

На правах рукописи

СМИРНОВА Екатерина Васильевна

**Изучение взаимодействия импортируемой в митохондрии
дрожжевой лизиновой тРНК с предшественником
митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы**

03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2012

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и в Университете Страсбурга (Франция)

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Кандидат биологических наук **Каменский Петр Андреевич**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Колб Вячеслав Адамович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН, ведущий научный сотрудник

Новикова Людмила Александровна, доктор биологических наук, НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, ведущий научный сотрудник

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ)

Защита состоится 24 мая 2012 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета Д.501.001.76 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские Горы, МГУ, Биологический факультет, ауд.389.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан «24» апреля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Митохондрии обладают собственным геномом и системой синтеза белка, однако большинство генов в ходе эволюции перенеслось из митохондриального генома в ядерный. В связи с этим из цитоплазмы в митохондрии импортируется значительное число макромолекул: как белков, так и РНК. Количество импортируемых в митохондрии белков у всех организмов значительно превосходит количество белков, синтезируемых в митохондриальном матриксе (например, у человека в митохондриях синтезируется 13, а у *S. cerevisiae* – 9 белков из более чем тысячи необходимых для функционирования органелл). В то же время, количество импортируемых РНК значительно варьируется от вида к виду. Так, например, у простейших рода *Tetrahymena* из 36 митохондриальных тРНК из цитоплазмы импортируется 26, у растения *M. polymorpha* импортируется 2 тРНК, а 27 закодировано в митохондриальном геноме, у дрожжей *S. cerevisiae* импортируется лишь одна лизин-вая тРНК. У млекопитающих тРНК в митохондрии не импортируются, однако показан импорт 5S рРНК и РНК, входящих в состав РНКаз Р и MRP.

Несмотря на то, что у млекопитающих отсутствует конститутивный импорт тРНК, в их клетках есть все необходимое для осуществления этого процесса. Было показано, что производные импортируемой дрожжевой тРНК (тРЛ1) при экспрессии их генов в клетках человека начинают импортироваться в митохондрии млекопитающих и включаться в процесс трансляции. Это позволяет предполагать, что импорт тРНК в митохондрии у дрожжей и млекопитающих происходит по одному и тому же механизму. Значительное количество наследственных заболеваний человека ассоциировано с мутациями в митохондриальной ДНК. Эти мутации зачастую затрагивают гены тРНК. Импорт не мутированных тРНК из цитоплазмы и их включение в митохондриальную трансляцию позволил бы супрессировать такие мутации.

Импорт тРЛ1 в митохондрии дрожжей является высокоспецифичным процессом. В определении его специфичности играет роль не только нуклеотидная последовательность импортируемой тРНК, но и структура белка-переносчика, которым является предшественник митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (preMsk1p). Этот белок после импорта в митохондрии подвергается протеолитическому расщеплению, в результате которого он теряет сигнал митохондриальной локализации. После этого белок становится функциональным в качестве аминоксил-тРНК-синтетазы и выполняет свою основную функцию – аминокислотилирует митохондриальную лизиновую тРНК (тРЛ3). Ранее в нашей лаборатории было показано *in vitro*, что мутагенез определенных участков preMsk1p расширяет набор импортируемых молекул. В нашей работе мы попытались определить степень вовлеченности этих участков в обеспечение импорта тРЛ1 в митохондрии, а также их роль в процессе определения специфичности импорта.

Цели работы:

- 1) Найти в составе белка preMsk1p участки, обеспечивающие процесс импорта тРЛ1 в митохондрии дрожжей, определить, как мутагенез этих участков влияет на процесс импорта тРЛ1.
- 2) Выявить участок белка, отвечающий за определение специфичности импорта тРНК в митохондрии дрожжей.

Экспериментальные задачи:

- 1) Сравнить последовательность preMsk1p с известной последовательностью лизил-тРНК-синтетазы *E. coli*, найти участки, по которым отличается вторичная структура белков.
- 2) С помощью сайт-направленного мутагенеза создать мутантные версии preMsk1p с делециями найденных участков.

- 3) Используя методы задержки в геле и *in vitro* импорта тРНК в митохондри, определить, способны ли мутантные версии белка связывать тРЛ1 и направлять ее импорт в изолированные митохондрии.
- 4) Создать штаммы дрожжей с заменой гена *MSK1* на одну из его мутантных версий. Определить фенотипическое проявление мутаций в гене *MSK1*.
- 5) Выделить митохондрии из мутантных штаммов дрожжей и методом Норзерн-блот-гибридизации определить, какие из цитозольных малых РНК присутствуют в митохондриальном матриксе.
- 6) Подобрать условия гетерологической экспрессии гена *MSK1* в клетках *E. coli*, приводящей к синтезу белка в растворимой форме.

Научная новизна:

- 1) Впервые картирован участок белка preMsk1p, являющийся критичным для направления импорта тРЛ1 в митохондрии дрожжей.
- 2) Показано, что для эффективного направления импорта тРЛ1 необходимо сохранение структуры этого участка. Полученные данные согласуются с предварительными данными о неканонической структуре комплекса preMsk1p и тРЛ1.
- 3) Картированы участки, регулирующие процесс импорта тРЛ1.
- 4) Картирован участок, определяющий специфичность процесса импорта.
- 5) Впервые разработана методика, позволяющая синтезировать preMsk1p в клетках *E. coli* в растворимом виде.

Структура диссертации:

Диссертация состоит из четырех частей: 1) обзор литературы; 2) материалы и методы; 3) результаты и обсуждение; 4) приложения.

Работа содержит список цитируемой литературы (130 ссылок), 39 рисунков, 5 таблиц. Общий объем диссертации 114 страниц.

Апробация работы и публикации:

Результаты диссертации были представлены на регулярно проводящихся семинарах кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, а также на международных конференциях: съезд общества ARCUS (Страсбург, Франция, 2008), международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2009 (Москва, Россия, 2009); 23-я международная конференция «тРНК» (Авейро, Португалия, 2010), 16-й ежегодный съезд членов научного общества «РНК» (Киото, Япония, 2011). По теме диссертации опубликовано 2 статьи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались культуры пекарских дрожжей *S. cerevisiae*: штамм W303 и его производные: WΔM+pMRS (штамм с удаленным в геноме геном *MSK1*, этот ген находится в составе центромерной дрожжевой плазмиды), WΔM+pAshRS (штамм с удаленным в геноме геном *MSK1* и с ортологичным геном *Ashbya gossypii* в составе дрожжевой центромерной плазмиды) а также штаммы на основе WΔM и WΔM+pMRS с разнообразными мутантными версиями гена *MSK1* – для исследования эффекта мутаций белка preMsk1p *in vivo*; штаммы бактерий *E. coli* (штаммы XL1Blue, BL21 Rosetta) для молекулярного клонирования и гетерологичной экспрессии белков.

Клетки дрожжей растили при 30 или 37 °C на разнообразных средах в зависимости от цели исследования: селективных средах для поддержания внесенных мутаций, средах, содержащих несбраживаемые источники углерода (глицерин, лактат) для проведения тестов на функциональность митохондрий.

Выделение митохондрий и эксперименты по импорту тРНК в изолированные митохондрии проводили согласно оригинальным методикам, разработанным в нашей группе.

Состав РНК в митохондриях определяли методом Норзерн-блот-гибридизации.

Белки экспрессировали в клетках *E. coli*: клетки индуцировали в логарифмической фазе роста 0,1–1 mM IPTG в течение 1–10 часов, затем клетки лизировали в фосфатном буфере, содержащем 100–500 mM NaCl. Очистку белков проводили методом аффинной хроматографии на носителе с никелем (Ni-агарозе фирмы QiaGen) по стандартному протоколу производителя или с внесенными в него изменениями.

Эксперименты по измерению кругового дихроизма белков проводили при 22 °C на приборе JASCO J-810 в 0,1-см кювете.

