

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В МИТОХОНДРИЯХ

Обзор

© 2013 г. А.В. Кузьменко^{1,2}, С.А. Левицкий¹,
Е.Н. Виноградова¹, Д. Аткинсон², В. Гаврилюк²,
Н. Зенкин³, П.А. Каменский^{1*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-4309,
электронная почта: mail@mail.bio.msu.ru, peter@protein.bio.msu.ru

² Institute of Technology, University of Tartu, Nooruse St. 1,
50411 Tartu, Estonia, fax: +3(72)737-4900,
E-mail: info@tuit.ut.ee

³ Centre for Bacterial Cell Biology, Institute for Cell
and Molecular Biosciences, Newcastle University,
Newcastle upon Tyne, NE2 4AX, United Kingdom,
fax: +44(191)208-3205, E-mail: n.zenkin@ncl.ac.uk

Поступила в редакцию 21.12.12
После доработки 23.03.13

Процесс трансляции, т.е. биосинтез белка в строгом соответствии с закодированной в геноме информацией, является одним из самых важных процессов в живой клетке. Уже много лет трансляция остается объектом самых разнообразных исследований во многих лабораториях по всему миру. За это время достигнут значительный прогресс в понимании механизмов биосинтеза белка в цитоплазме бактериальных и эукариотических клеток. Гораздо меньше известно о процессе трансляции в митохондриях эукариот, который обладает рядом чрезвычайно интересных особенностей, отличающих его от цитоплазматических систем. В обзоре обобщены известные в настоящее время данные, касающиеся биосинтеза белка в митохондриях различных организмов; особое внимание обращено на отличия от цитоплазматических процессов трансляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, трансляция, рибосомы, факторы трансляции.

Клетки всех эукариот, за исключением ряда паразитических организмов, содержат митохондрии. Эти органеллы обеспечивают клетки энергией в процессе окислительного фосфорилирования, участвуют в синтезе жирных кислот, гема и железосерных кластеров, а также в запрограммированной клеточной смерти. Согласно общепринятой концепции эндосимбиоза, митохондрии произошли на ранних этапах эволюции от α -протеобактерии, близкой к современной *Rickettsia prowazekii* [1]. Постепенно в ходе постоянного взаимодействия с ядерным геномом многие гены предшественников современных митохондрий были перенесены в ядро, однако небольшая их часть осталась в составе ДНК органеллы. Трансляция митохондриальных мат-

ричных РНК (мРНК) осуществляется собственным аппаратом биосинтеза белка и требует тонкой координации работы двух геномов.

В настоящее время многие аспекты процесса митохондриальной трансляции остаются малоизученными. Во многом это связано с тем, что систему митохондриальной трансляции, способную к синтезу на природных матрицах, до сих пор не удалось реконструировать *in vitro* ни в одной лаборатории мира. С другой стороны, на основе ранних работ по изучению характеристик седиментации митохондриальных рибосом и их РНК-компонентов вместе с данными по чувствительности к антибиотикам было сделано предположение о сходстве процесса трансляции в митохондриях с таковым у бактерий [2–4]. После этого в научном сообществе сформировалась точка зрения, согласно которой дальнейшие эксперименты в данном направлении могли бы только подтвердить уже известные науке факты. Однако, как стало очевидно при более детальном рассмотрении, процесс трансляции в

Принятые сокращения: МРС – малая рибосомная субъединица; БРС – большая рибосомная субъединица; п.о. – пар оснований; т.п.о. – тысяч пар оснований; а.о. – аминокислотные остатки; нт – нуклеотид.

* Адресат для корреспонденции.

митохондриях имеет ряд отличительных особенностей, не характерных ни для аналогичной системы в цитоплазме эукариотических клеток, ни для клеток бактерий и архей [5, 6].

За последнее десятилетие благодаря ряду выдающихся структурных исследований исследователям удалось приблизиться к пониманию молекулярных основ феномена трансляции. В основном, это относится к рибосомам бактерий и цитоплазмы эукариот, для которых теперь доступны структурные данные, полученные методами криоэлектронной микроскопии и рентгено-дифракционного анализа [7]. Однако немало успеха удалось достичь и на пути изучения структурно-функциональных свойств рибосом митохондрий. Ниже мы проводим анализ важнейших результатов, полученных исследователями процесса биосинтеза белка в митохондриях.

ОБЩИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА В МИТОХОНДРИЯХ

Геном митохондрий, несмотря на универсальность выполняемой им генетической функции, демонстрирует довольно высокую степень вариации по форме, размеру и фактическому генному содержанию [8]. Например, самая короткая описанная на сегодняшний день линейная молекула митохондриальной ДНК (мтДНК) *Plasmodium falciparum* (5966 п.о.) кодирует, помимо большой и малой рибосомальных РНК (рРНК), только три белка [9]. В человеческой кольцевой мтДНК (16 569 п.о.) содержится 22 гена транспортных РНК (тРНК), 13 генов, кодирующих белки, а также гены 12S и 16S рРНК; в то же время, превышающий его по размеру в 22 раза митохондриальный геном *Arabidopsis thaliana* (366 924 п.о.) содержит информацию о всего лишь 32 белковых макромолекулах и неполном наборе тРНК [10, 11]. Такая диспропорция объясняется необычайно большим количеством (>80%) некодирующих последовательностей в мтДНК *A. thaliana* по сравнению с простейшими (<10%) и млекопитающими, у которых гены следуют непосредственно друг за другом или разделены всего несколькими нуклеотидами [12]. Темп эволюции митохондриальных геномов крайне высок, что частично объясняется повышенной частотой возникновения мутаций в связи с недостаточно эффективной системой репарации и близостью к образующимся у внутренней мембраны реактивным формам кислорода [13].

Важной особенностью трансляции в митохондриях является отклонение от стандартного

генетического кода. Например, у позвоночных животных один из трех стоп-кодонов — УГА — кодирует триптофан, а АУА — метионин вместо изолейцина. В митохондриях довольно часто используются альтернативные триплеты в качестве стартового кодона: АУА (*Homo, Bos*), АУУ (*Homo, Mus*), АУЦ (*Mus*) и ГУГ (*Coturnix, Gallus*). Что касается стоп-кодонов, то их количество в митохондриальных системах сокращено: в самом общем случае до двух, однако у паразитической нематоды *Radopholis similis* 7 из 12 открытых рамок считывания вообще лишены канонических стоп-кодонов [14]. Для дрожжей также характерна смена значения кодонов, начинающихся с ЦУ, с лейциновых на треониновые [15].

Транскрипция в митохондриях практически всех эукариот происходит при участии фермента из семейства Т3/Т7 фаговых РНК-полимераз, инициирующих синтез на коротких промоторных областях [16]. Продуктом такого синтеза в общем случае является полицистронный первичный транскрипт [16–18]. Дальнейший процессинг, согласно модели «тРНК-пунктуации», происходит посредством эндонуклеолитического выщепления последовательностей тРНК, разделяющих кодирующие белки рамки считывания [19]. Так, в человеческих митохондриях существует 11 мРНК (мРНК_{мт}): 9 моноцистронных и 2 бицистронных с перекрывающимися рамками считывания, а у *S. cerevisiae* каждый из 8 полипептидов считывается с отдельной мРНК, за исключением субъединиц **a** и **8** АТФ-синтетазы F₀F₁ типа, формирующих бицистронный транскрипт и находящихся под контролем общего промотора [20]. Все митохондриальные мРНК лишены кэп-структуры, но довольно сильно отличаются друг от друга по другим характеристикам у разных групп организмов. Так, в человеческих митохондриальных мРНК отсутствуют длинные 5'- и 3'-нетранслируемые области (НТО), но при этом они полиаденилированы [20]. С другой стороны, у *Saccharomyces cerevisiae* зрелые транскрипты обладают длинными НТР с обоих концов, предположительно содержащими важные в регуляторном плане элементы вторичной структуры, и вообще лишены поли(А)-трактов [21–23]. Судя по всему, это отражает принципиальную разницу в механизмах распознавания стартового кодона и сборки инициаторного комплекса в митохондриях дрожжей и млекопитающих. У митохондриальных мРНК, в отличие от бактериальных, отсутствует последовательность Шайна–Дальгарно, и, соответственно, комплементарный ей сегмент рРНК малой субъединицы. У дрожжей была обнаружена октануклеотидная последовательность УАУ-

АААУА, предположительно играющая роль общего сайта узнавания рибосом, однако пока данное предположение не подтверждено экспериментально [24]. Процесс деградации матричных РНК находится под контролем субъединичного белкового комплекса – деградосомы, обладающего РНК-хеликазной и гидролитической или фосфоролитической экзонуклеазными активностями [25]. Примечательно, что в митохондриях дрожжей не обнаружено полинуклеотидфосфорилазы, в то время как у млекопитающих этот фермент был найден в межмембранном пространстве, где, помимо выполнения своей основной функции, он участвует в регуляции импорта некоторых видов РНК из цитоплазмы [26].

