальной функции дрожжей важно не

столько присутствие Aim23p в митохондриях, сколько сам факт его биосинтеза и его наличие в цитоплазме. Эту возможность мы отвергли благодаря данному эксперименту.

Снижение скорости роста некоторых штаммов может объясняться не только отсутствием активности самого модифицированного фактора, но и затруднениями, связанными с его импортом в митохондрии. Для проверки наличия модифицированных Aim23p в митохондриях мы провели Вестерн-блот анализ. Штаммы дрожжей с различными вариантами фактора выращивали до одинаковых значений оптической плотности в среде, содержащей галактозу в качестве источника углерода. Данный субстрат не вызывает катаболитную репрессию, а следовательно, не оказывает влияния на митохондриальную функцию. Клетки собирали, выделяли из них митохондрии, разрушали, а затем полученные фракции митохондриальных белков разделяли на полиакриламидном геле и переносили их на мембрану. Детекцию белков проводили с помощью моноклональных антител, полученных в кролике против рекомбинантного Aim23p (Рис.19).

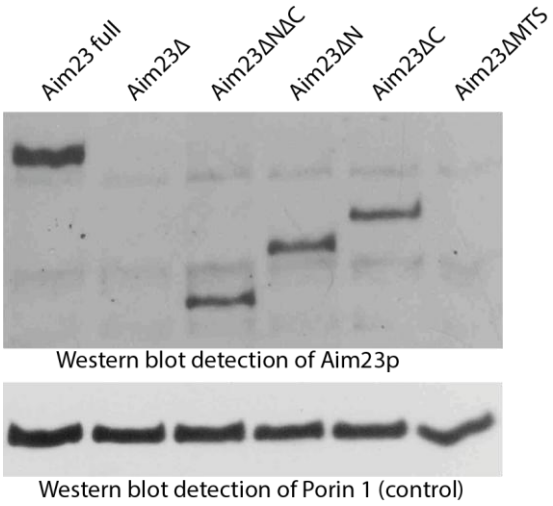

Рисунок 19. Вестерн-блот детекция различных мутантных версий Aim23p в митохондриях *S. cerevisiae* после электрофоретического разделения фракций митохондриальных белков соответствующих штаммов. Дорожки соответствуют фракции белков митохондрий модифицированного штамма (сверху указан вариант Aim23p данного штамма). В качестве контроля количества дрожжевого белка использован мембранный белок порин (Porin 1). Aim23full - штамм с геном *AIM23* на плазмиде; Aim23Δ - отрицательный контроль; Aim23ΔN, Aim23ΔC, Aim23ΔNΔC, Aim23ΔMTS - штамм, содержащий фактор с делецией N-, C-, обоих концевых участков или сигнала импорта в митохондрии соответственно.

Было продемонстрировано наличие в митохондриях всех усеченных вариантов фактора. В качестве отрицательного контроля использовали штамм с делецией *AIM23*, а также штамм, содержащий фактор, лишенный сигнала митохондриального импорта.

Данный эксперимент подтверждает наличие модифицированных белков в органелле, а значит, снижение скорости роста дрожжей не связано с неспособностью усеченных вариантов Aim23p импортироваться в митохондрии.

Таким образом, было показано, что для функционирования Aim23p в митохондриях необходимо наличие хотя бы одного из концевых участков фактора. Для человеческого mtIF3 в системе *in vitro* командой Линды Шпремулли было продемонстрировано увеличение сродства белка по отношению к большой субъединице рибосомы, а также усиление акцептирования тРНК рибосомой при делеции концевых удлинений. Это может приводить к некорректному осуществлению процесса трансляции и нарушать нормальный рост клеток. Вполне вероятно, что делеция двух концевых участков Aim23p может приводить к аналогичному эффекту и, как следствие, вызывать снижение скорости роста клеток. Стоит отметить, что согласно данным *in vitro*, для человеческого фактора более значимые нарушения возникают при делеции С-концевого участка, тогда как в экспериментах *in vivo* в дрожжевой системе такой закономерности не обнаружено.

На данный момент остается открытым вопрос, почему в ходе эволюционного процесса возникло два концевых участка, тогда как для активности фактора необходимо наличие лишь одного из них. Возможно, каждый из удлинений несет какую-то дополнительную функцию, которая не является критичной для работы митохондрий, в связи с чем его отсутствие не приводит видимому изменению фенотипа. Другой причиной может являться то, что концевые участки возникали независимо и, таким образом, оказались дублирующими друг друга. В связи с выполнением общей функции, в комплексе с рибосомой концевые участки могут располагаться близко друг к другу, препятствуя неспецифическому связыванию фактора с рибосомой и, как следствие, формированию некорректного инициаторного комплекса. Молекулярное моделирование структуры фактора в комплексе с рибосомой, проведенное по нашей просьбе А.В.Головиным, подтвердило, что сближенность двух концевых удлинений Aim23p друг с другом при взаимодействии белка с рибосомой является наиболее энергетически выгодной конформацией комплекса.

4.3 Человеческий mtIF3 активен в митохондриях дрожжей вне зависимости от наличия концевых участков

Эволюционные процессы в митохондриях различных организмов идут с большой скоростью в связи с близостью значительного количества активных форм кислорода, которые, как известно, способны вызывать мутации в ДНК. Изменения происходят во всех группах независимо, что приводит к значительным различиям первичных структур

митохондриальных белков и молекулярных механизмов в митохондриях у разных видов. Это в полной мере относится и к третьему фактору инициации митотрансляции (как и ко всему процессу биосинтеза белка в митохондриях в целом). Однако, несмотря на сильные различия в аминокислотной последовательности и длине отдельных фрагментов белка, общая структура факторов (два домена, соединенных линкером, а также дополнительные концевые участки на концах), остается универсальной для разных организмов. Такая структура характерна и для IF3mt человека.

Функциональная роль концевых удлинений человеческого фактора была показана в экспериментах *in vitro*, но не *in vivo*. Мы провели исследование активности модифицированного IF3mt в гетерологичной дрожжевой системе. Как уже говорилось, дрожжи являются модельным организмом для изучения функционирования митохондрий, и современные методы молекулярной биологии позволяют проводить исследования и чужеродных белков в клетках дрожжей. Кроме того, ранее уже была показана способность человеческого IF3mt функционально заменять Aim23p в *S. cerevisiae* (Kuzmenko et al, 2014).

В данной части работы мы сконструировали различные варианты гена человеческого IF3mt (далее human IF3mt), аналогичные описанным выше вариантам *AIM23*, и внесли их в составе вектора в штамм *S. cerevisiae* Aim23Δ (Рис.20).

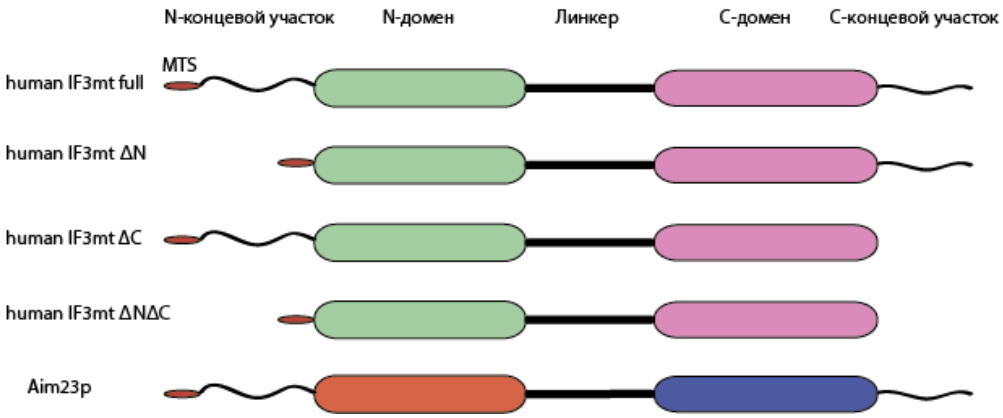

Рисунок 20. Варианты модифицированного человеческого IF3mt, использовавшиеся в работе. Зеленым цветом окрашен N-домен человеческого фактора, красным - N-домен Aim23p. Розовым и синим представлены С-домены человеческого и дрожжевого факторов соответственно. Прямой линией изображен линкерный регион, волнистой линией показаны концевые удлинения. Красным овалом обозначена сигнальная последовательность MTS *AIM23*.

В качестве положительного контроля использовали штамм, в котором на плазмиде был внесен ген *AIM23*, отрицательный контроль представлял собой штамм, содержащий «пустой» вектор. Данные штаммы использовали для проведения эксперимента, аналогичного исследованию роли концевых удлинений Aim23p, описанному в разделе 4.2 (Рис. 21).

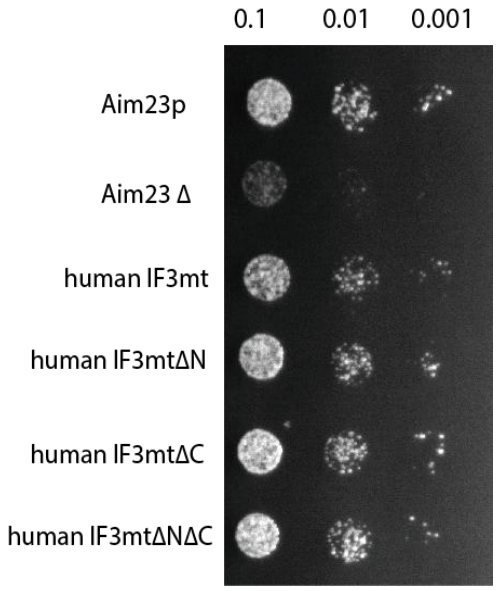

Рисунок 21. Рост штаммов дрожжей, содержащих человеческую версию третьего фактора инициации митохондриальной трансляции, на среде с несбраживаемым источником углерода через 48 часов при температуре 30°C. Числа сверху указывают значение OD600 в разведениях. Слева обозначены версии фактора в клетках.