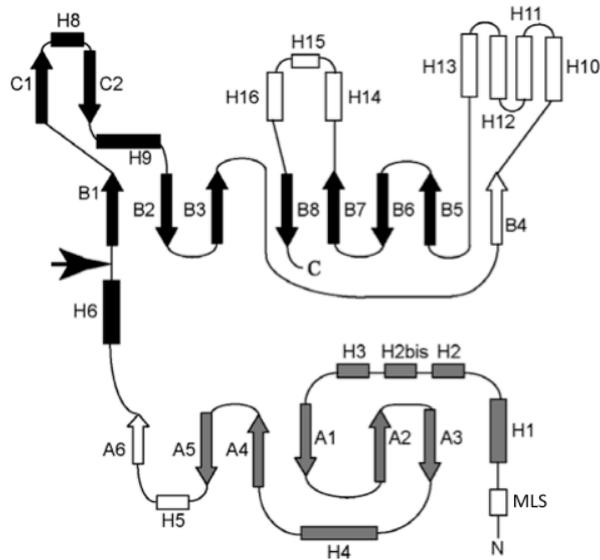
Делеции в составе preMsk1p вносились с применением набора QuikChange фирмы Stratagene.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск участков preMsk1p, являющихся ответственными за импорт тРЛ1 в митохондрии дрожжей

preMsk1p, как и другие аминоксил-тРНК-синтетазы класса IIb, состоит из двух доменов: каталитического С-концевого и N-концевого, отвечающего за первичное связывание тРНК (рис. 1А). Ранее в нашей лаборатории было показано, что N-концевой домен способен направлять специфический импорт тРЛ1 в митохондрии, то есть может полностью заменять полноразмерный белок в данном процессе. Это говорит о том, что все детерминанты импорта тРЛ1 в митохондрии находятся в составе N-концевого домена. Выравнивание последовательности preMsk1p с последовательностью ЛизРС *E. coli*, для которой известна кристаллическая структура, позволило смоделировать вторичную структуру preMsk1p. Было найдено несколько участков, которые у этих двух белков отличались. Особенно интересными для дальнейшего рассмотрения участками нам показались элементы d1 и d2, а также участки N1–N3 и N5–N6 (рис. 1Б).

A



```

-----SLAH1AVDTSKMEATRRNGQ--IVKDLGRYYPMSSEH2ALHDLH2bisCQEQYKVEVTIADFN
SEQETRGANEH1AIDFNDELRRNRREKLAALRQGG-VAFPN-----DFRRDHTSDH2QLH

```

```

ERFLSNPATLHHEDNPNLLSA1SINGRIKSIRFSGQKIVFIDLYNGSSA2GLKNDTQLQLIVNY
EEFDAKDNA3QEL--ESLNIEVSVAGRMMTRRIMG-KASFVTLQDVGG-----RIQLYVAR

```

```

NKIGGSSH4SEDKANFSEYMNFLKKGDIA4IKALGYPGFSQSRVKMLSLICNKLPIVL--SVSQL
DSLPEG-----VYNDQFKKWDLGDIA5GARGTLF--KTQTGELSIHCTELRLLTKALRPLP

```

```

PLPSRLNDEH5TKIKSNRVVDYA6QINGT--QTLVLRARIKLLRKFLLDRH6RFVEVEB1TPILSSK
DKFHGLQDQEVRYRQRYLDLIANDKSRQTFVVRSKILAAIRQFMVARGB1FMEVETPMC1QVI

```

```

SNGAMAKPFC1FITSSKDFDH8HLELRC2IAPELWLKRLIISGLQRYVEIGKVFERNEGIDSTHNAE
PGGASARPFC2ITHHNALDC3LDMYLRH8IAPELYLKRLVVGGFERVB2FEINRNERNEGISVRHNPE

```

```

FSTLEFYETYMSMDDIVTRTEDLFKFLITNLB2QKFFQDB3TRLPVPKTFSELHLALSENWKF
FTMMELYMAB3VADYHDLIELTH9ESLFRD1TLAQEVLD1GTTKVT-----YD2GEHVDFGKPF

```

```

RKVEB4FLPTLNKELGIDLMNSGLDH10INH11KPSELLKALPKDH12IAKKYFPSADNTGQLSH13SLQILNK
EKLTB4MREAIKKYRPETDMADLDH10NFD----AAKALAH11ESIGITVEK-----SWGLGRIVTE

```

```

LSDVFLEQB5RHCQSTLPB6TVIYHQPAB7ILSPLAKTDPQNKQB6VTKRFEVB7FKGKEYINAYEEN
IFDEVAE---AHB5LIQB5PTFITEYPAEVSPLARRNDVNPEITB6DRB6FEFFB7IGGREIGNGFSELN

```

```

CPQLQLQKFLQKQH14INELTGNKTETLSH15SPVIDYQYVETMH16YGMPPVGGFGLGIDRLCMLFC
DAEDQAERH14FQEQVNAKAAH15GDDE---AMFYDEH15EDYVB8TALEYH16GLPPTAGLGIGIDRMIMLB8FT

```

```

B8
DKKRIB8EEVLEB8FGCVDDVNRQ
NSHTIRDVILFPAMRPQK--

```

B

Рис. 1. А – вторичная структура *preMsk1p*, предсказанная *in silico*. Стрелкой указана граница N- и C-концевого доменов. MLS – сигнал митохондриальной локализации. Б – выравнивание аминокислотных последовательностей белка *preMsk1p S. cerevisiae* (верхняя строка) и ЛизРС (лизил-тРНК-синтетазы) *E. coli* (нижняя строка). H1–H16 – α -спирали, A1–A6, B1–B7, C1–C2 и D1–D2 – β -элементы. Прямоугольниками выделены участки, которые по вторичной структуре существенно отличаются у *preMsk1p* и *LysRS*; d1, d2 – аминокислотные последовательности, отсутствующие в ЛизРС *E. coli*, но присутствующие в *preMsk1p*.

Было высказано предположение, что именно эти участки необходимы для осуществления дополнительной функции *preMsk1p*, отсутствующей у ЛизРС *E. coli*, то есть импорта тРЛ1, и для определения специфичности этого процесса. Для проверки этой гипотезы было решено провести мутагенез описанных участков с целью изучения их влияния на импорт тРЛ1.

Мутагенез участков H1–H3 и H5–H6 и проверка влияния мутаций на импорт тРЛ1

Был проведен мутагенез, в результате которого были созданы генно-инженерные конструкции с мутантными версиями гена *MSK1* (кодирующего *preMsk1p*). Схема мутантных версий приведена на рис. 2.

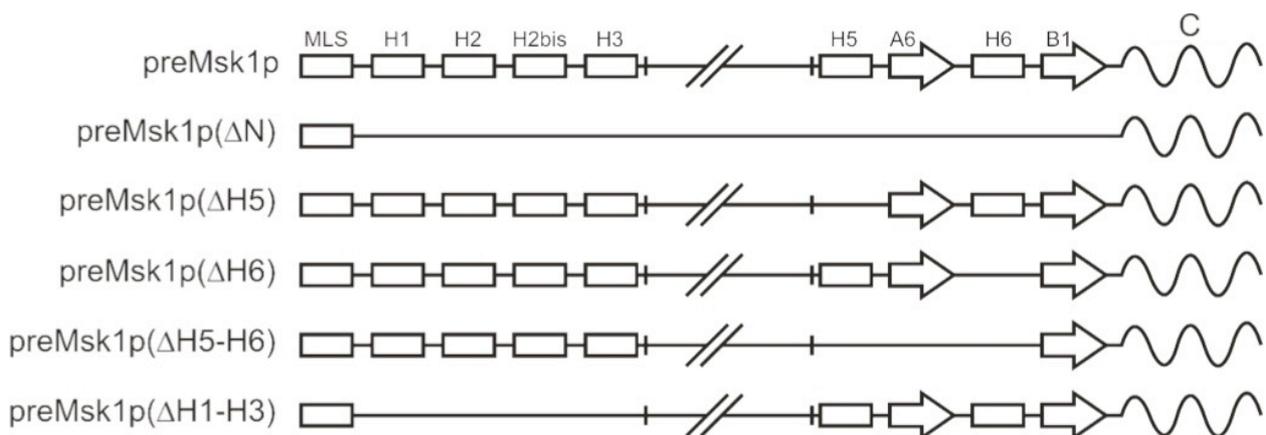


Рис. 2. Схематическое изображение мутантных версий *preMsk1p*, полученных в результате проведенного мутагенеза. MLS – сигнал митохондриальной локализации, C – C-концевой домен, в скобках указаны элементы, удаленные в белке. Все конструкции содержали 6 дополнительных остатков гистидина на C-конце (*His-tag*) для аффинной очистки белков

Эти мутантные версии были клонированы в векторы для гетерологичной экспрессии в *E. coli*. Белки были очищены методом аффинной хроматографии с использованием никель-содержащего сорбента (никель-агарозы), после чего были проведены эксперименты *in vitro* по связыванию тРЛ1 и по направлению импорта тРЛ1 в изолированные митохондрии. Оказалось, что только одна из мутантных версий (preMsk1p(ΔН1–Н3)) была способна образовывать детектируемый комплекс с тРЛ1, а также направлять ее импорт в митохондрии с эффективностью, близкой к таковой белка дикого типа (рис. 3).