Что касается тРНК, то их количество обычно сильно уменьшено по сравнению с цитозольными системами (22 и 24 в случае человека и дрожжей соответственно), и индивидуальные молекулы распознают по нескольким кодонам каждая. При этом митохондриальные тРНК обычно короче (59–75 нуклеотидов у животных) бактериальных и эукариотических цитозольных [27]. Помимо этого, они часто лишены консервативных элементов третичной структуры: например, в них не детектировано ни дальних взаимодействий между дигидроуридиловой и тимидилпсевдоуридиловой ветвями, ни некоторых центров связывания катионов магния; последнее обуславливает их низкую термостабильность [28, 29]. Несмотря на отсутствие прямых структурных данных, эксперименты по химической модификации, защите от действия нуклеаз и данные ЯМР-спектроскопии Т7-транскриптов

митохондриальных тРНК быка и нематод свидетельствуют в пользу близкой к канонической L-формы молекулы [5]. Данное предположение подтверждают результаты криоэлектронной микроскопии митохондриальных рибосом *Bos taurus*: прочно связанная в пептидил-трансферном центре тРНК обладает типичной L-конформацией с впадиной в районе «локтя» [30]. Необходимо отметить, что несмотря на наличие полного набора тРНК в составе генома митохондрий *S. cerevisiae*, в органеллу частично импортируется и принимает участие в трансляции одна из двух изоакцепторных цитоплазматических лизиновых тРНК с антикодоном ЦУУ [31]. В отличие от животных и дрожжей, в митохондриях высших растений и трипаносоматид большинство или даже все типы тРНК импортируются из цитоплазмы [32, 33].

Митохондрии различных организмов содержат особый тип рибосом (далее – миторибосомы), отличный от бактериальных 70S и эукариотических 80S частиц. Так, у почкующихся дрожжей миторибосомы имеют коэффициент седиментации 74S, у млекопитающих – 55S, а у простейших *Leishmania tarentolae* – всего 50S [34–36]. На данный момент доступны лишь структуры миторибосом *B. taurus* и *L. tarentolae*, разрешенные при помощи криоэлектронной микроскопии с точностью 9–14 Å [30, 35]. Как и в общем случае, в составе миторибосом выделяют большую и малую субъединицы, состоящие из рибосомальных РНК (рРНК) и белков (таблица). Самое значимое отличие миторибосом от их цитоплазматических аналогов – это колос-

Ключевые характеристики митохондриальных и бактериальных рибосом

	Бактерии	Митохондрии быка	Митохондрии лейшманий
Молекулярная масса, МДа	2,3	2,7	2,2
Диаметр, А	≈260	≈320	≈245
Молярное соотношение РНК : белок	≈2 : 1	≈1 : 2	≈1 : 3
рРНК малой субъединицы и ее длина	16S (1542 п.о.)	12S (950 п.о.)	9S (610 п.о.)
Количество белков в составе малой субъединицы	21	≈29	≈56
рРНК большой субъединицы и их длины	23S рРНК (2904 основания) 5SpРНК (120 оснований)	16SpРНК (1560 оснований)	12S рРНК (1173 основания)
Количество белков в составе большой субъединицы	34	≈50	≈77

сальная разница в массовом соотношении рНК : белок, которое у бактерий составляет 2 : 1, а в митохондриях животных и протист – 1 : 2 и 1 : 3 соответственно. При этом миторибосомы млекопитающих (массой 2,71 МДа и диаметром ~320 Å) больше, а у представителей простейших (2,2 МДа и ~245 Å) – меньше по размеру, чем рибосомы *E. coli* [30, 35]. Низкие значения коэффициентов седиментации миторибосом обусловлены их пористой структурой, которая в свою очередь является следствием отсутствия или сильной редукции некоторых сегментов ррНК [37]. Например, в 12S ррНК малой субъединицы миторибосом млекопитающих полностью отсутствует последовательность «анти-Шайн–Дальгарно», а также спирали 6, 8–10, 12, 13, 16, 17, 21, 33, 37 и 39–41. Часть утраченных элементов компенсируется новыми специфичными для миторибосом белками или удлинением белков по сравнению с их бактериальными гомологами. Тем не менее, у млекопитающих только 19% отсутствующих последовательностей ррНК малой субъединицы и 28% большой замещаются белками, в то время как аналогичная компенсация в случае миторибосом *L. tarentolae* достигает 50%. Все это привело к появлению ряда отличительных морфологических черт на фоне сохранения общей организации субъединиц и органеллы в целом. К числу таких особенностей относятся, например, туннелеподобные структуры, соединяющие межсубъединичное пространство с внешней средой. Особенно характерно для миторибосом экранирование ррНК белками, а также преобладание белок-белковых межсубъединичных мостиков (9 из 15 у животных) [30]. Уникальной чертой малой субъединицы миторибосом млекопитающих является крайне динамичная трехгранная воротобразная структура, окружающая место входа мрНК [30]. Считается, что она помогает в привлечении лишенных лидерной последовательности мрНК к МСР. БСР характеризуется массивным центральным протуберанцем и отсутствием электронной плотности, соответствующей 5S ррНК. Однако биохимические исследования показали, что 5S ррНК импортируется в митохондрии человека из цитозоля и ассоциирована в органеллах с миторибосомами [38, 39]. Отсутствие основных элементов 16S ррНК, составляющих классический E-сайт – спиралей 11 и 68, а также петлевого участка, находящегося между спиралью 76 и 77, приводит к очень слабому связыванию тРНК в данной области [40]. Еще одной отличительной особенностью БСР является наличие пальцеподобной структуры в Р-сайте, образованной протяженными участками специфических для митохондрий