Aim23p - штамм с геном *AIM23* на плазмиде; Aim23Δ - отрицательный контроль; human IF3mt, - полноразмерный человеческий IF3mt; human IF3ΔN, human IF3ΔC, human IF3mtΔNΔC - штаммы, содержащие человеческий фактор с делецией N-, C- или обоих концевых участков соответственно.

Результаты эксперимента оказались довольно неожиданными. Все варианты человеческого фактора полностью компенсировали отсутствие Aim23p вне зависимости от наличия концевых участков. Для подтверждения отсутствия Aim23p в клетках с человеческими вариантами IF3mt мы провели Вестерн-блот гибридизацию клеточных лизатов исследуемых штаммов с антителами против Aim23p. Сигнал был получен только от штамма, несущего в составе вектора ген *AIM23*, использовавшегося нами в качестве положительного контроля (данные не представлены). Таким образом, Aim23p в данных культурах действительно отсутствует, и следует заключить, что в сконструированных нами штаммах роль третьего фактора инициации трансляции выполняют различные варианты человеческого фактора.

Ранее в работах группы Линды Шпремулли было показано, что делеция концевых удлинений human_mtIF3 приводит к значительным нарушениям процесса трансляции на миторибосомах млекопитающих *in vitro*. Наши эксперименты продемонстрировали, что даже усеченные белки выполняют функцию третьего фактора митохондриальной трансляции в дрожжевой системе с эффективностью, практически не отличающейся от таковой в случае белка Aim23p. Вероятно, особенность структуры человеческого фактора позволяет ему функционировать даже в усеченном варианте в клетках низших эукариот. Однако эксперименты, проведенные в дрожжевой системе, не позволяют судить об активности модифицированного фактора в митохондриях человека, и фенотипические проявления делеций концевых участков human_mtIF3 могут быть сходными с модификациями Aim23p в клетках дрожжей.

4.4 IF3 *E. coli* с концевыми участками Aim23p выполняет роль третьего фактора инициации митохондриальной трансляции в клетках дрожжей

Бактериальные факторы по своей пространственной организации схожи с митохондриальными, за исключением отсутствующих у них дополнительных концевых удлинений. Ранее было показано, что бактериальный IF3 может, несмотря на сильные различия в аминокислотной последовательности, выполнять функцию mtIF3 в *S. cerevisiae*, хоть и гораздо хуже дрожжевого (Kuzmenko et al, 2014). Мы решили проверить, действительно ли данные концевые участки играют ключевую роль в работе митохондриального фактора, и сможет ли добавление данных регионов к бактериальному IF3 увеличить его функциональность в дрожжевой системе.

Для этого мы сконструировали гены гибридных факторов, состоящих из IF3 *E. coli,* фланкированного с одной или обеих сторон концевыми участками Aim23p (Рис. 22).

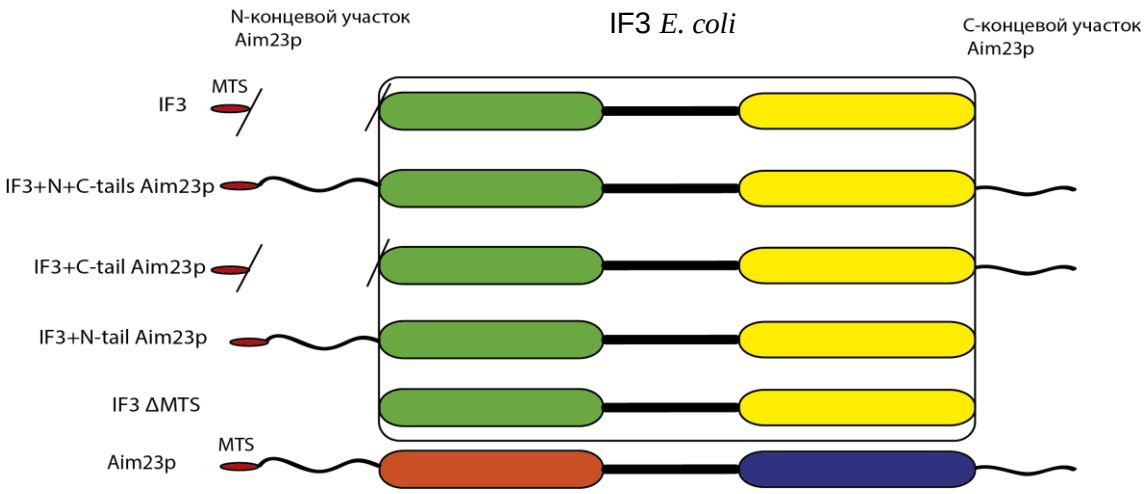

Рисунок 22. Схемы вариантов гибридного фактора, состоящие из бактериального IF3 и концевых удлинений Aim23p. Зеленым цветом окрашен N-домен бактериального фактора, красным - N-домен Aim23p. Желтым и синим представлены C-домены бактериального и дрожжевого факторов соответственно. Прямой линией изображен линкерный регион, волнистой линией показаны концевые удлинения. Красным овалом обозначена сигнальная последовательность MTS.

Данные конструкции были внесены в составе челночного вектора в клетки штамма Aim23Δ и проведен аналогичный предыдущим анализ роста полученных культур на селективной среде с несбраживаемым источником углерода (Рис. 23). В качестве контроля выращивали культуры с добавлением глюкозы и продемонстрировали, что на данном источнике углерода рост штаммов визуально не различается.

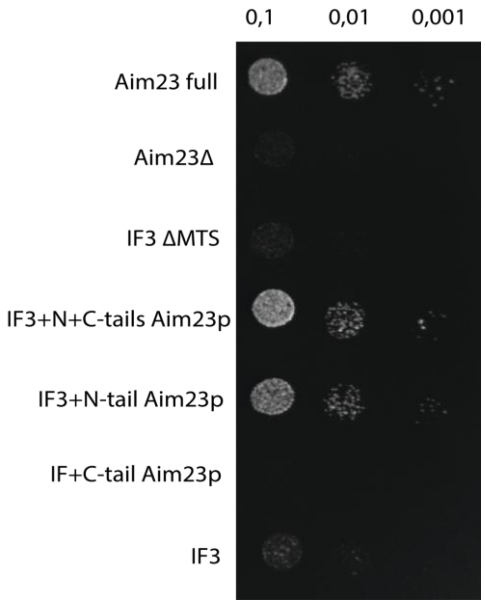

Рисунок 23. Рост штаммов дрожжей, содержащих одну из версий гибридного фактора инициации митохондриальной трансляции, на среде с несбраживаемым источником углерода через 48 часов при температуре 30°C. Числа сверху указывают значение OD600 в разведениях. Слева обозначены версии фактора в клетках. Aim23full - штамм с геном *AIM23* на плазмиде; Aim23Δ - отрицательный контроль; IF3 - бактериальный фактор, слитый с дрожжевым сигналом импорта в митохондрии; IF3ΔMTS - бактериальный IF3; IF3+N-tail Aim23p, IF3+C-tail Aim23p, IF3+N+C-tails Aim23p - штаммы, содержащие бактериальный фактор с N-, C- или обоими концевыми участками Aim23p.

Результаты эксперимента подтвердили полученные ранее данные – дрожжи с IF3 *E.coli* растут немного лучше контроля, таким образом, бактериальный фактор действительно частично компенсирует отсутствие Aim23p в дрожжах. Несколько

неожиданными оказались результаты нашего эксперимента в части роста дрожжей, содержащих гибридные факторы. Добавление к бактериальному фактору двух концевых участков Aim23p значительно увеличивает его активность в митохондриях, и рост соответствующего штамма дрожжей сравним с таковым в случае штамма дикого типа. Практически такие же результаты были получены и в случае IF3 с N-концевым участком Aim23p, рост соответствующего штамма был незначительно замедлен по сравнению с диким типом. В случае IF3 с С-концевым участком рост экспериментальных клонов на среде с глицерином сильно варьировал от полного его отсутствия до роста, сходного со штаммом дикого типа (на рисунке представлен наиболее частый вариант роста данного штамма, а именно его отсутствие). На данный момент не выяснено, что происходит внутри клеток при добавлении данной конструкции. Судя по всему, данный гибридный белок каким-то не вполне понятным образом вызывает генетическую нестабильность дрожжей. Стоит отметить, что данный эффект наблюдается только в штамме с гибридным белком, тогда как дрожжевой фактор (Aim23p), содержащий только С-участок, полностью функционален в митохондриях.

Таким образом, концевые удлинения, в особенности, N-участок, играют важнейшую роль в активности фактора. Даже при замене внутренней части белок остается функциональным при наличии концевых участков. Вероятно, в активности фактора ключевую роль играет не аминокислотная последовательность, сильно различающаяся у бактериального и дрожжевого фактора, а именно пространственная организация белка, схожая у разных организмов. Полученные результаты подтверждают гипотезу о возникновении концевых удлинений в ответ на изменения в митохондриальной системе трансляции. Даже белок представителя другого домена жизни может быть функционально активным в митохондриях при добавлении концевых участков митохондриального фактора.