Остальные мутантные версии не образовывали детектируемых комплексов с тРЛ1 и направляли ее импорт в митохондрии с эффективностью, значительно сниженной по сравнению с белком дикого типа. Таким образом, *in vitro* было показано, что делеции в участке Н1–Н3 не оказывают значительного влияния на эффективность импорта тРЛ1, в то время как любые крупные делеции в участке Н5–Н6 практически полностью блокируют импорт тРЛ1.

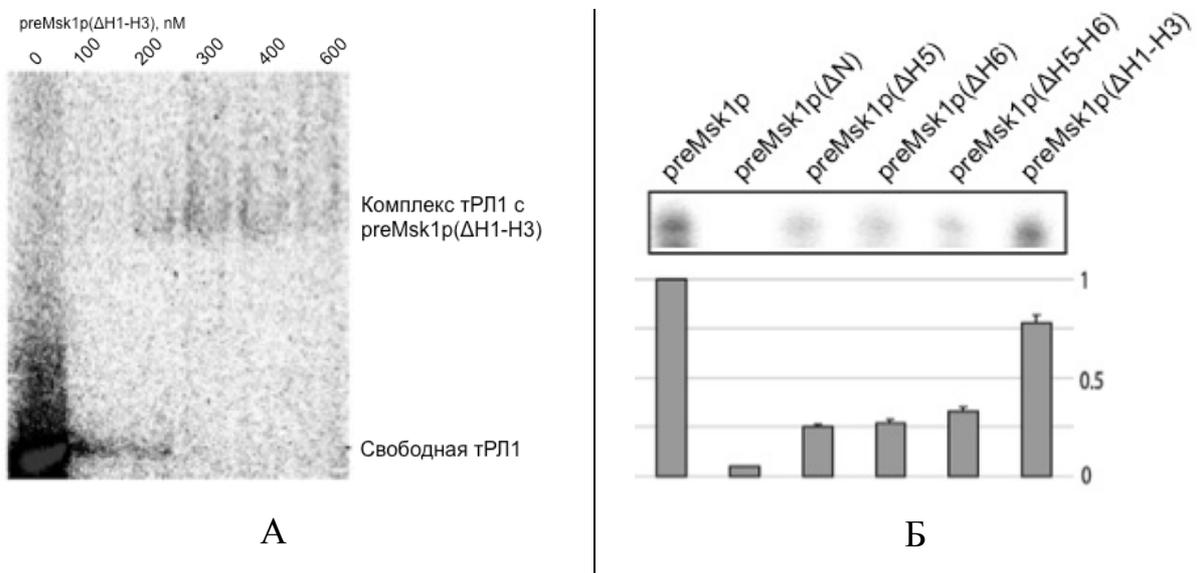


Рис. 3. А – результат эксперимента по задержке тРЛ1 в геле: автордиограмма разделения продуктов реакции комплексообразования тРЛ1 с preMsk1p(ΔН1–Н3) в нативном ПААГ. Б – автордиограмма разделения продуктов реакции импорта тРЛ1 в изолированные митохондрии дрожжей мутантными версиями preMsk1p. На нижней части рисунка представлен расчет эффективности направления импорта тРЛ1 в митохондрии разными мутантными версиями белка

Затем было проведено исследование влияния этих мутаций на импорт тРЛ1 в митохондрии *in vivo*. Для этого были созданы генно-инженерные конструкции на основе челночного вектора, в каждой из которых содержалась одна из мутантных версий гена *MSK1* (кодирующего preMsk1p). Были созданы штаммы дрожжей, в которых ген *MSK1* был заменен на одну из его мутантных версий, после чего была проверена способность этих штаммов расти на средах с несбраживаемыми источниками углерода (скорость роста дрожжей на таких средах прямо коррелирует с функциональностью их митохондрий). После выделения митохондрий из клеток этих штаммов дрожжей было проверено наличие в них тРЛ1. Результаты представлены на рис. 4.

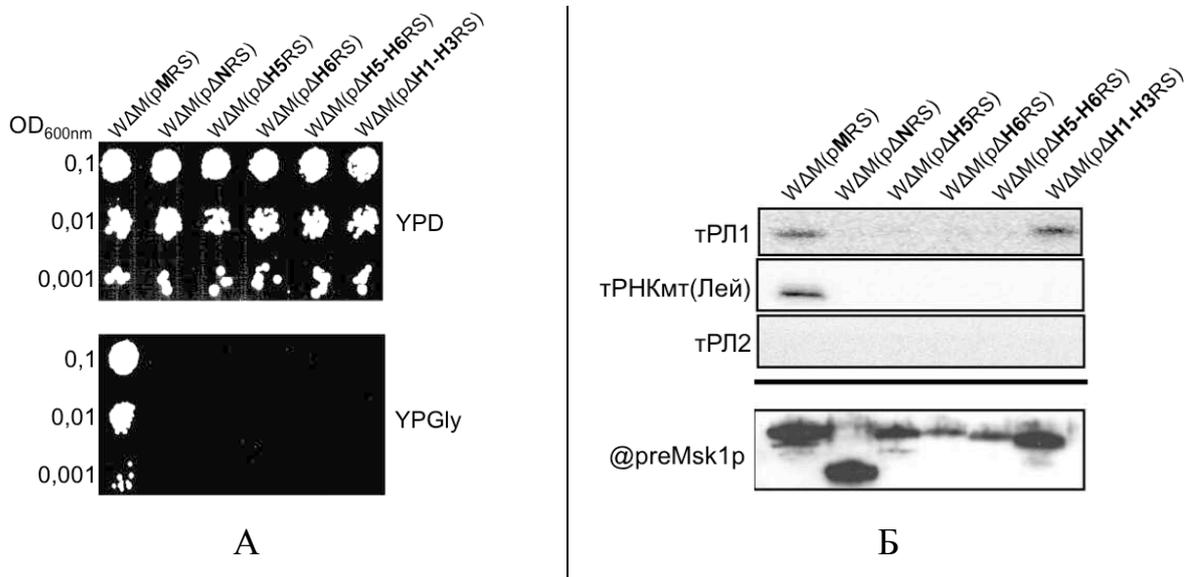


Рис. 4. А – результаты роста мутантных штаммов дрожжей на среде со сбраживаемым (YPD, глюкоза) и несбраживаемым (YPGly, глицерин) источниками углерода при 30 °С. OD_{600nm} – оптическая плотность взвеси клеток, нанесенной в каждом ряду. Б – результаты Норзерн-блот гибридизации малых РНК, выделенных из митохондрий мутантных штаммов дрожжей, с зондами к тРЛ1, митохондриальной лейциновой тРНК, неимпортируемой лизиновой тРНК (тРЛ2); нижняя панель – результаты Вестерн-блот анализа белков, выделенных из мутантных штаммов дрожжей, антитела к preMsk1p. В названии дорожек в скобках указано, какой мутантный вариант preMsk1p использован при создании этого штамма (pMRS – плаزمид с полноразмерным геном).