белков центрального протуберанца. Данный выступ взаимодействует с Т-петлей, находящейся в Р-сайте молекулы тРНК, и, предположительно, оказывает стабилизирующий эффект на связывание. По всей видимости, это является причиной того, что миторибосомы, в отличие от бактериальных рибосом, выделяются с прочно связанной тРНК в Р-сайте. Отдельного внимания заслуживает организация туннеля, через который растущий пептид покидает рибосому [41]. В случае рибосом бактерий и цитоплазмы эукариот он заканчивается отверстием – PES (от англ. Polypeptide Exit Site), представляющим собой плоскую структуру, расположенную в нижней части большой субъединицы. В образовании этой структуры принимают участие элементы доменов I и III 23S ррНК, а также белки L22, L23, L24 и L29. Иначе обстоит дело в случае миторибосом *L. tarentolae* и *B. taurus*, где было обнаружено еще одно отверстие на некотором расстоянии от PES (~25 Å в случае простейших), получившее название PAS (от англ. Polypeptide-Accessible Site) [37, 42]. Причиной образования такой структуры служит отсутствие большей части доменов I и III в ррНК большой субъединицы и их неполная компенсация белками. Таким образом, выход растущей полипептидной цепочки из миторибосом, по-видимому, может осуществляться двумя разными путями.

В отличие от трансляции в цитоплазме, в митохондриях синтезируются практически исключительно гидрофобные полипептиды, образующие функциональные центры комплексов цепи переноса электронов. В связи с этим, для правильной и эффективной интеграции растущего полипептида во внутреннюю мембрану трансляция и, скорее всего, сборка миторибосом происходит непосредственно на внутренней мембране [43, 44]. Достаточно хорошо изучен процесс заякоривания миторибосом на мембране митохондрий *S. cerevisiae*. В нем участвуют ряд белков (Oxa1p, Mba1p, Mdm38p), а также молекулы мрНК, ассоциированные с мембраной посредством трансляционных активаторов – особой группы белков, обнаруженной у дрожжей, вовлеченной в организацию и регуляцию трансляционного аппарата. Oxa1p взаимодействует своим С-концевым доменом с митохондриальным гомологом L23 в районе PES [45, 46], Mba1p играет роль рецептора миторибосом [47], а Mdm38p в паре с Mba1p связывается с большой субъединицей. Любопытно, что при делеции всех генов, кодирующих данные белки, не наблюдается полной диссоциации органелл от мембраны, что свидетельствует о существовании еще неоткрытых компонентов, вовлеченных в данный процесс [48, 49].

Ряд недавних исследований показал, насколько сильно связаны между собой разные ступени передачи генетической информации в митохондриях. Так, в митохондриях клеток человека свободный пул белка большой субъединицы миторибосом MRPL12 селективно связывается с митохондриальной РНК-полимеразой *in vivo* и напрямую стимулирует транскрипцию в системе *in vitro* [50]. Считается, что это один из механизмов координации сборки рибосом в митохондриях. С другой стороны, митохондриальная РНК-полимераза человека (POLRMT) имеет совершенно независимую от транскрипции роль в биогенезе и/или функционировании миторибосом. Эксперименты по коиммунопреципитации и фракционированию митохондриальных лизатов свидетельствуют о том, что POLRMT образует комплекс с 28S субъединицей рибосом, в который также входит паралог митохондриального фактора транскрипции h-mtTFB2 — белок h-mtTFB1, выполняющего роль 12S рРНК-метилтрансферазы [51]. Согласно одной из гипотез, POLRMT стимулирует метилтрансферазную активность h-mtTFB1, а также предотвращает ассоциацию незрелых малых субъединиц с 39S субъединицами, играя роль своеобразной «точки контроля» на пути сборки малой субъединицы.