4.5 Aim23p ингибирует рост *E. coli*

Предыдущий эксперимент показал способность бактериального фактора выполнять функцию mtIF3 в клетках дрожжей при добавлении концевых участков Aim23p. Нас заинтересовала обратная ситуация – сможет ли Aim23p, лишенный концевых участков, выполнять роль третьего фактора инициации трансляции в клетках *E. coli*, ведь удаление этих фрагментов делает белок структурно схожим с бактериальным фактором. Работы по комплементации бактериальных факторов митохондриальными уже проводились и показали свою актуальность. Так, была продемонстрирована способность человеческого

IF2mt компенсировать одновременное отсутствие IF1 и IF2 в клетках *E. coli* (Gaur et al, 2008).

При решении этой задачи мы столкнулись с рядом проблем. Во-первых, бактериальный ген IF3, в отличие от митохондриальных белков, является одним из генов домашнего хозяйства. Таким образом, невозможно провести его делецию, поскольку полученные клетки будут нежизнеспособными. Кроме того, внутри гена *infC*, кодирующего IF3 *E. coli*, располагается промотор двух других жизненно важных генов, а именно генов, кодирующих белки большой субъединицы рибосомы, L20 и L35, в связи с чем делеция *infC* приводит к нарушению их экспрессии (Рис. 24).

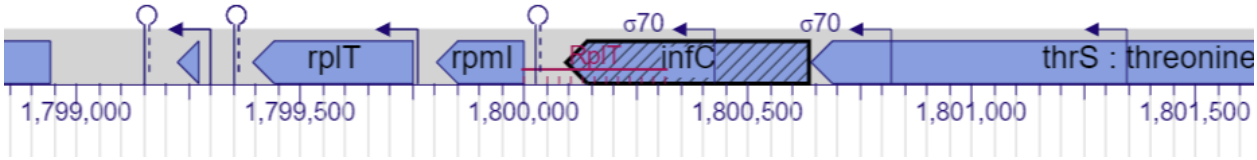

Рисунок 24. Структура оперона *infC*. Изображение взято с сайта EcoCyc (https://ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=LOCUS-POSITION&object=EG10506&chromosome=COLI-K12&orgids=ECOLI&bp-range=1795498/1805236&show-tracks=on).

Для решения этих проблем при проведении эксперимента мы сконструировали базовый штамм *E. coli* (Рис. 25).

На первом этапе была сконструирована плазмида, состоящая из вектора pACDH и гена *infC*, кодирующего IF3 *E. coli*. Полученная плазмида была внесена в штамм *E. coli* MG1655. Таким образом, мы добавили в клетки дополнительный ген, кодирующий IF3, что должно позволить нам проводить манипуляции с геномной копией данного гена, не опасаясь за жизнеспособность бактерий.

Кассета, предназначенная для разрушения геномного *infC*, конструировалась таким образом, чтобы при дизрупции ген устойчивости к хлорамфениколу заменил фрагмент гена IF3, расположенный ниже промотора рибосомных белков, локализованного внутри гена. Кассета состояла из 5`-фланка *infC*, за которым следовал ген устойчивости к хлорамфениколу (Cat) и фрагмент *infC*, лежащий ниже 153го нуклеотида гена. В качестве матрицы при получении Cat использовали плазмиду pKD3. Таким образом, при дизрупции происходит удаление начала гена, кодирующего IF3, что приводит к невозможности синтеза белка, тогда как промотор, необходимый для нормальной экспрессии генов рибосомных белков, остается нетронутым. Кассетой, а также плазмидой pKD46,

содержащей ген рекомбиназы под контролем арабинозного промотора, трансформировали клетки *E. coli*, после чего добавлением в среду арабинозы индуцировали экспрессию гена необходимой для дизрупции рекомбиназы. При этом происходит замена фрагмента *infC* на ген устойчивости к хлорамфениколу. Отбор положительных клонов проводили на селективной среде с добавлением антибиотика. При инкубации клетки теряли термолабильную плазмиду pKD46, и в штамме оставался только pACDH с геном *infC*.

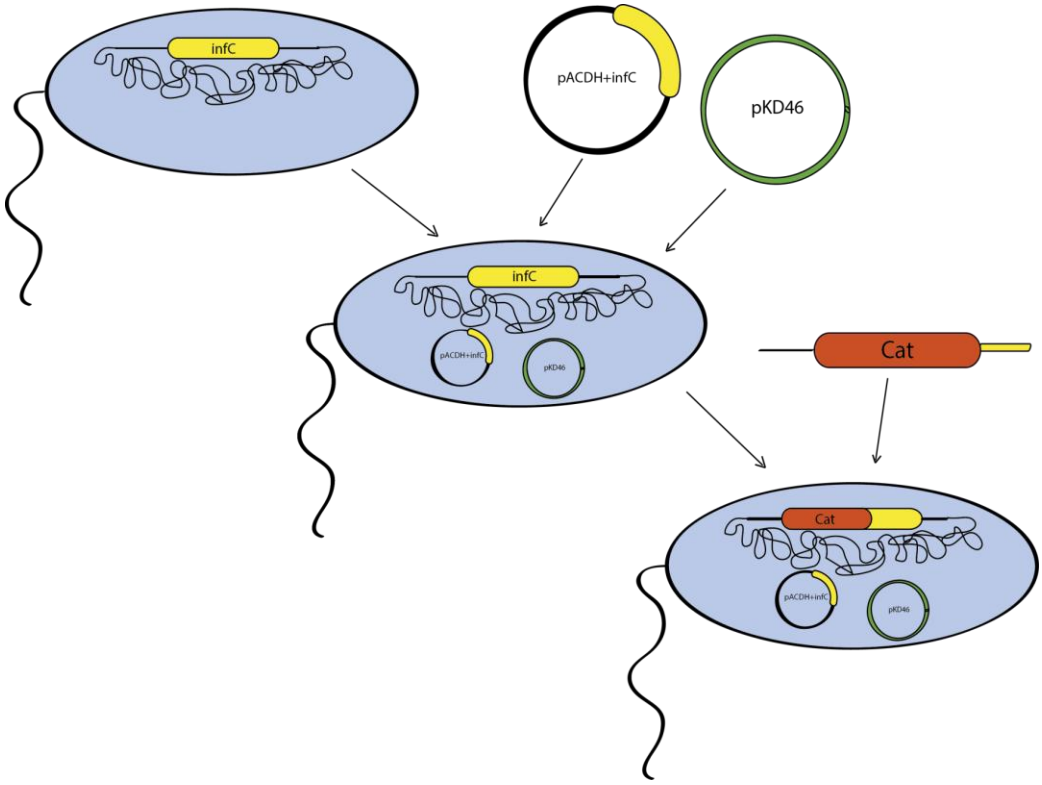

Рисунок 25. Схема создания штамма *E. coli* с делецией фрагмента *infC*. В штамм *E. coli* Mg1655 внесли плазмиду pACDH с геном, кодирующим бактериальный IF3 (*infC*), и плазмиду pKD46, содержащую ген рекомбиназы. Полученный штамм трансформировали линейной ДНК, кодирующей ген устойчивости к хлорамфениколу, фланкированный регионом, расположенным перед *infC*, и фрагментом *infC*. После процесса рекомбинации отбирали устойчивые к хлорамфениколу клоны.

При такой процедуре рекомбиназа может стимулировать перестройки и в других частях генома, что может оказать непредсказуемое влияние на фенотип. Таким образом, эксперименты, проведенные на таком штамме, могут оказаться недостоверными. Чтобы обойти эту проблему, мы перенесли полученную геномную конструкцию в экспериментальные штаммы с помощью умеренного бактериофага P1.

Штамм с геномной модификацией заражали культурой бактериофагов, инкубировали до полного лизиса клеток, а затем отбирали и очищали полученную смесь фагов, часть из которых содержала созданную нами конструкцию (Рис. 26).

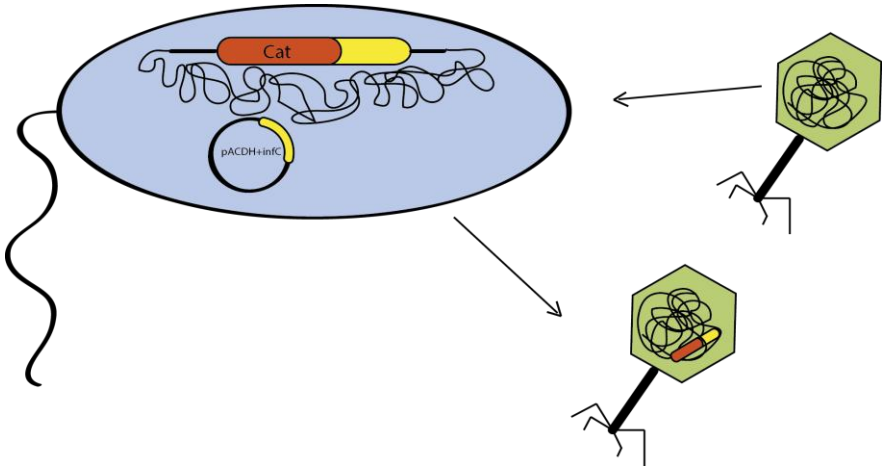

Рисунок 26. Схема создания фракции бактериофагов, несущих модифицированную ДНК *E. coli*. В процессе трансдукции модифицированного штамма *E. coli* получали фракцию бактериофагов, обогащенную фрагментами ДНК с делецией участка *infC*.

Для получения экспериментальных штаммов были созданы плазмиды, в которых в вектор pACDH был внесен один из генов, кодирующих различные вариации третьего фактора:

infC – ген, кодирующий IF3 *E. coli;*

AIM23full – ген, кодирующий полноразмерный Aim23p;

AIM23ΔNΔC – ген, кодирующий Aim23p без концевых участков.