Оказалось, что любая мутация приводит к полной нефункциональности митохондрий: дрожжи не растут на среде с глицерином, в то время как их рост на среде с глюкозой не затронут (рис. 4А), в митохондриях отсутствуют

митохондриальные тРНК, наличие которых является одним из свидетельств функциональности органелл. тРЛ1 импортируется в митохондрии только в случае делеции участка Н1–Н3 (рис. 4Б), что подтверждает данные, полученные *in vitro*. При этом мутантные белки синтезируются, что подтверждается результатами Вестерн-блот-анализа (рис. 4Б).

Возможно, что мутации белка в участке Н5–Н6 приводят к нарушению из вторичной и третичной структуры, что, в свою очередь, вызывает нарушения их функционирования. Чтобы подтвердить отсутствие нарушений в структуре белков мы провели исследование кругового дихроизма мутантных версий белка.

Полноразмерный preMsk1p, а также три его мутантные версии preMsk1p(ΔН5), preMsk1p(ΔН6) и preMsk1p(ΔН5–Н6) были синтезированы в клетках *E. coli*, очищены на никель-агарозе, после чего был измерен их круговой дихроизм. В результате эксперимента был получен график, представленный на рис. 5.

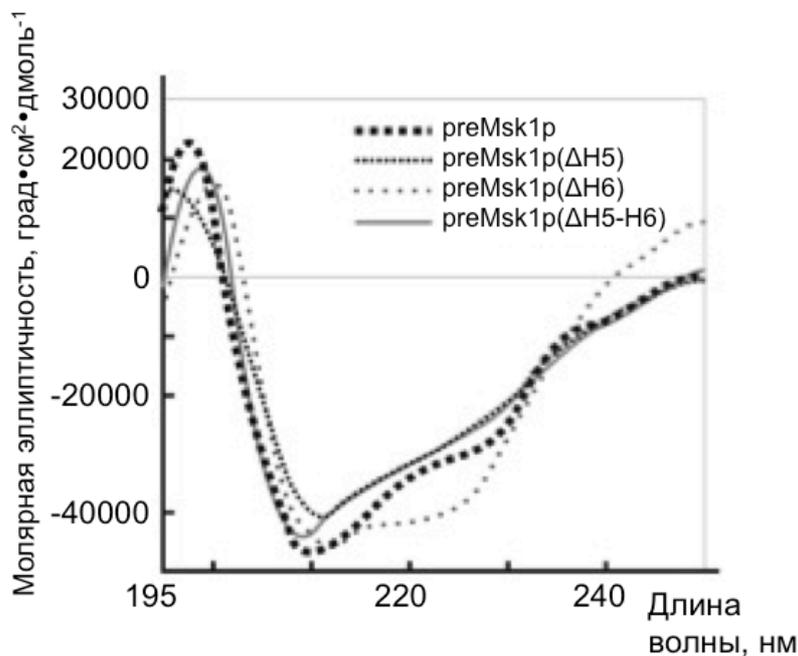


Рис. 5. Результат измерения кругового дихроизма preMsk1p и его мутантных версий (preMsk1p(ΔН5), preMsk1p(ΔН6) и preMsk1p(ΔН5–Н6))

Поскольку спектры кругового дихроизма мутантных версий белка практически не отличаются от спектра немутированного белка, можно заключить, что структура белков не нарушается в результате мутагенеза. Это позволяет заключить, что участок H5–H6 preMsk1p действительно критичен для импорта тРЛ1.

Было решено провести более мелкий мутагенез участка H5–H6. Для этого были созданы конструкции в составе дрожжевых векторов, в которых отсутствовали N- или C-концевые половины каждой из спиралей H5 или H6 или же отсутствовал элемент β -структуры A6. Схемы мутантных версий приведены на рис. 6.

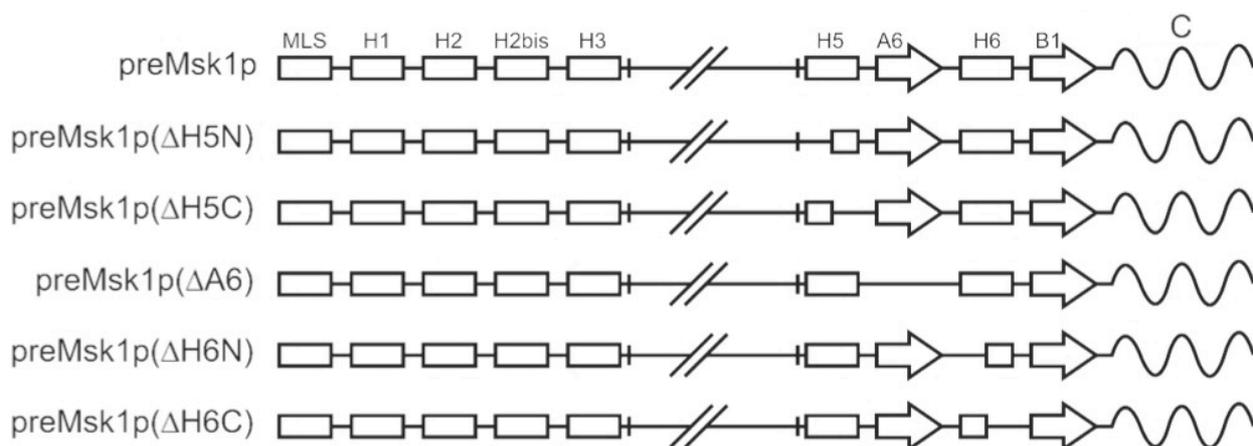


Рис. 6. Схематическое изображение мутантных версий preMsk1p, полученных в результате проведенного мутагенеза. MLS – сигнал митохондриальной локализации, C – C-концевой домен, в скобках указаны элементы, удаленные в белке.

Затем были созданы штаммы дрожжей, в каждом из которых ген *MSK1* был заменен на одну из его мутантных версий. Был оценен рост этих штаммов дрожжей на средах со сбраживаемым и несбраживаемым источником углерода. На рис. 7 представлены результаты роста дрожжей на среде YPGly (содержащей глицерин).

Скорость роста мутантных штаммов дрожжей не отличается от скорости роста дрожжей с полноразмерным геном *MSK1* ни для одной из протестированных конструкций ни при культивировании при 30 °C, ни при 37 °C. Это

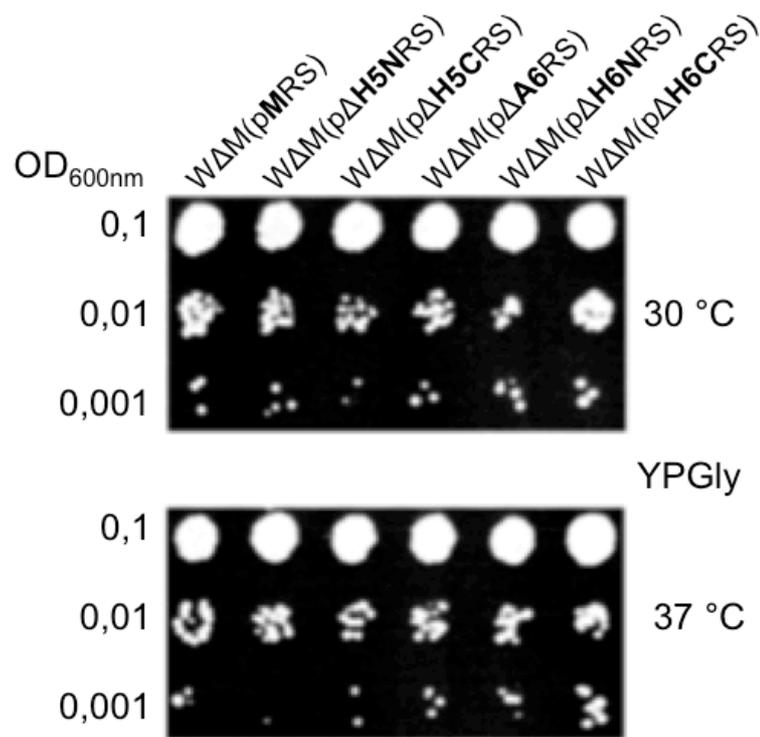


Рис. 7. Результаты роста мутантных штаммов дрожжей на среде с несбраживаемым (YPGly, глицерин) источником углерода при 30 °C и 37 °C. OD_{600nm} – оптическая плотность взвеси клеток, нанесенной в каждом ряду. В названии дорожек в скобках указано, какой мутантный вариант *preMsk1p* использован при создании этого штамма (pMRS – плазмида с полноразмерным геном).