Ниже представлено поэтапное описание процесса трансляции на примере митохондрий клеток млекопитающих. Параллельно приводятся отличия данной системы от таковой у дрожжей.

ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ В МИТОХОНДРИЯХ

Общая характеристика. В ходе инициации белкового синтеза в Р-сайте малой субъединицы осуществляется поиск и позиционирование стартового кодона матричной РНК с последующим включением в комплекс инициаторной тРНК и присоединением большой субъединицы на завершающей стадии процесса.

Как и все этапы трансляции, инициация проходит при участии специфических белковых факторов. Если в случае бактерий известно три универсальных фактора инициации: IF1, IF2 и IF3, то в митохондриях проанализированных живых организмов обнаружено только два — IF2_{mt} и IF3_{mt} [52]. Оба экспрессированных в бактериальной системе человеческих фактора были детально охарактеризованы *in vitro* [53]. Используя синтезированные *in vitro* 5'-концевые фрагменты мРНК субъединицы I цитохромоксидазы (COI) и субъединицы II НАДН-дегидрогеназы

(ND2), удалось собрать инициаторные комплексы на 55S миторибосомах из печени быка с правильно позиционированной дрожжевой митохондриальной инициаторной тРНК (fMet-tRNA_i) [54]. По результатам анализа полученных экспериментальных данных была предложена рабочая модель инициации митохондриальной трансляции (рис. 1). На первой стадии процесса IF3_{mt} участвует в диссоциации 55S рибосомы, результатом чего является высвобождение 39S субъединицы и комплекса 28S : IF3_{mt}. Для удобства рассмотрения связывание трансляционной ГТФазы IF2_{mt} : GTP показано на следующей стадии, однако точный момент его вступления в комплекс остается неизвестным. Считается, что протягивание мРНК через уникальную воротообразную структуру в 28S субъединице происходит до связывания fMet-tRNA_i, так как было показано, что IF3_{mt}, в отличие от своего бактериального гомолога, дестабилизирует связавшуюся в отсутствие мРНК инициаторную тРНК [55]. Методом ингибирования реакции удлинения праймера обратной транскриптазой (toeprinting) удалось зафиксировать остановку в продвижении мРНК после прохождения первых 17 нуклеотидов. Предполагается, что в этот момент миторибосома сканирует 5'-конец мРНК на присутствие стартового кодона, и, если таковой располагается в Р-сайте, то трансляционная ГТФаза IF2_{mt} в GTP-связанной форме стимулирует связывание fMet-tRNA_i. Возникшее кодон-антикодонное взаимодействие стабилизирует инициаторный комплекс. Если же по какой-либо причине взаимодействия между стартовым кодоном и антикодоном не произошло, то мРНК возобновляет скольжение через 28S субъединицу и в конечном счете диссоциирует. После связывания инициаторной тРНК в комплекс входит 39S субъединица, IF2_{mt} гидролизует связанный GTP до GDP, и инициаторные факторы покидают сформировавшийся 55S инициаторный комплекс, готовый к элонгации синтеза полипептидной цепи.

Необходимо иметь в виду, что описанная выше схема инициации трансляции в той или иной степени применима лишь к митохондриям млекопитающих, а реальный процесс, происходящий *in vivo*, может оказаться гораздо сложнее. В первую очередь, это связано с отсутствием у митохондриальных мРНК животных длинных 5'-НТО (максимум 3 нт у мРНК COI). Эксперименты показали, что присутствие лишь трех дополнительных нуклеотидов перед стартовым кодоном в случае мРНК COI приводит к снижению эффективности формирования инициаторных комплексов на 40%, а 12 добавочных нуклеотидов с 5'-стороны от стартового АУГ приводят