В качестве отрицательного контроля использовали «пустой» вектор pACDH.

Также была сконструирована плазмида, состоящая из вектора pBAD и гена *infC*. В данной системе ген, кодирующий IF3 *E. coli*, находится под контролем арабинозного промотора, тогда как экспериментальные гены на плазмиде pACDH расположены под контролем лактозного промотора. Обе плазмиды были внесены в клетки штамма MG1655. Полученные штаммы заражались смесью бактериофагов, полученной в процессе трансдукции, при этом в части клеток происходила замена гена *infC* на внесенную с помощью фагов конструкцию. Культуры выращивали на селективной среде LB с добавлением тетрациклина (ген устойчивости расположен на плазмиде pACDH), хлорамфеникола (ген устойчивости был внесен нами в геномы экспериментальных штаммов) и карбенициллина (ген устойчивости расположен на плазмиде pBAD). Для предотвращения реабсорбции и фагов и последующей инфекции добавляли в питательную

среду цитрат натрия. В полученных клонах произошла делеция фрагмента гена, кодирующего IF3, и для поддержания жизнеспособности клеток экспрессию *infC* с плазмиды pBAD индуцировали добавлением в среду арабинозы (Рис. 27). Выросшие клоны проверяли с помощью метода ПЦР на наличие гена Cat и отсутствие фрагмента гена *infC*.

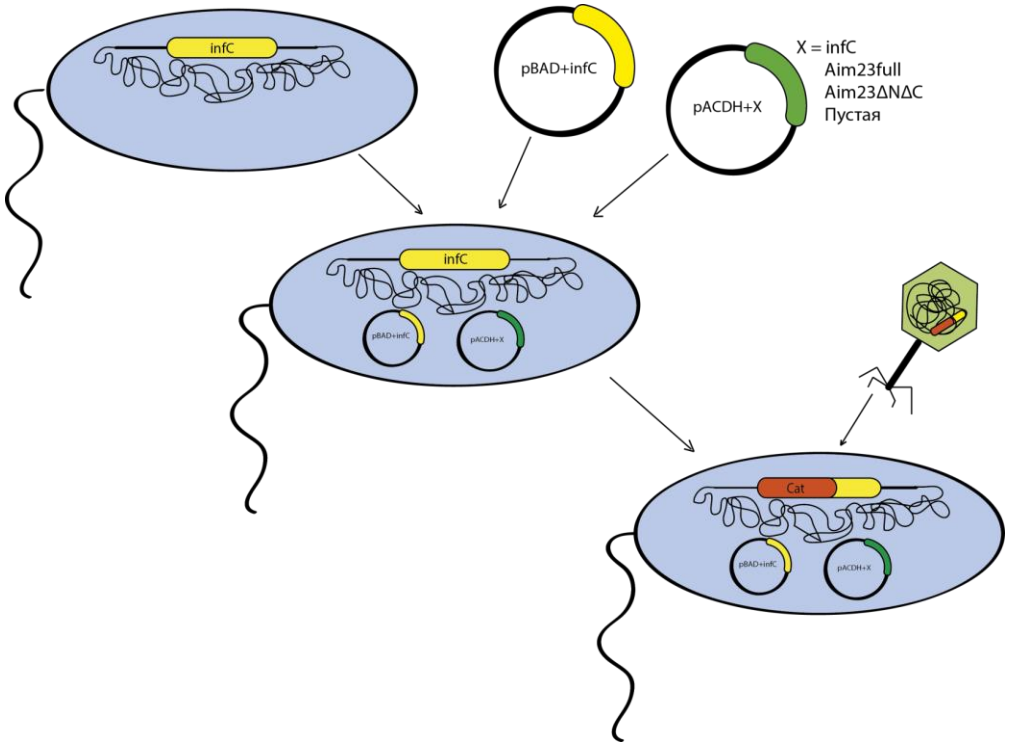

Рисунок 27. Схема создания экспериментальных штаммов *E. coli*. На первой стадии осуществляется внесение в клетки плазмид, содержащих ген *infC*, а также один из экспериментальных генов. Затем с помощью вирусов вносили модифицированный участок ДНК *E. coli*.

Далее проводили анализ роста полученных штаммов (Рис. 28). Экспериментальные культуры выращивали 12 часов на селективной среде с тремя антибиотиками. Кроме того, в среду добавляли арабинозу. При этом имела место активная экспрессия IF3 с плазмиды pBAD, и все культуры росли одинаково. Далее клетки отмывали средой LB, переносили в экспериментальную среду и начинали инкубацию при начальном значении OD600 0,001. Анализ роста проводили в среде LB с добавлением карбенициллина, тетрациклина и хлорамфеникола. Экспрессию IF3 с плазмиды pBAD ингибировали добавлением глюкозы до конечной концентрации 0,5%. Также добавляли 1 mM IPTG для индукции синтеза исследуемых вариантов белков на плазмиде pACDH. Таким образом, мы могли проанализировать влияние различных вариантов фактора на рост клеток. В процессе

жизнедеятельности бактерии утилизируют глюкозу, снижая ингибирование экспрессии *infC* с плазмиды pBAD. Для увеличения времени эксперимента мы добавляли в среду глюкозу до 0,5% через 2,5 и 5 часов эксперимента. Исследование проводили в пяти повторностях на микропланшетном ридере Tecan Infinite. Результаты представлены на рисунке 28.

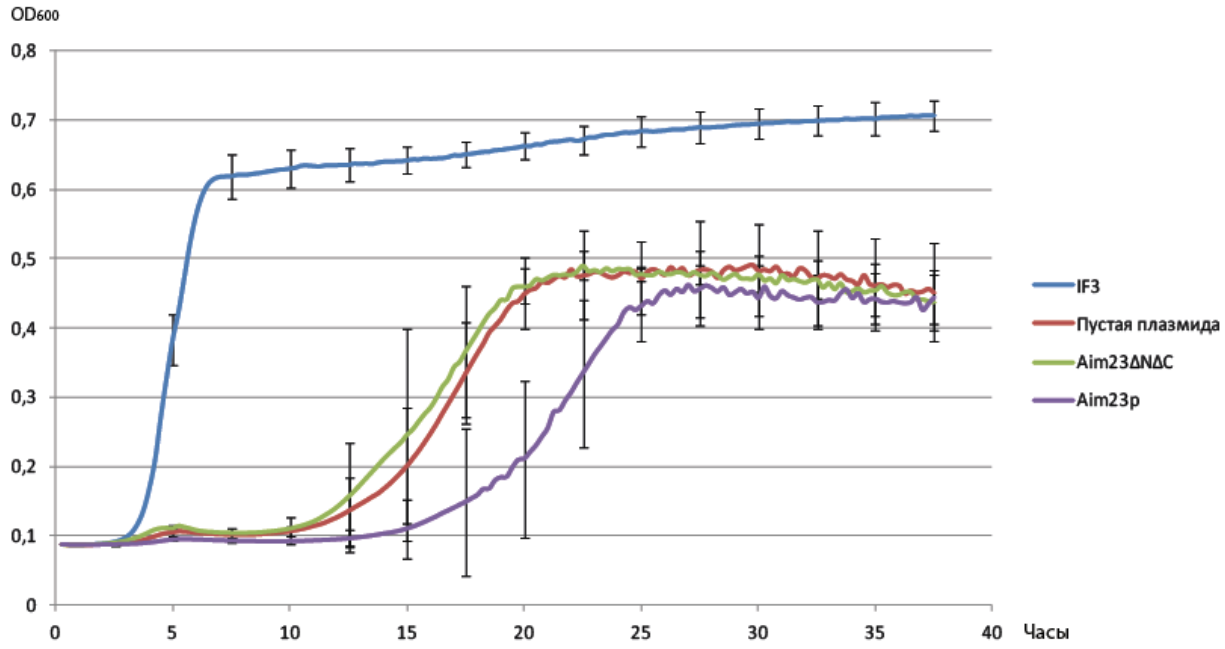

Рисунок 28. Кривые роста штаммов *E. coli* с делецией гена *infC* в геноме, несущих альтернативные варианты третьего фактора инициации трансляции. Среда LB с добавлением карбенициллина, тетрациклина, хлорамфеникола и глюкозы, температура инкубации 37°C. Через 2,5 и 5 часов добавили глюкозу. По оси ординат представлены относительные значения оптической плотности при длине волны 600 нм.

IF3 - штамм, содержащий ген *infC* на плазмиде pACDH; Aim23p и Aim23ΔNΔC - штамм с полноразмерным или лишенным концевых участков Aim23p соответственно; пустая плазмида - бактерии, несущие “пустой вектор” (отрицательный контроль).

В качестве положительного контроля использовался штамм, содержащий бактериальный IF3 на плазмиде, в качестве отрицательного – бактерии с “пустым” вектором. В первые десять часов мы наблюдали отсутствие роста в обоих штаммах, содержащих Aim23p, как полноразмерный, так и без концевых участков, тогда как контрольная культура уже через 3 часа продемонстрировала активный рост. Таким образом, обе вариации дрожжевого фактора не могут заменить бактериальный IF3 в клетках *E. coli*.

Неожиданную картину мы наблюдали по прошествии десяти часов инкубации. В этот период начинается рост отрицательного контроля. Предположительно, к этому времени бактерии утилизируют большую часть глюкозы из среды, в связи с чем заканчивается ингибирующее действие на плазмиду pBAD+*infC*, начинается синтез бактериального IF3 и рост клеток. В клетках штаммов, в которых на плазмиде pACDH находится дополнительный фактор инициации, происходит накопление обоих белков, как бактериального, так и дрожжевого.