свидетельствует о том, что описываемые делеции не влияют ни на способность *preMsk1p* аминоацилировать тРЛЗ в митохондриях (в противном случае дрожжи не росли бы при 30 °C), ни на способность *preMsk1p* направлять импорт тРЛ1 в митохондрии, иначе скорость роста дрожжей при 37 °C была бы ниже в случае мутантных штаммов по сравнению с дрожжами дикого типа. Такой вывод основан на том, что тРЛ1 необходима для нормальной митохондриальной функции дрожжей при повышенных температурах).

Таким образом, внесенные мутации не влияют на функциональность *preMsk1p*. Это позволяет нам предположить, что для эффективного направления импорта тРЛ1 в митохондрии важно не столько сохранение аминокислотной последовательности участка H5–H6, сколько вторичная структура этого региона в виде двух α -спиралей.

Исследование влияния участков d1 и d2 на импорт тРЛ1 в митохондрии

В составе N-концевого домена preMsk1p были найдены два аминокислотных участка, отсутствующие в ЛизРС *E. coli* (d1 и d2 на рис. 1Б). Мы решили провести мутагенез белка и удалить эти участки (каждый по отдельности или оба одновременно) в контексте полноразмерного белка.

Затем были созданы штаммы дрожжей с заменой гена *MSK1* на одну из его мутантных версий: preMsk1p(Δ d1), preMsk1p(Δ d2) или preMsk1p(Δ d1d2). После этого из митохондрий, изолированных из мутантных штаммов, были выделены малые РНК, которые затем были проанализированы методом Норзерн-блот-гибридизации. Результаты представлены на рис. 8.

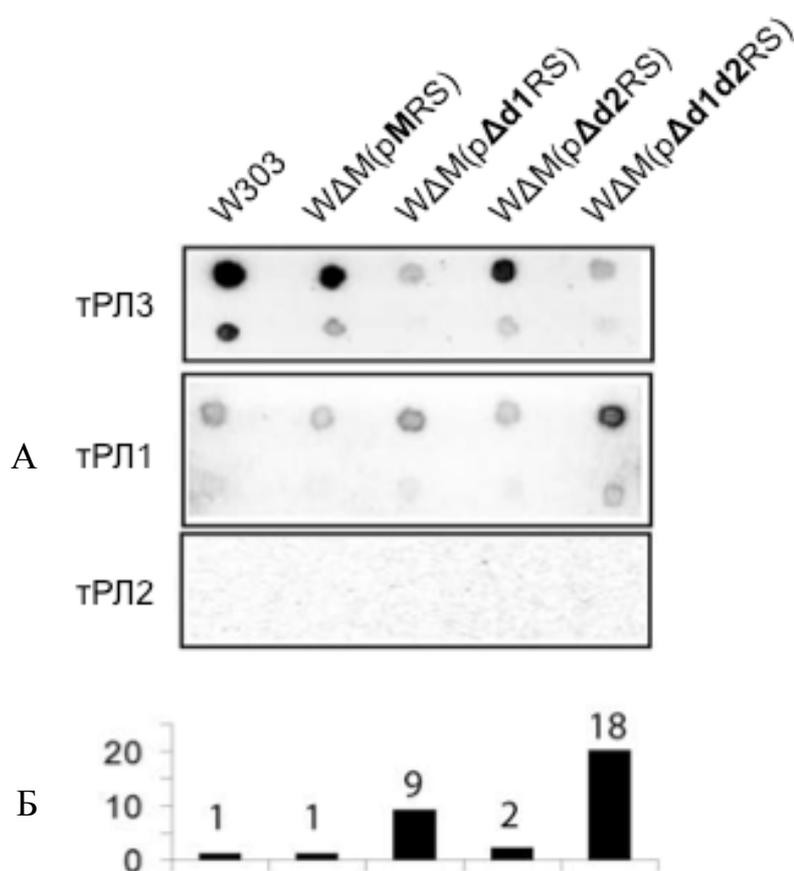


Рис. 8. А – результат Норзерн-блот-гибридизации малых РНК, выделенных из митохондрий мутантных штаммов дрожжей, с зондами к тРЛ1, митохондриальной лизиновой тРНК (тРЛ3) и цитоплазматической неимпортируемой лизиновой тРНК (тРЛ2). Б – расчет эффективности импорта тРЛ1 в митохондрии мутантных штаммов, нормированной относительно количества митохондриальной тРНК (за единицу принята эффективность импорта в митохондрии дрожжей дикого типа)

Оказалось, что удаление этих участков приводит не к снижению эффективности импорта тРЛ1 в митохондрии, а, напротив, к ее увеличению. При удалении элемента d1 эффективность возрастает в 9 раз, при удалении элемента d2 – в 2 раза, а при удалении двух элементов одновременно – в 18 раз. Мы решили проверить, будет ли такое значительное увеличение количества импортируемой в митохондрии тРЛ1 иметь фенотипическое проявление. Для этого мы провели дыхательные тесты для оценки скорости роста мутантных штаммов дрожжей и штамма дикого типа на средах со сбраживаемым и несбраживаемым источником углерода. Результаты представлены на рис. 9.

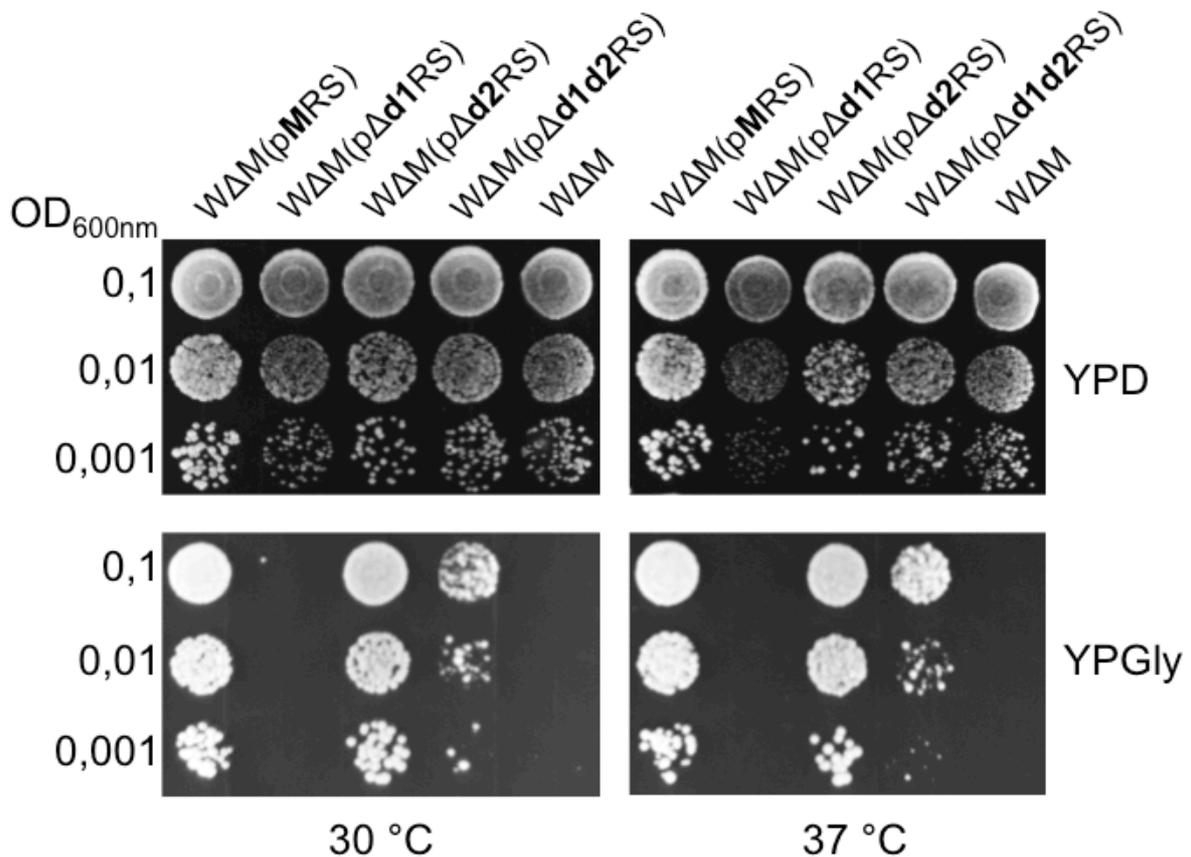


Рис. 9. Результаты роста мутантных штаммов дрожжей на среде со сбраживаемым (YPD, глюкоза) и несбраживаемым (YPGly, глицерин) источником углерода при 30 °C и 37 °C. OD_{600nm} – оптическая плотность взвеси клеток, нанесенной в каждом ряду. В названии дорожек в скобках указано, какой мутантный вариант *preMsk1p* использован при создании этого штамма (*pMRS* – плаزمид с полноразмерным геном)