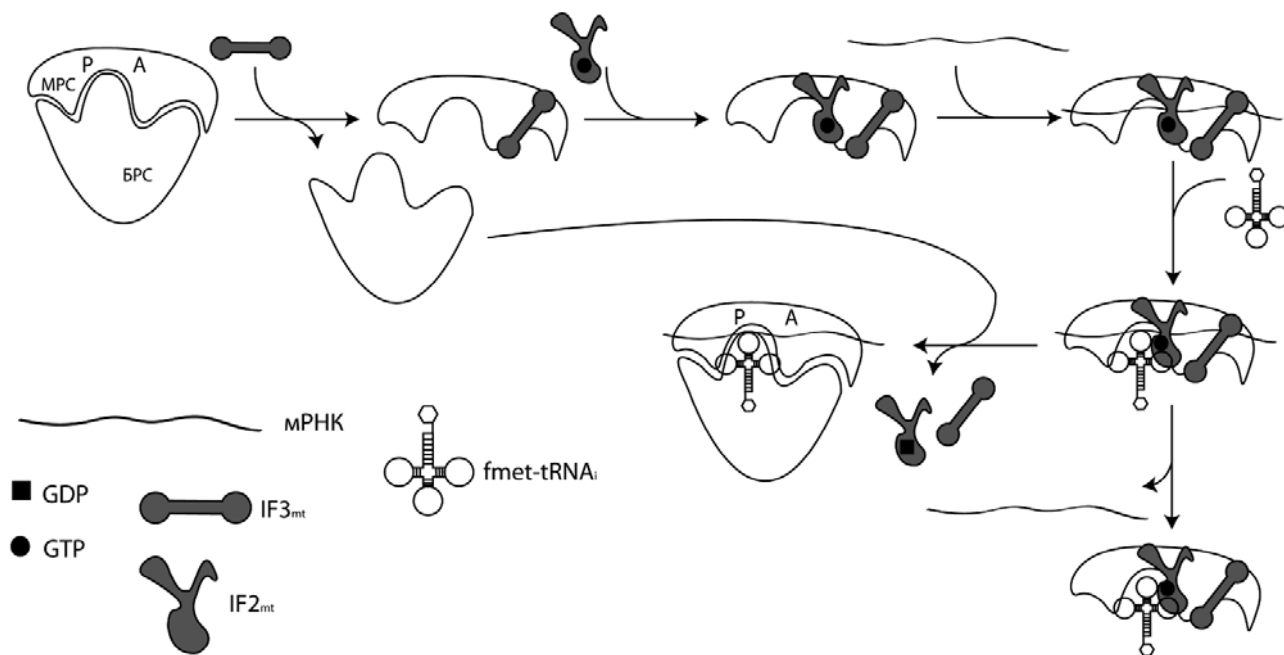


Рис. 1. Схематическое изображение инициации трансляции в митохондриях

к 80% снижению [54]. Совершенно иная ситуация наблюдается у дрожжей, где стартовому кодону в молекулах мРНК_{mt} предшествует длинная 5'-НТО, с которой взаимодействуют специфические активаторы трансляции (см. ниже). Также в митохондриях дрожжей, в отличие от млекопитающих, существуют две метиониновые тРНК: инициаторная и элонгаторная. Ранее считалось, что для инициации синтеза белка строго необходимо формилирование метионина, связанного с инициаторной тРНК. Однако у *S. cerevisiae* инициация трансляции может идти и при отсутствии формильного остатка у fMet-tRNA_i. Недавно был обнаружен вспомогательный фактор АерЗр, который способствует связыванию неформилированной tRNA_i с IF2_{mt} [56]. Данный белок совершенно необходим, когда доступна лишь неформилированная форма стартовой тРНК. АерЗр является периферическим белком внутренней мембраны митохондрии, содержит четыре РНК-связывающих PPR-мотива (по-другому называющиеся пентатрикопептидными мотивами), и в дополнение к роли в инициации трансляции стабилизирует бицистронную мРНК_{mt}, кодирующую субъединицы **a** и **8** АТФ-синтазы [57]. У млекопитающих участие единственной метиониновой тРНК в инициации или элонгации определяется конкуренцией между трансформилазой и элонгаци-

онным фактором EF-Tu_{mt}: сродство IF2_{mt} к формилированной форме в 50 раз выше, чем к неформилированной, в то время как EF-Tu_{mt} не проявляет детектируемого сродства к fMet-tRNA_i [58].

Кроме того, в митохондриях сахарометов присутствуют специальные белковые активаторы трансляции, большинство из которых не обнаружены в митохондриях млекопитающих. Например, у дрожжей *S. cerevisiae* такие специфические белковые факторы были обнаружены для каждого из восьми полипептидов, закодированных в геноме органеллы [59]. Трансляционные активаторы — это закодированные в ядерном геноме белки внутренней митохондриальной мембраны, участвующие в организации процесса трансляции. Также они координируют скорость синтеза закодированных в митохондриях белков с процессами их дальнейшей сборки в состав комплексов дыхательной цепи. Детальное описание трансляционных активаторов можно найти в недавней подробной обзорной работе на данную тему [60].