Из графика видно, что рост штамма, содержащего Aim23p без концевых участков сходен с отрицательным контролем. Таким образом, такой вариант белка не оказывает влияния на жизнедеятельность бактерий, трансляция происходит за счет IF3, экспрессирующегося с плазмиды pBAD. В случае же с полноразмерным Aim23p наблюдается замедление роста бактерий. Таким образом, дрожжевой фактор не только не может компенсировать отсутствие бактериального, но и, напротив, блокирует клеточные процессы.

4.6 Aim23p взаимодействует с рибосомами *E. coli* неканоническим образом

Токсичность Aim23p для бактериальных клеток, продемонстрированная нами, может быть связана с основной функцией белка Aim23p, то есть с трансляцией. Возможно также, что нарушения, вызываемые присутствием Aim23p в клетках кишечной палочки, могут быть связаны со взаимодействием данного белка с бактериальными рибосомами, поскольку главная роль третьего фактора инициации заключается именно в связывании с малой субъединицей рибосомы для предотвращения преждевременной реассоциации субъединиц. Мы поставили эксперимент, в ходе которого продемонстрировали локализацию фактора на бактериальной рибосоме.

Были клонированы и экспрессированы рекомбинантные IF3 и Aim23p (последний - в двух вариантах: полноразмерный и лишенный концевых участков).

В ходе эксперимента проверяли взаимодействие как отдельных белков с бактериальными рибосомами, так и то, как одновременно связываются с рибосомными субъединицами белки Aim23p и IF3. Тестирование смеси белков Aim23p и IF3 проводилось из соображений, что после десяти часов эксперимента *in vivo* в клетках начинается экспрессия IF3, тогда как Aim23p уже накоплен бактериями. Таким образом, в клетках оказывается аналогичная смесь белков. При проведении эксперимента использовали очищенные рибосомы *E. coli* MG1655, белки брали в десятикратном

избытке. Аликвоту рибосом инкубировали в течение 30 минут с одним из факторов инициации: IF3, Aim23p полноразмерный, Aim23p без концевых участков или смесь двух факторов. При этом происходит связывание белков с рибосомами и диссоциация целых рибосом на субъединицы, если данный фактор способен осуществлять этот процесс. Затем смесь разделяли в градиенте сахарозы 10-40% и проводили фракционирование. В полученных аликвотах детектировали количество РНК. Отбирали фракции, в которых содержалось максимальное количество 30S субъединиц или полных рибосом, и использовали их при Вестерн-блот анализе.

Компоненты разделяли с помощью ПААГ электрофореза. Вестерн-блоттинг проводили с помощью антител против белка Aim23p. Однако, к нашей удаче, оказалось, что данные антитела распознают и IF3 *E. coli*. Вероятно, это связано с тем, что антитела получены на рекомбинантный белок, и в связи с этим распознают и His-tag, который есть и у экспериментального IF3, что позволило нам детектировать и бактериальный фактор. Результаты представлены на рисунке 29.

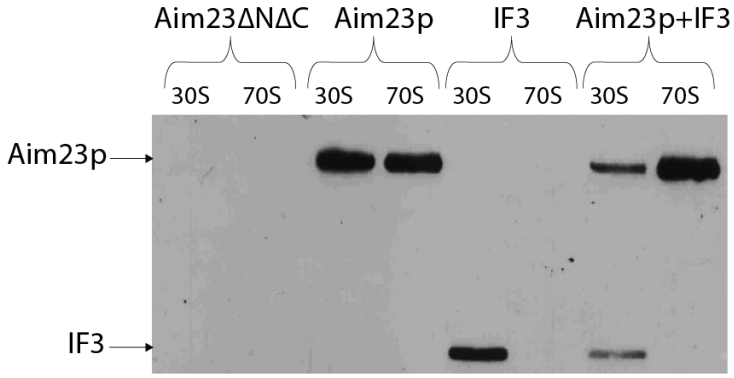

Рисунок 29. Вестерн-блот анализ Aim23p и IF3 после электрофоретического разделения продуктов инкубации с бактериальными рибосомами. Дорожки с экспериментальными белками расположены по парам, на первую нанесены белки из фракции 30S субъединиц рибосомы, на второй – из фракции 70S рибосом. Факторы детектированы с помощью моноклональных антител к Aim23p.

Представленные на рисунке 29 результаты эксперимента свидетельствуют, что IF3 взаимодействует со свободной 30S субъединицей, что подтверждается литературными данными. Aim23p, лишенный концевых участков, не был детектирован на геле. Таким образом, данный вариант фактора не взаимодействует с бактериальной рибосомой. Этот результат подтверждает данные прошлого эксперимента – рост штамма *E. coli*, содержащего этот белок, сходен с отрицательным контролем, в котором фактор отсутствует. Таким образом, укороченный Aim32p не принимает участия в процессе

трансляции и никак не взаимодействует с рибосомами. Полноразмерный же Aim23p связался как с 30S субъединицей, так и с целой рибосомой. Эта ситуация не характерна для активности третьего фактора инициации трансляции, поскольку, взаимодействуя с рибосомой, белок вызывает диссоциацию органеллы на субъединицы, и не может быть детектирован на целой рибосоме. Кроме того, сайт посадки фактора расположен между двумя субъединицами. В случае со смесью бактериального и дрожжевого факторов наблюдали связывание с целой рибосомой только фактора Aim23p, тогда как с малой субъединицей были связаны оба фактора. Стоит обратить внимание, что количество каждого отдельного фактора, связавшегося с малой субъединицей, в смеси меньше, чем в случае, когда связывание происходило только с одним фактором. Из этого можно сделать предположение, что IF3 и Aim23p конкурируют друг с другом за сайт посадки на рибосоме, и достаточное количество IF3 не может связаться с органеллой, эффективность трансляции снижается, что отражается на скорости роста культуры. С другой стороны, связывание Aim23p с целой рибосомой без ее диссоциации может приводить к ее стабилизации в ассоциированном состоянии, а следовательно, к выводу отдельных рибосом из трансляционного цикла, что также провоцирует снижение скорости роста бактерий.

В ходе эволюционного процесса происходит адаптация компонентов клеточных систем. Бактериальный аппарат трансляции узко специализирован под выполнение своих функций, и изменения в нем могут значительно снизить его эффективность, что подтверждается нашими экспериментами. С другой стороны, митохондриальные системы трансляции сильнее подвержены изменениям, и скорость их эволюции значительно выше в связи с близостью источника активных форм кислорода. Элементы трансляционной машины более лабильны, что облегчает их приспособление к быстро меняющимся условиям, и модификация отдельных ее частей не оказывает критического влияния на работу системы в целом.

5. ВЫВОДЫ

1. Нарушения трансляции в митохондриях пекарских дрожжей, вызванные делецией гена *AIM23*, не связаны с процессом синтеза митохондриальных транскриптов;
2. Для функционирования Aim23p в митохондриях пекарских дрожжей необходимо наличие в составе данного белка хотя бы одного из концевых удлинений;
3. Третий фактор инициации митохондриальной трансляции человека, в том числе лишенный концевых участков, может полностью компенсировать отсутствие Aim23p в клетках дрожжей;
4. Химерный белок, сконструированный путем добавления концевых удлинений Aim23p к бактериальному IF3, полностью функционально заменяет Aim23p в клетках дрожжей;
5. Aim23p не способен выполнять роль IF3 в клетках бактерий;
6. Рекомбинантный Aim23p связывается как с малой субъединицей очищенных бактериальных рибосом, так и с целой бактериальной рибосомой.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Я хочу выразить искреннюю благодарность своему научному руководителю Каменскому Петру Андреевичу за чуткое руководство, ценные советы и замечания при выполнении работы и написании текста диссертации, моральную поддержку и помощь в организационных процессах, а также за терпение, проявленное во время подготовки работы.

От всей души благодарю Кузьменко Антона Викторовича за помощь в освоении методик, содействие при планировании экспериментов и обсуждении результатов, а также за доброжелательную рабочую атмосферу. Я глубоко признательна Левицкому Сергею Алексеевичу за обучение азам молекулярной биологии, участие в обсуждении результатов экспериментов и ценные рекомендации, предоставление ряда препаратов для исследования. Также хочу поблагодарить мою студентку Климонтову Марию за продуктивную совместную работу.

Я невероятно благодарна всем сотрудникам и студентам лаборатории, в которой мне посчастливилось работать, за комфортную атмосферу и полезное обсуждение рабочих моментов.

Отдельно хочу поблагодарить преподавателей кафедры молекулярной биологии и кафедры микробиологии за знания и навыки, полученные мной во время обучения.