Оказалось, что делеция элемента d2 (и, как следствие, увеличение импорта тРЛ1 в 2 раза) не имеет никаких фенотипических проявлений. Однако, су-

дя по результатам дыхательного теста, делеция элемента d1 приводит к полной потере митохондриями их функциональности, а при делеции элементов d1 и d2 клетки дрожжей практически полностью теряют способности расти на среде с несбраживаемым источником углерода. Это позволяет нам заключить, что дополнительный импорт тРЛ1 приводит к значительным нарушениями митохондриальной функции. Это может быть связано с тем, что тРЛ1 вступает в конкуренцию с митохондриальными тРНК за связывание факторов трансляции. В связи с этим наличие элементов d1 и d2 в составе preMsk1p становится необходимым для ограничения количества тРЛ1, поступающей в митохондрии. Мы предполагаем, что эти элементы могут играть важную роль в организации N-концевого домена. Полученный нами результат особенно интересен тем, что дает возможность влиять на эффективность импорта тРЛ1 путем тонких изменений белка-переносчика.

Поиск участков preMsk1p, определяющих специфичность импорта *in vivo*

Ранее в нашей лаборатории *in vitro* было проведено исследование, показавшее, что N-концевой домен обладает такой же специфичностью импорта, как и полноразмерный белок preMsk1p. Также было показано, что удаление нескольких элементов вторичной структуры с С-конца N-концевого домена, а именно, уже упоминавшихся выше элементов H5, A6 и H6, приводит к потере специфичности импорта: в изолированные митохондрии начинали импортироваться в норме не импортируемые РНК (например, вторая цитоплазматическая лизиновая тРНК, тРЛ2). Мы решили определить, какой участок белка будет отвечать за специфичность импорта тРЛ1 *in vivo*.

Для этого мы создали генно-инженерные конструкции на основе дрожжевых векторов, которые содержали укороченные версии гена *MSK1*: белки, закодированные этими версиями гена, заканчивались на элементах вторичной структуры A5, H4, A3 и H3 (рис. 10).

Затем были созданы штаммы дрожжей с заменой гена *MSK1* на одну из его укороченных версий. Мы изолировали промитохондрии из мутантных штаммов и методом Норзерн-блот-анализа определил малые РНК, находящиеся в промитохондриях. Оказалось, что как минимум одна цитоплазматическая тРНК (аланиновая) импортируется в митохондрии данных штаммов дрожжей (рис. 11А).

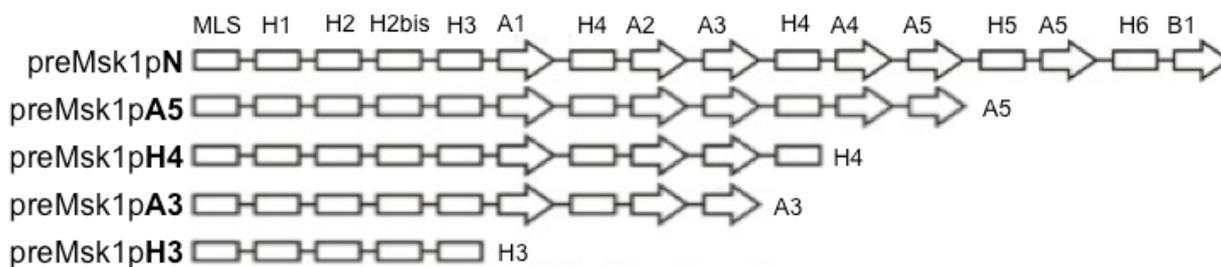


Рис. 10. Схематическое изображение укороченных фрагментов *preMsk1p*. Конструкции названы по названию последних элементов вторичной структуры в составе мутантных версий (*N* – полноразмерный *N*-концевой домен)

Мы решили проверить, влияет ли импорт дополнительной тРНК на митохондриальную функцию дрожжей. Для этого мы провели дыхательный тест на среде с несбраживаемым источником углерода, результаты которого показали, что дополнительная цитоплазматическая тРНК не влияет на дыхательную способность клеток мутантных штаммов дрожжей (рис. 11Б). Для того, чтобы неспецифический импорт тРНК в митохондрии имел фенотипическое проявление, необходимо, во-первых, чтобы импортировались лейциновые или изолейциновые тРНК (то есть те тРНК, по кодонам которых митохондриальный генетический код у дрожжей отличается от цитоплазматического), во-вторых, чтобы они импортировались в аминокислотной форме, в-третьих, необходимо, чтобы включение «неправильной» аминокислоты (изолейцина вместо метионина или лейцина вместо треонина) нарушало функционирование белка, и, в-четвертых, чтобы неспецифически импортировалось достаточно большое количество молекул тРНК для их конкурентоспособности с митохондриальными тРНК. Вероятность выполнения всех этих усло-

вий, с учетом того, что в митохондриях синтезируется всего 9 белков, весьма невелика. Видимо, именно это и объясняет отсутствие фенотипического проявления импорта дополнительных тРНК.