Митохондриальные факторы инициации трансляции. Как уже было указано выше, ни в одной изучавшейся системе митохондриальной трансляции не удалось обнаружить гомолога эубактериального IF1 [61]. Этот небольшой белок (71 а.о. у *E. coli*) в бактериальной системе совместно с

IF3 ускоряет связывание fMet-tRNA_i с 30S субъединицей, блокирует связывание этой тРНК в А-участке рибосомы и ингибирует вступление в комплекс 50S субъединицы в отсутствие fMet-tRNA_i. До последнего момента считалось, что отсутствие IF1 в митохондриях компенсируется короткой вставкой между доменами V и VI (согласно 6-доменной схеме организации IF2) в IF2_{mt} [62]. Данная гипотеза подтверждается тем фактом, что экспрессия гена бычьего IF2_{mt} позволяет расти клеткам *E. coli* с делецией гена, кодирующего IF1. Результаты криоэлектронной микроскопии, полученные на 70S рибосомах в комплексе с бычьим IF2_{mt} и fMet-tRNA_i при наличии мРНК и негидролизуемого аналога GTP GDPNP, показали, что вставка в IF2_{mt} занимает тот же участок на межсубъединичной поверхности 30S частицы, что и IF1 в бактериальной системе [61]. В то же время, биоинформатический анализ показал, что данная аминокислотная последовательность характерна только для

позвоночных животных и не имеет гомологии с бактериальным IF1 [52]. Следовательно, данный феномен не является универсальным. Скорее всего, описываемая вставка образовалась вторично уже после утраты IF1_{mt}.

IF2_{mt} является консервативным белком и демонстрирует значительную степень гомологии не только с IF2 бактерий и архей, но и с соответствующим цитоплазматическим фактором эукариот. По аналогии с 6-доменной организацией IF2 *E. coli*, в IF2_{mt} выделяют четыре домена: III, IV, V и VI; последний состоит из двух субдоменов (CI и CII; рис. 2) [63]. Домен IV представляет собой классический G-домен – центр связывания гуанидилых нуклеотидов [53]. В присутствии GDPNP IF2_{mt} связывается с 28S субъединицей в три раза более эффективно, чем в присутствии GDP и в 10 раз более эффективно, чем в отсутствие нуклеотидов, при этом константа диссоциации для комплекса 28S : IF2_{mt} измеренная в экспериментах с биотинилированными