Наконец, я хочу сказать большое спасибо моим родным и друзьям за поддержку и терпение, без вас эта работа бы не состоялась.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abahuni N, Gispert S, Bauer P, Riess O, Krüger R, Becker T, Auburger G (2007) Mitochondrial translation initiation factor 3 gene polymorphism associated with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **414**:126-9

2. Agrawal, RK, and Sharma, MR (2012) Structural aspects of mitochondrial translational apparatus. *Curr Opin Struct Biol* **22**: 797–803

3. Akabane S, Ueda T, Nierhaus KH, Takeuchi N (2014) Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria. *PLoS Genet* **10**: e1004616

4. Allen GS, Zavialov A, Gursky R, Ehrenberg M, Frank J (2005) The cryo-EM structure of a translation initiation complex from *Escherichia coli*. *Cell* **121**: 703-12

5. Allen JF (2003) Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. C*omp Funct Genomics* **4**: 31–36

6. Amunts A, Brown A, Bai XC, Llácer JL, Hussain T, Emsley P, Long F, Murshudov G, Scheres SHW, Ramakrishnan V (2014) Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science* **343**: 1485-1489

7. Amunts A, Brown A, Toots J, Scheres SHW, Ramakrishnan V (2015) Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science* **348**: 95-98

8. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-65

9. Andreoli C, Prokisch H, Hörtnagel K, Mueller JC, Münsterkötter M, Scharfe C, Meitinger T (2004) MitoP2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids Res* **32**: D459–62

10. Antoun A , Pavlov M Y , Andersson K , Tenson T , Ehrenberg M (2003) The roles of initiation factor 2 and guanosine triphosphate in initiation of protein synthesis. *EMBO J* **22**: 5593-601

11. Antoun A, Pavlov MY, Lovmar M, Ehrenberg M (2006) How initiation factors maximize the accuracy of tRNA selection in initiation of bacterial protein synthesis. *Mol Cell* **23**: 183–193

12. Atkinson GC, Kuzmenko A, Kamenski P, Vysokikh MY, Lakunina V, Tankov S, Smirnova E, Soosaar A, Tenson T, Hauryliuk V (2012) Evolutionary and genetic analyses of mitochondrial translation initiation factors identify the missing mitochondrial IF3 in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **40**: 6122-34

13. Anvret A, Ran C, Westerlund M, Thelander AC, Sydow O, Lind C, Håkansson A, Nissbrandt H, Galter D, Belin AC (2010) Possible involvement of a mitochondrial translation initiation factor 3 variant causing decreased mRNA levels in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* **2010**:491751

14. Ayyub SA, S L A, Dobriyal D, Aluri S, Spremulli LL, Varshney U (2018) Fidelity of translation in the presence of mammalian mitochondrial initiation factor 3. *Mitochondrion* **39**: 1-8

15. Ayyub SA, Dobriyal D, Varshney U (2017) Contributions of the N- and C-terminal domains of initiation factor 3 to Its functions in the fidelity of initiation and antiassociation of the ribosomal subunits. *J Bacteriol* **199**: e00051-17

16. Barrell BG, Bankier AT, Drouin J (1979) A different genetic code in human mitochondria. *Nature* **282**: 189–94

17. Behrouz B, Vilariño-Güell C, Heckman MG, Soto-Ortolaza AI, Aasly JO, Sando S, Lynch T, Craig D, Uitti RJ, Wszolek ZK, Ross OA, Farrer MJ (2010) Mitochondrial translation initiation factor 3 polymorphism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **486**: 228-30

18. Bhargava K, Spremulli LL (2005) Role of the N- and C-terminal extensions on the activity of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3. *J Biol Chem* **277**: 35541-9

19. Bhargava K, Templeton P, Spremulli LL (2004) Expression and characterization of isoform 1 of human mitochondrial elongation factor G. *Protein Expr Purif* **37**: 368-76

20. Bietenhader M, Martos A, Tetaud E, Aiyar RS, Sellem CH, Kucharczyk R, Clauder-Münster S, Giraud MF, Godard F, Salin B, Sagot I, Gagneur J, Déquard-Chablat M, Contamine V, Hermann-Le Denmat S, Sainsard-Chanet A, Steinmetz LM, di Rago JP (2012) Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. *PLoS Genet* **8**:e1002876

21. Biou V, Shu F, Ramakrishnan V (1995) X-ray crystallography shows that translational initiation factor IF3 consists of two compact alpha/beta domains linked by an alpha-helix. *EMBO J* **14**: 4056–4064

22. Bittner-Eddy P, Monroy AF, Brambl R (1994) Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa*. *J Mol Biol* **235**:881-97.

23. Bjorkholm P, Harish A, Hagstrom E, Ernst AM, Andersson SG (2015) Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 10154-10161

24. Bonnefoy N, Fox TD (2007) Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol Biol* **372**: 153-166

25. Bordonne R, Dirheimer G, Martin RP (1988) Expression of the oxi1 and maturase-related RF1 genes in yeast mitochondria. *Curr Genet* **13**: 227-233

26. Borst P, Grivell LA (1971) Mitochondrial ribosomes. *FEBS Lett* **13**: 73–88

27. Brown A, Amunts A, Bai XC, Sugimoto Y, Edwards PC, Murshudov G, Scheres SHW, Ramakrishnan V (2014) Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science* **346**: 718-722

28. Bruhns J, Gualerzi C (1980) Structure-function relationship in *Escherichia coli* initiation factors: role of tyrosine residues in ribosomal binding and functional activity of IF-3. *Biochemistry* **19**: 1670-6

29. Burger G, Gray MW, Lang BF (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* **19**: 709–16

30. Cantara WA, Murphy FV, Demirci H, Agris PF (2013) Expanded use of sense codons is regulated by modified cytidines in tRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 10964-9

31. Cavdar Koc E, Burkhart W, Blackburn K, Moseley A, Spremulli LL (2001) The small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Identification of the full complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* **276**: 19363-74

32. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**: 628–44

33. Chicherin IV, Zinina VV, Levitskiy SA, Serebryakova MV, Kamenski PA (2019) Aim23p Interacts with the Yeast Mitochondrial Ribosomal Small Subunit. *Biochemistry (Mosc)* **84**:40-46

34. Chimnaronk S, Gravers Jeppesen M, Suzuki T, Nyborg J, Watanabe K (2005) Dual-mode recognition of noncanonical tRNAsSer by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria. *EMBO J* **24**:3369–79

35. Christian BE, Spremulli LL (2009) Evidence for an active role of IF3mt in the initiation of translation in mammalian mitochondria. *Biochemistry* **48**:3269-78

36. Christian BE, Spremulli LL (2010) Preferential selection of the 5'-terminal start codon on leaderless mRNAs by mammalian mitochondrial ribosomes. *J Biol Chem* **285**: 28379-86

37. Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MW, Ragan CI, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Doolittle RF, Attardi G (1985) Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* **314**: 592-7

38. Claros MG, Perea J, Shu YM, Samatey FA, Popot JL, Jacq C (1995) Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem* **228**: 762–71

39. Costanzo, MC., Bonnefoy N, Williams EH, Clark-Walker, GD, Fox TD (2000) Highly diverged homologs of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial mRNA-specific translational activators have orthologous functions in other budding yeasts. *Genetics* **154**: 999-1012

40. Dallas A, Noller HF (2001) Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol Cell* **8**: 855-64

41. De Bellis D, Liveris D, Goss D, Ringquist S, Schwartz I (1992) Structure-function analysis of Escherichia coli translation initiation factor IF3: tyrosine 107 and lysine 110 are required for ribosome binding. *Biochemistry* **31**: 11984-90

42. Denslow ND, Anders JC, O'Brien TW (1991) Bovine mitochondrial ribosomes possess a high affinity binding site for guanine nucleotides. *J Biol Chem* **266**: 9586-90

43. Denslow ND, LiCata VJ, Gualerzi C, O'Brien TW (1988) Interaction of bovine mitochondrial ribosomes with *Escherichia coli* initiation factor 3 (IF3). *Biochemistry* **27**: 3521-7

44. Déquard-Chablat M, Sellem CH, Golik P, Bidard F, Martos A, Bietenhader M, di Rago JP, Sainsard-Chanet A, Hermann-Le Denmat S, Contamine V (2011) Two nuclear life cycle-regulated genes encode interchangeable subunits c of mitochondrial ATP synthase in *Podospora anserina*. *Mol Biol Evol* **28**:2063-75

45. Desai N, Brown A, Amunts A, Ramakrishnan V (2017) The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science* **355**: 528-531

46. Dottavio-Martin D, Suttle DP, Ravel JM (1979) The effects of initiation factors IF-1 and IF-3 on the dissociation of *Escherichia coli* 70 S ribosomes. *FEBS Lett* **97**: 105-10

47. Dubot A, Godinot C, Dumur V, Sablonnière B, Stojkovic T, Cuisset JM, Vojtiskova A, Pecina P, Jesina P, Houstek J (2004) GUG is an efficient initiation codon to translate the human mitochondrial ATP6 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 687-93

48. Elvekrog MM, Gonzalez RL Jr (2013) Conformational selection of translation initiation factor 3 signals proper substrate selection. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 628-33

49. Embley TM, Martin W (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**: 623-30

50. Fabbretti A, Pon CL, Hennelly SP, Hill WE, Lodmell JS, Gualerzi CO (2007) The real-time path of translation factor IF3 onto and off the ribosome. *Mol Cell* **25**: 285-96

51. Faye G, Simon M (1983a) Analysis of a yeast nuclear gene involved in the maturation of mitochondrial pre-messenger RNA of the cytochrome oxidase subunit I. *Cell*. **32**, 77-87

52. Faye G, Simon M (1983b) Processing of the oxi-3 pre-messenger RNA in yeast, in mitochondria. *Nucleo-Mitochondrial Interactions* 433-439

53. Fearnley IM, Walker JE (1987) Initiation codons in mammalian mitochondria: differences in genetic code in the organelle. *Biochemistry* **26**: 8247-51

54. Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **440**: 325-31

55. Fox TD, Sanford JC, McMullin TW (1988) Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA. *PNAS* **85**: 7288–92

56. Frazier AE, Taylor RD, Mick DU, Warscheid B, Stoepel N, Meyer HE, Ryan MT, Guiard B, Rehling P (2006). Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* **172**: 553–564

57. Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, González-Halphen D (2002) The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **277**: 6051-8