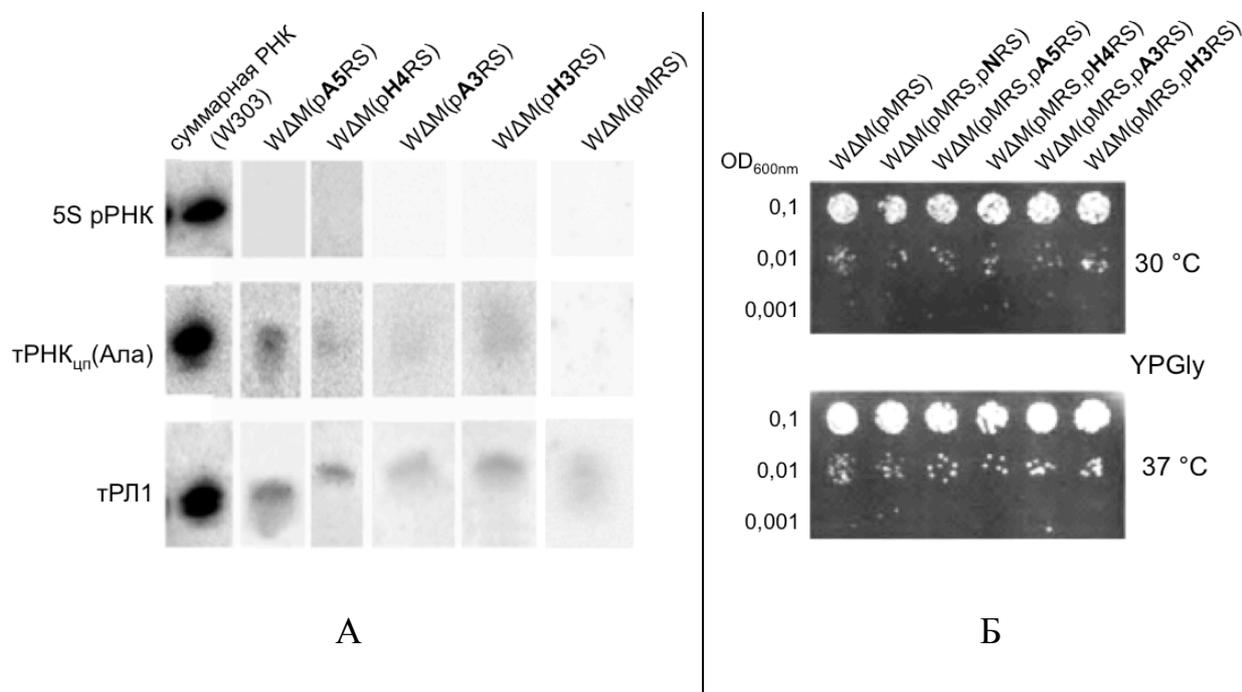


Рис. 11. А – результаты Норзерн-блот-анализа малых РНК, выделенных из митохондрий мутантных штаммов дрожжей с зондами к 5S рРНК, аланиновой цитоплазматической тРНК и тРЛ1; Б – результаты роста мутантных штаммов дрожжей на среде с несбраживаемым источником углерода (глицерином) при 30 °C и 37 °C. OD_{600nm} – оптическая плотность взвеси клеток, нанесенной в каждом ряду

Также мы создали штаммы дрожжей, в которых отсутствовал ген *MSK1* в геноме, однако в них присутствовал ген гомологичного preMsk1p белка *Ashbya gossypii* (плазмида, содержащая этот белок, будет называться pAshRS), который способен аминокислотировать тРЛ3 в митохондриях, то есть выполнять основную функцию preMsk1p, однако неспособен импортировать тРЛ1. Кроме того, в созданных штаммах также присутствовала одна из мутантных версий гена *MSK1*. Для этих штаммов методом оксиметрии была измерена скорость поглощения ими кислорода. Результаты измерения представлены на рис. 12.

В данном эксперименте косвенно оценивается эффективность импорта тРЛ1 мутантными версиями гена *MSK1*. Поскольку даже при 30 °C видна разница в скорости поглощения кислорода штаммом, в котором есть только

белок *A. gossypii* и штаммом, где также экспрессируется N-концевой домен preMsk1p (который направляет импорт тРЛ1 в митохондрии), видимо, тРЛ1 и при 30 °С способствует повышению уровня митохондриальной трансляции.

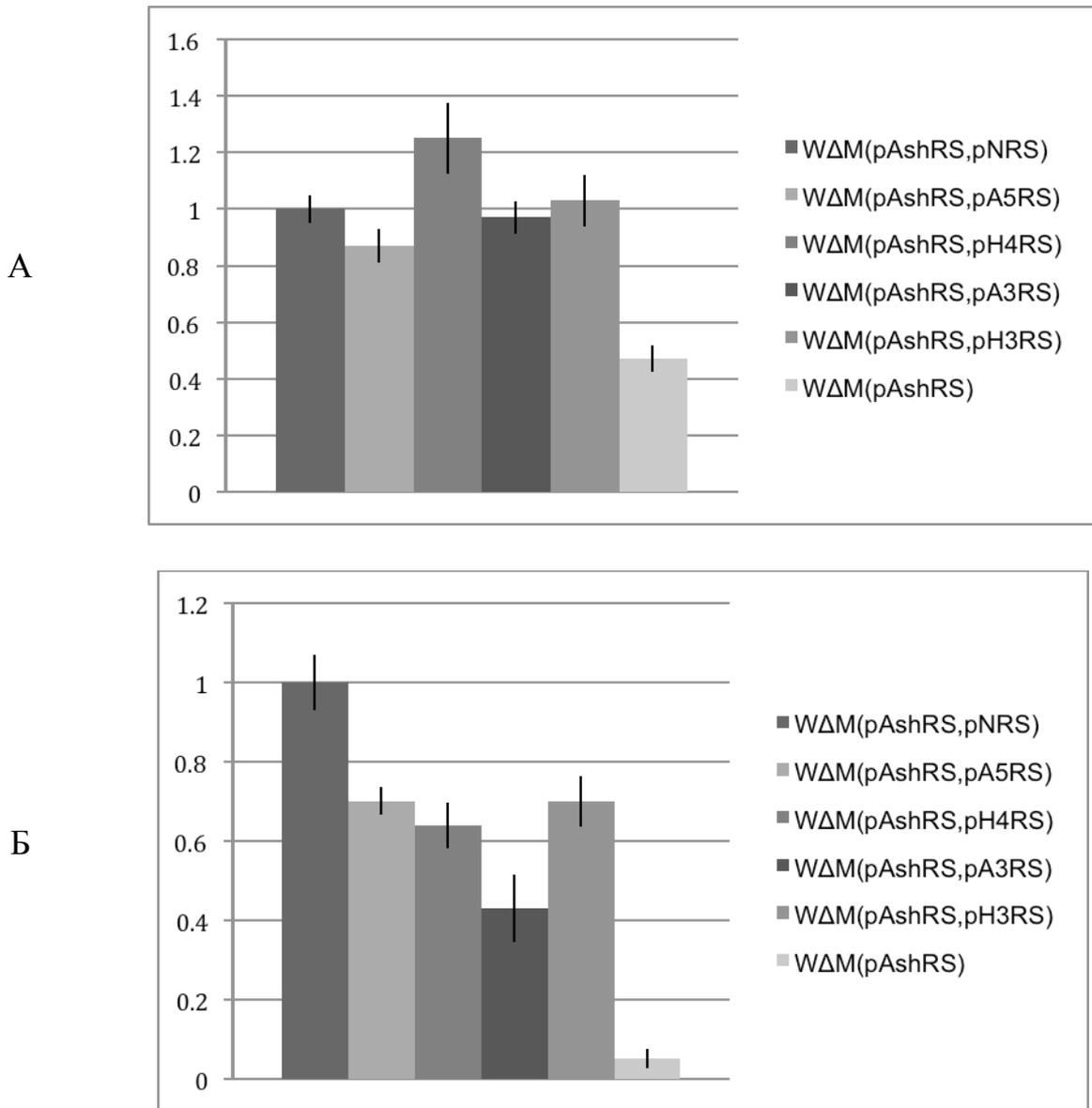


Рис. 12. Относительная скорость поглощения кислорода мутантными штаммами дрожжей при 30 °С (А) и 37 °С (Б)

Этот результат подтверждается также данными дыхательных тестов (дрожжи с заменой гена *MSK1* на гомологичный ген *A. gossypii* и при 30 °С растут медленнее на средах с глицерином, чем дрожжи дикого типа (рис. 13)). Результаты данного эксперимента косвенно подтверждают, что мутантные укороченные версии гена *MSK1* действительно направляют импорт тРЛ1 в митохондрии. Однако эффективность этого процесса в случае мутантных версий

гена ниже, чем в случае полноразмерного N-концевого домена белка, поскольку скорость поглощения кислорода при 37 °С оказалась на 30–60 процентов ниже, чем скорость поглощения кислорода контрольным штаммом (с pAshRS и pNRS).