58. Fu Q, Li H, Moorjani P, Jay F, Slepchenko SM, Bondarev AA, Johnson PL, Aximu-Petri A, Prüfer K, de Filippo C, Meyer M, Zwyns N, Salazar-García DC, Kuzmin YV, Keates SG, Kosintsev PA, Razhev D, Richards MP, Peristov NV, Lachmann M, Douka K, Higham TF, Slatkin M, Hublin JJ, Reich D, Kelso J, Viola TB, Pääbo S (2014) Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature* **514**: 445–49

59. Gaur R, Grasso D, Datta PP, Krishna PD, Das G, Spencer A, Agrawal RK, Spremulli L, Varshney U (2008) A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol Cell* **29**: 180–190

60. Garcia C, Fortier PL, Blanquet S, Lallemand JY, Dardel F (1995) Solution structure of the ribosome-binding domain of *E. coli* translation initiation factor IF3. Homology with the U1A protein of the eukaryotic spliceosome. *J Mol Biol* **254**: 247-59

61. Gualerzi CO, Pon CL (1990) Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**: 5881-9

62. Gray MW, Burger G, Lang BF (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* **2**: reviews 1018.1–5

63. Greber BJ, Bieri P, Leibundgut M, Leitner A, Aebersold R, Boehringer D, Ban N (2015) Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. *Science* **348**: 303-8

64. Greber BJ, Boehringer D, Leibundgut M, Bieri P, Leitner A, Schmitz N, Aebersold R, Ban N (2014a) The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* **515**: 283-6

65. Greber BJ, Boehringer D, Leitner A, Bieri P, Voigts-Hoffmann F, Erzberger JP, Leibundgut M, Aebersold R, Ban N (2014b) Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* **505**: 515-9

66. Green DR, Reed JC (1988) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-12

67. Green-Willms NS, Fox TD, Costanzo MC (1998) Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders. *Mol Cell Biol* **18**: 1826-1834

68. Groot GS, Flavell RA, Van Ommen GJ, Grivell LA (1974) Yeast mitochondrial RNA does not contain poly(A). *Nature* **252**: 167-169

69. Grunberg-Manago M, Dessen P, Pantaloni D, Godefroy-Colburn T, Wolfe AD, Dondon J (1975) Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* **94**: 461-78

70. Haffter P, McMullin TW, Fox TD (1991) Functional interactions among two yeast mitochondrial ribosomal proteins and an mRNA-specific translational activator. *Genetics* **127**:319-26.

71. Haque ME, Grasso D, Spremulli LL (2008) The interaction of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 with ribosomes: evolution of terminal extensions in IF3mt. *Nucleic Acids Res* **36**: 589-97

72. Haque ME, Spremulli LL (2008) Roles of the N- and C-terminal domains of mammalian mitochondrial initiation factor 3 in protein biosynthesis. *J Mol Biol* **384**: 929-40

73. Hartz D, Binkley J, Hollingsworth T, Gold L (1990) Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by *Escherichia coli* IF3. *Genes Dev* **4**: 1790-800

74. Hartz D, McPheeters DS, Gold L (1989) Selection of the initiator tRNA by *Escherichia coli* initiation factors. *Genes Dev* **3**: 1899-912

75. Hell K, Neupert W, Stuart RA (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J* **20**: 1281–1288

76. Hess DC, Myers CL, Huttenhower C, Hibbs MA, Hayes AP, Paw J, Clore JJ, Mendoza RM, Luis BS, Nislow C, Giaever G, Costanzo M, Troyanskaya OG, Caudy AA (2009)

Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet* **5**: e1000407

77. Herrmann JM, Woellhaf MW, Bonnefoy N (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 286-294

78. Hofmann TJ, Min J, Zassenhaus HP (1993) Formation of the 3' end of yeast mitochondrial mRNAs occurs by site-specific cleavage two bases downstream of a conserved dodecamer sequence. *Yeast* **9**: 1319-1330

79. Hussain T, Llácer JL, Wimberly BT, Kieft JS, Ramakrishnan V (2016) large-scale movements of IF3 and tRNA during bacterial translation initiation. *Cell* **167**: 133-144

80. Islas-Osuna MA, Ellis TP, Marnell LL, Mittelmeier TM, Dieckmann CL (2002) Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome b mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*.*J Biol Chem* **277**:37987-90

81. Jia L, Dienhart M, Schramp M, McCauley M, Hell K, Stuart RA (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J* **22**: 6438-47

82. Jones CN, Wilkinson KA, Hung KT, Weeks KM, Spremulli LL (2008) Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs. *RNA* **14**: 862-71

83. Johnston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC, Butow RA (1988) Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* **240**: 1538–41

84. Juhling F, Putz J, Florentz C, Stadler PF (2012) Armless mitochondrial tRNAs in *Enoplea* (Nematoda). *RNA Biol* **9**: 1161–66

85. Julián P, Milon P, Agirrezabala X, Lasso G, Gil D, Rodnina MV, Valle M (2011) The Cryo-EM structure of a complete 30S translation initiation complex from *Escherichia coli*. *PLoS Biol* **9**: e1001095

86. Kamenski P, Kolesnikova O, Jubenot V, Entelis N, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov, I (2007) Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol Cell* **26**: 625–637.

87. Khalimonchuk O, Bird A, Winge DR. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **282**: 17442-17449

88. Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, Jeffery L, Baek ST, Lee H, Shim YS, Lee M, Kim L, Heo KS, Noh EJ, Lee AR, Jang YJ, Chung KS, Choi SJ, Park JY, Park Y, Kim HM, Park SK, Park HJ, Kang EJ, Kim HB, Kang HS, Park HM, Kim K, Song K, Song KB, Nurse P, Hoe KL (2010) Analysis of a

genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* **28**: 617-623

89. Koc EC, Burkhart W, Blackburn K, Moyer MB, Schlatzer DM, Moseley A, Spremulli LL (2001) The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* **276**: 43958-69

90. Koc EC, Spremulli LL (2002) Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. *J Biol Chem* **277**: 35541-9

91. Koripella RK, Sharma MR, Haque ME, Risteff P, Spremulli LL, Agrawa RK (2019) Structure of human mitochondrial translation initiation factor 3 bound to the small ribosomal subunit. *ISCIENCE* **12**: 76-86

92. Korostelev A, Trakhanov S, Laurberg M, Noller HF (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements.*Cell* **126**:1065-77

93. Kuzmenko A, Atkinson GC, Levitskii S, Zenkin N, Tenson T, Hauryliuk V, Kamenski P (2014) Mitochondrial translation initiation machinery: conservation and diversification. *Biochimie* **100**:132-40

94. Kuzmenko AV, Levitskii SA, Vinogradova EN, Atkinson GC, Hauryliuk V, Zenkin N, Kamenski PA (2013) Protein biosynthesis in mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* **78**: 855-66

95. Krause-Buchholz U, Barth, K, Dombrowski C, Rodel G (2004) Saccharomyces cerevisiae translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. Curr Genet 46: 20--28

96. Krause-Buchholz U, Schobel K, Lauffer S, Rodel G (2005) *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biol Chem* **386**: 407-415

97. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**: 619-42

98. La Teana A, Gualerzi CO, Brimacombe R (1995). From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. *RNA* **1**: 772-82

99. Lancaster L, Noller HF (2005) Involvement of 16S rRNA nucleotides G1338 and A1339 in discrimination of initiator tRNA. *Mol Cell* **20**: 623-32

100. Laursen BS, Sørensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 101-23

101. Leaver CJ, Harmey MA (1976) Higher-plant mitochondrial ribosomes contain a 5S ribosomal ribonucleic acid component. *Biochem J* **157**: 275–77

102. Liao HX, Spremulli LL (1989) Interaction of bovine mitochondrial ribosomes with messenger RNA. J Biol Chem 264: 7518-22

103. Liao HX, Spremulli LL (1990) Identification and initial characterization of translational initiation factor 2 from bovine mitochondria. *J Biol Chem* **265**: 13618-22

104. Liao HX, Spremulli LL (1991) Initiation of protein synthesis in animal mitochondria. Purification and characterization of translational initiation factor 2. *J Biol Chem* **266**: 20714-9

105. Liiv A, O'Connor M (2006) Mutations in the intersubunit bridge regions of 23 S rRNA. *J Biol Chem* **281**:29850-62

106. Lin K, Kuang Y, Joseph JS, Kolatkar PR (2002) Conserved codon composition of ribosomal protein coding genes in *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Saccharomyces cerevisiae*: lessons from supervised machine learning in functional genomics. *Nucleic Acids Res* **30**: 2599-60

107. Lipinski KA, Kaniak-Golik A, Golik P (2010) Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome - from genetics to evolution and systems biology. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 1086-98

108. López-Alonso JP, Fabbretti A, Kaminishi T, Iturrioz I, Brandi L, Gil-Carton D, Gualerzi CO, Fucini P, Connell SR (2017) Structure of a 30S pre-initiation complex stalled by GE81112 reveals structural parallels in bacterial and eukaryotic protein synthesis initiation pathways. *Nucleic Acids Res* **45**: 2179-2187

109. Maar D, Liveris D, Sussman JK, Ringquist S, Moll I, Heredia N, Kil A, Bläsi U, Schwartz I, Simons RW (2008) A single mutation in the IF3 N-terminal domain perturbs the fidelity of translation initiation at three levels. *J Mol Biol* **383**: 937-44

110. Marykwas DL, Fox TD (1989) Control of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene PET494: transcriptional repression by glucose and translational induction by oxygen. *Mol Cell Biol* **9**: 484-491

111. Milon P, Konevega AL, Gualerzi CO, Rodnina MV (2008) Kinetic checkpoint at a late step in translation initiation. *Mol Cell* **30**: 712-20

112. Meinnel T, Sacerdot C, Graffe M, Blanquet S, Springer M (1999) Discrimination by *Escherichia coli* initiation factor IF3 against initiation on non-canonical codons relies on complementarity rules. *J Mol Biol* **290**: 825-37

113. Montoya J, Ojala D Attardi G (1981) Distinctive features of the 5`-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **290**: 465-470

114. Mortensen KK, Kildsgaard J, Moreno JM, Steffensen SA, Egebjerg J, Sperling-Petersen HU (1998) A six-domain structural model for *Escherichia coli* translation initiation factor IF2. Characterisation of twelve surface epitopes. *Biochem Mol Biol Int* **46**:1027-41

115. Nagley P, Farrell LB, Gearing DP, Nero D, Meltzer S, Devenish RJ (1988) Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:2091-5

116. Naithani S, Saracco SA, Butler CA, Fox TD (2003) Interactions among *COX1*, *COX2*, and *COX3* mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**: 324-333

117. Neupert W (2015) A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *J Mol Bio*l **427**: 1135–58

118. Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT, Paulsen IT, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Alley MR, Ohta N, Maddock JR, Potocka I, Nelson WC, Newton A, Stephens C, Phadke ND, Ely B, DeBoy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Kolonay JF, Smit J, Craven MB, Khouri H, Shetty J, Berry K, Utterback T, Tran K, Wolf A, Vamathevan J, Ermolaeva M, White O, Salzberg SL, Venter JC, Shapiro L, Fraser CM (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *PNAS* **98**: 4136-41

119. Nyengaard NR, Mortensen KK, Lassen SF, Hershey JW, Sperling-Petersen HU (1991) Tandem translation of *E. coli* initiation factor IF2 beta: purification and characterization *in vitro* of two active forms. *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 1572-9

120. O`Brien TW (1971) The general occurrence of 55S ribosomes in mammalian liver mitochondria. *J Bio Chem* **246**: 3409-3417

121. Olsson CL, Graffe M, Springer M, Hershey JW (1996) Physiological effects of translation initiation factor IF3 and ribosomal protein L20 limitation in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **250**: 705-14

122. Osawa S, Jukes TH, Watanabe K, Muto A (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev* **56**: 229-64

123. Ott M, Amunts A, Brown A (2016) Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis. *Annu Rev Biochem* **85**: 77-101

124. Ott M, Herrmann JM (2010) Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 767-75

125. Ott M, Prestele M, Bauerschmitt H, Funes S, Bonnefoy N, Herrmann JM (2006) Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J* **25**:1603–10

126. Palmer JD (1997) Organelle genomes: going, going, gone! *Science* **275**:790-1

127. Patrushev MV, Kamenski PA, Mazunin IO (2014) Mutations in mitochondrial DNA and approaches for their correction. *Biochemistry (Mosc)* **79**: 1151-1160

128. Pavlov MY, Antoun A, Lovmar M, Ehrenberg M (2008) Complementary roles of initiation factor 1 and ribosome recycling factor in 70S ribosome splitting. *EMBO J* **27**: 1706-17

129. Peske F, Rodnina MV, Wintermeyer W (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Mol Cell* **18**: 403-12

130. Petrelli D, Garofalo C, Lammi M, Spurio R, Pon CL, Gualerzi CO, La Teana A (2003) Mapping the active sites of bacterial translation initiation factor IF3. *J Mol Biol* **331**: 541-56

131. Petrelli D, La Teana A, Garofalo C, Spurio R, Pon CL, Gualerzi CO (2001) Translation initiation factor IF3: two domains, five functions, one mechanism? *EMBO J* **20**: 4560-9

132. Pfeffer S, Woellhaf MW, Herrmann JM2, Förster F (2015) Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nat Commun* **6**: 6019

133. Pino P, Aeby E, Foth BJ, Sheiner L, Soldati T, Schneider A, Soldati-Favre D (2010) Mitochondrial translation in absence of local tRNA aminoacylation and methionyl tRNA Met formylation in Apicomplexa. *Mol Microbiol* **76**: 706-18

134. Pioletti M, Schlünzen F, Harms J, Zarivach R, Glühmann M, Avila H, Bashan A, Bartels H, Auerbach T, Jacobi C, Hartsch T, Yonath A, Franceschi F (2001) Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J* **20**: 1829-39

135. Sacerdot C, de Cock E, Engst K, Graffe M, Dardel F, Springer M (1999) Mutations that alter initiation codon discrimination by *Escherichia coli* initiation factor IF3. *J Mol Biol* **288**: 803-10

136. Schneider A (2011) Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu Rev Biochem* **80**: 1033-1053

137. Schwartzbach CJ, Spremulli LL (1989) Bovine mitochondrial protein synthesis elongation factors. Identification and initial characterization of an elongation factor Tu-elongation factor Ts complex. *J Biol Chem* **264**: 19125-31

138. Selmer M, Dunham CM, Murphy FV 4th, Weixlbaumer A, Petry S, Kelley AC, Weir JR, Ramakrishnan V (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**: 1935-42

139. Sette M, Spurio R, van Tilborg P, Gualerzi CO, Boelens R (1999) Identification of the ribosome binding sites of translation initiation factor IF3 by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *RNA* **5**: 82-92

140. Sette M, van Tilborg P, Spurio R, Kaptein R, Paci M, Gualerzi CO, Boelens R (1997) The structure of the translational initiation factor IF1 from *E.coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J* **16**: 1436-43

141. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP (2014) Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis* **35**: 515-27

142. Sharma MR, Koc EC, Datta PP, Booth TM, Spremulli LL, Agrawal RK (2003) Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* **115**: 97–108

143. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *PNAS* **100**: 13207–12

144. Sørensen HP, Hedegaard J, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK (2001) Remarkable conservation of translation initiation factors: IF1/eIF1A and IF2/eIF5B are universally distributed phylogenetic markers. *IUBMB Life* **51**:321-7

145. Spencer AC, Spremulli LL (2005) The interaction of mitochondrial translational initiation factor 2 with the small ribosomal subunit. *Biochim Biophys Acta* **1750**: 69–81

146. Spremulli LL, Coursey A, Navratil T, Hunter SE (2004). Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **77**: 211-61

147. Spremulli L, Kraus BL (1987) Bovine mitochondrial ribosomes: effect of cations and heterologous dissociation factors on subunit interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **147**: 1077-81

148. Sussman JK, Simons EL, Simons RW (1996) *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon *in vivo*. *Mol Microbiol* **21**: 347-60

149. Steffensen SA, Poulsen AB, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU (1997) *E. coli* translation initiation factor IF2 - an extremely conserved protein. Comparative sequence analysis of the *infB* gene in clinical isolates of *E. coli*. *FEBS Lett* **419**: 281-4

150. Supekova L, Supek F, Greer JE, Schultz PG (2010) A single mutation in the first transmembrane domain of yeast *COX2* enables its allotopic expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 5047-52

151. Suzuki T, Nagao A (2011) Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet* **45**: 299–329

152. Tapprich WE, Goss DJ, Dahlberg AE (1989) Mutation at position 791 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA affects processes involved in the initiation of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4927-31

153. Tedin K, Moll I, Grill S, Resch A, Graschopf A, Gualerzi CO, Bläsi U (1999) Translation initiation factor 3 antagonizes authentic start codon selection on leaderless mRNAs. *Mol Microbiol* **31**: 67-77

154. Temperley R, Richter R, Dennerlein S, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2010a).

155. Temperley RJ, Wydro M, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2010b) Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 1081-5

156. Tibbetts AS, Oesterlin L, Chan SY, Kramer G, Hardesty B, Appling DR (2003) Mammalian mitochondrial initiation factor 2 supports yeast mitochondrial translation without formylated initiator tRNA. *J Biol Chem* **278**: 31774-80

157. Tsuboi M, Morita H, Nozaki Y, Akama K, Ueda T, Ito K, Nierhaus KH, Takeuchi N (2009) EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis. *Mol Cell* **35**: 502-10

158. von Heijne G (1986) Why mitochondria need a genome. *FEBS* **198**: 1-4

159. Wende S, Platzer EG, Jühling F, Pütz J, Florentz C, Stadler PF, Mörl M (2014) Biological evidence for the world's smallest tRNAs. *Biochimie* **100**: 151–58

160. Wiesenberger G, Costanzo MC, Fox TD (1995) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX3* mRNA 5' untranslated leader: translational activation and mRNA processing. *Mol Cell Biol* **15**: 3291-3300

161. Williams EH, Butler CA, Bonnefoy N, Fox TD (2007) Translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: functional interactions among mitochondrial ribosomal protein Rsm28p, initiation factor 2, methionyl-tRNA-formyltransferase and novel protein Rmd9p. *Genetics* **175**: 1117-26

162. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T,

Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schafer M, Muller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sanchez M, del Rey F, Benito J, Dominguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerrutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871–880

163. Woriax VL, Burkhart W, Spremulli LL (1995) Cloning, sequence analysis and expression of mammalian mitochondrial protein synthesis elongation factor Tu. *Biochim Biophys Acta* **1264**: 347-56

164. Yassin AS, Haque ME, Datta PP, Elmore K, Banavali NK, Spremulli LL, Agrawal RK (2011) Insertion domain within mammalian mitochondrial translation initiation factor 2 serves the role of eubacterial initiation factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 3918-23

165. Yu NJ, Spremulli LL (1998) Regulation of the activity of chloroplast translational initiation factor 3 by NH2- and COOH-terminal extensions. *J Biol Chem* **273**: 3871

166. Zavialov AV, Hauryliuk VV, Ehrenberg M (2005) Splitting of the posttermination ribosome into subunits by the concerted action of RRF and EF-G. *Mol Cell* **18**: 675-86