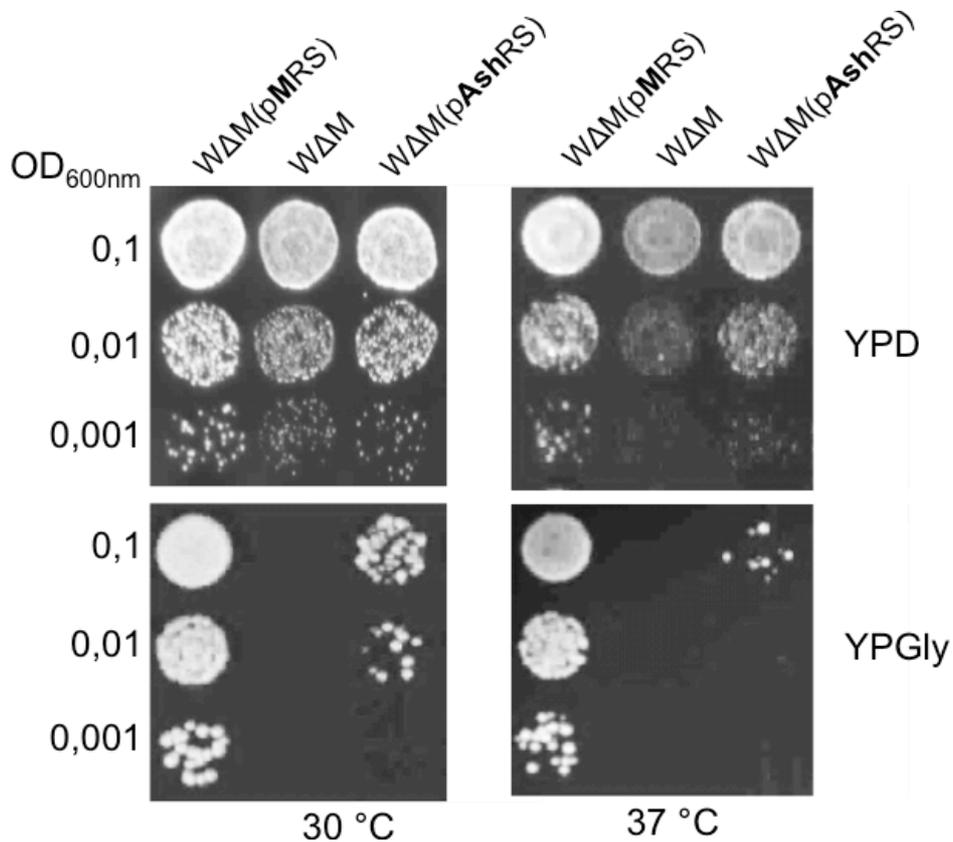


Рис. 13. Результаты роста дрожжей штамма WΔM(pMRS) – штамм с делецией гена MSK1 в геноме и с плазмидой с геном MSK1 (фенотипически этот штамм эквивалентен штамму дикого типа), штамма WΔM – с делецией гена MSK1, WΔM(pAshRS) – с заменой гена MSK1 на ортологичный ген *A. gossypii*, OD_{600nm} – оптическая плотность взвеси клеток, нанесенной в каждом ряду. YPD – среда, содержащая глюкозу в качестве источника углерода, YPGly – среда, содержащая глицерин в качестве источника углерода

Таким образом, оказалось, что исследованные укороченные версии preMsk1p способны направлять импорт тРЛ1 в митохондрии, а также направляют импорт как минимум одной дополнительной цитоплазматической тРНК (аланиновой). Судя по всему, участок белка, определяющий специфичность импорта, находится в пределах элементов вторичной структуры, отличающих самую длинную из исследованных версий (A5) от полноразмерного N-

концевого домена. Эти элементы вторичной структуры включают в себя исследованные ранее α -спирали H5 и H6, а также β -элемент A6.

Таким образом, участок H5–H6 отвечает не только за направление импорта тРЛ1 в митохондрии (в контексте полноразмерного белка), но и за специфичность этого процесса. С другой стороны, ранее в нашей лаборатории было показано, что нуклеотид в 34-м положении тРНК, то есть первый нуклеотид антикодона, играет очень важную роль в качестве детерминанты импорта: если в составе тРЛ2 (неимпортируемой цитоплазматической лизиновой тРНК) заменить урацил в 34-м положении на цитозин, то есть на нуклеотид тРЛ1, то такая тРНК будет импортироваться в митохондрии. Можно предположить, что участок H5–H6, отвечающий за импорт тРЛ1, связывается с антикодоном, то есть последовательностью тРНК, со своей стороны отвечающей за специфичность импорта. При таком допущении структура комплекса должна отличаться от классической структуры комплекса тРНК с соответствующей аминокислотой-тРНК-синтетазой, в котором шарнирный участок белка расположен вблизи варибельной петли тРНК. Это согласуется с полученными ранее в нашей лаборатории данными по футпринтингу, которые показали отличия в организации комплексов.

Разработка методики экспрессии preMsk1p

Гетерологическая экспрессия генов предшественников митохондриальных белков представляет определенные трудности, поскольку наличие сигнала митохондриальной локализации в их составе приводит к накоплению белка в тельцах включения.

Нами была найдена и оптимизирована методика, которая позволила экспрессировать preMsk1p в растворимой форме. Суть метода заключается в экспрессии белка в условиях высокой тоничности среды (0,5 М NaCl) при низких температурах (20 °С) и при низких концентрациях индуцирующего агента (0,1–0,4 мМ IPTG). При таких условиях в клетках *E. coli* синтезируются белки-шапероны. Низкая температура культивирования и низкая кон-

центрация индуцирующего агента приводит к медленному синтезу белка, что при наличии шаперонов способствует более корректному его сворачиванию и, следовательно, переходу белка в растворимую форму. Полученный белок оказался активным в стандартных тестах на определение активности preMsk1p: экспериментах по связыванию тРЛ1 и экспериментах по направлению импорта тРЛ1 в изолированные митохондрии.

Этот результат вплотную позволил нам приблизиться к проведению экспериментов по кристаллизации комплекса preMsk1p и тРЛ1.

ВЫВОДЫ

1. *In vitro* и *in vivo* картирован участок предшественника митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы дрожжей, отвечающий за обеспечение доставки импортируемой лизиновой тРНК в митохондрии: этот участок включает в себя аминокислоты 208–243 (α -спирали H5 и H6, а также β -элемент A6).
2. Установлено, что вторичная структура участка предшественника митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы дрожжей (аминокислоты 208–243) в контексте полноразмерного белка критична для доставки импортируемой лизиновой тРНК в митохондрии *in vivo*
3. Укороченные версии N-концевого домена предшественника митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (аминокислоты 1–199, 1–164, 1–146 и 1–98) способны направлять неспецифический импорт тРНК в митохондрии дрожжей
4. Присутствие в митохондриях в норме не импортируемой цитоплазматической аланиновой тРНК не нарушает митохондриальную функцию клеток дрожжей
5. Делеция аминокислот 148–151 предшественника митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы дрожжей приводят к двухкратному увеличению количества импортируемой цитоплазматической лизиновой тРНК в митохондриях по сравнению с нормальными значениями. Это не отражается на дыхательной функции клеток дрожжей. В то же время, делеция аминокислот 128–133 и одновременная делеция аминокислот 128–133 и 148–151 приводят к увеличению количества импортируемой цитоплазматической лизиновой тРНК в митохондриях в 9 и в 18 раз, соответственно, по сравнению с нормальными значениями. Это ассоциировано с существенным нарушением дыхательной функции клеток дрожжей.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kamenski P., Smirnova E., Kolesnikova O., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I. tRNA mitochondrial import in yeast: Mapping of the import determinants in the carrier protein, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase// *Mitochondrion*. 2010. V. 10(3). P. 284-293.
2. Смирнова Е.В., Лакунина В.А., Тарасов И., Крашенинников И.А., Каменский П.А. Неканонические функции аминоксил-тРНК-синтетаз// *Биохимия (Москва)*. 2012. Т. 77. № 1. С. 21-33.
3. Kamenski P., Smirnova E., Entelis N., Martin R.P., Krasheninnikov I., Tarassov I. Mutations in MSK1 gene: a possibility to alter the selectivity of tRNA import into yeast mitochondria// *ARCUS Congress*. Strasbourg. France. 2008. P. 50.
4. Смирнова Е., Каменский П. Поиск участков белка preMsk1p, необходимых для направления специфического импорта тРНК в митохондрии дрожжей// *Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009»*. Секция «Биология». Москва. Россия. 2009. С. 192.
5. Smirnova E., Kamenski P., Entelis N., Kolesnikova O., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. N-domain of mitochondrial lysyl-tRNA-synthetase precursor determines the selectivity of tRNA import into yeast mitochondria// *23rd tRNA Workshop*. Aveiro. Portugal. 2010. P. 94
6. Kamenski P., Smirnova E., Entelis N., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. Precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase is a key player of yeast mitochondrial tRNA import game// *16th RNA Workshop*. Kyoto. Japan. 2011. P. 475.