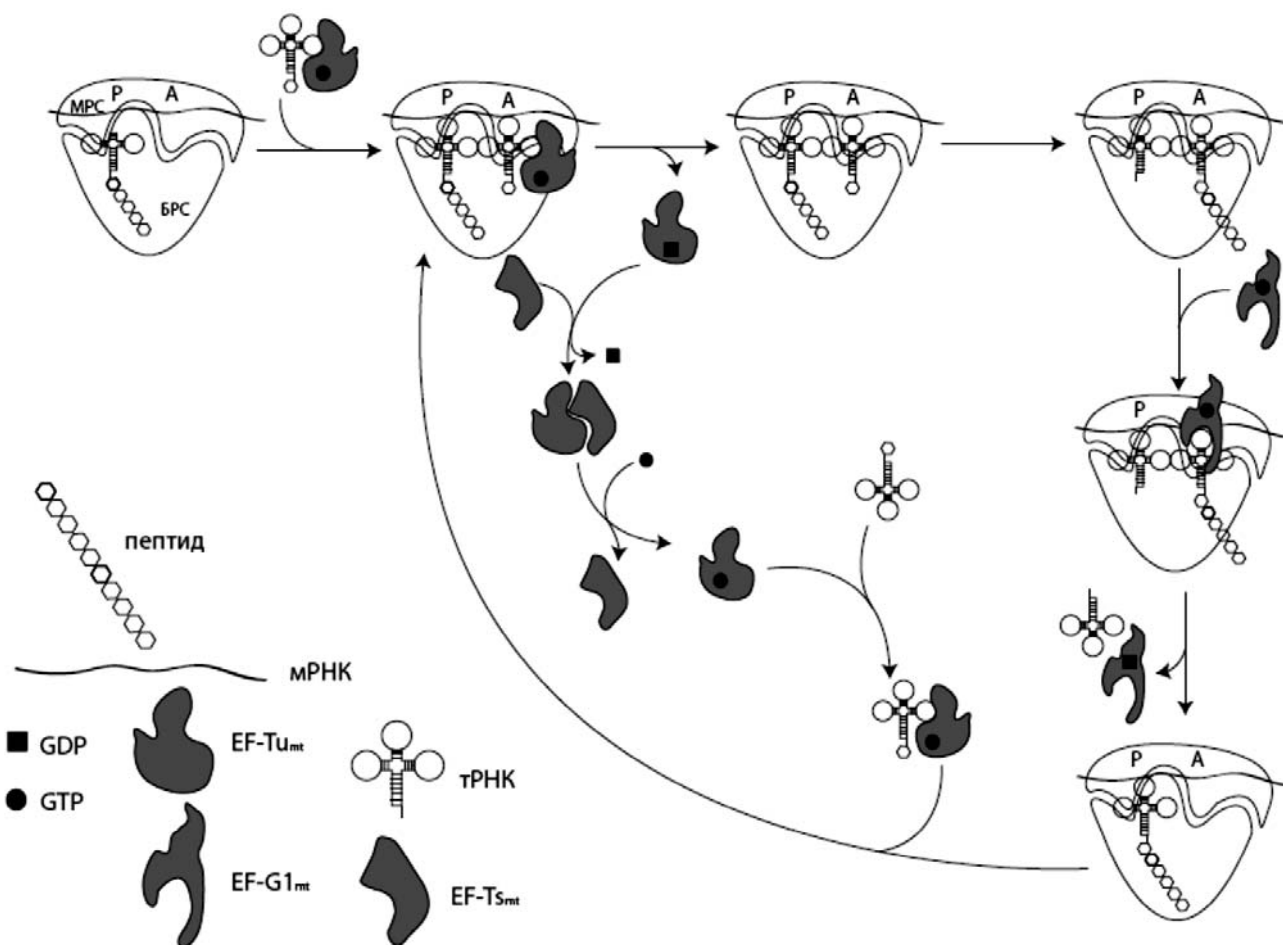


Рис. 2. Схематическое изображение элонгации трансляции в митохондриях

ми митоторибосомами при наличии GDPNP, оказалась равной 10–20 нМ [64]. Домен III образует контакты с малой субъединицей митоторибосомы, а домен VICII вовлечен в связывание ССА-конца молекулы fMet-tRNA_f. Специфичная для животных вставка между доменами V и VICI, предположительно играющая роль утерянного аналога IF1, контактирует со спиралью h18 и h44 рРНК и белком S12.

Гораздо сложнее обстоит дело с третьим митохондриальным фактором инициации трансляции. Низкая степень гомологии с большинством бактериальных факторов (20,8% идентичных аминокислот в гомологичных позициях у человеческого фактора в сравнении с IF3 *E. coli*) долгое время служила преградой на пути обнаружения соответствующего фактора в митохондриях эукариот. Поиски ортологов IF3_{mt} в базе данных EST *Homo sapiens* оказались безрезультатными. В то же время, в ней был найден белок с высокой степенью гомологии с IF3 *Mycoplasma* sp. и аналогичным фактором из хлоропластов *Euglena gracilis* [65]. В итоге были обнаружены последовательности как человеческого, так и мышинного IF3_{mt}. Поиск кандидатов на роль данного фактора в геномах беспозвоночных и низших эукариот является крайне сложной задачей. Используя чувствительный алгоритм PSI-Blast, удалось обнаружить ортолог IF3_{mt} в дрожжах *S. cerevisiae* – белок Aim23p [52]. Рост клеток дрожжей с делецией гена AIM23 на среде с несбраживаемыми источниками углерода восстанавливался при наличии гена, кодирующего IF3_{mt} *S. pombe*, что полностью подтверждает результаты *in silico*. В случае млекопитающих IF3_{mt} – это белок длиной 278 а.о., состоящий, как и его бактериальный гомолог, из двух доменов, соединенных линкерным участком. Согласно данным компьютерного моделирования, N-концевой домен IF3_{mt} (далее N-домен) состоит из α -спирального участка, расположенного напротив β -слоя, состоящего из четырех цепей, и второй α -спирали, продолжающейся в линкерный участок [66]. C-концевой домен (далее C-домен) представлен двумя α -спиралью (H3 и H4), лежащими на состоящем из 4 цепей β -слое, в котором одна из цепей разделена на два сегмента пролиновым остатком. Кроме того, IF3_{mt} имеет N- и C-концевые «хвосты» длиной 31 и 33 а.о., соответственно, и N-концевой сигнальный пептид, направляющий импорт в митохондрию и отщепляемый при достижении белком матрикса с образованием зрелой формы. Оба хвостовых сегмента не могут быть смоделированы на основе имеющихся на данный момент структурных данных, и, предположительно, приобретают определенную конформацию только при связыва-

нии с малой субъединицей митоторибосомы. Линкерный участок частично представлен α -спиралью, однако биохимические исследования бактериального гомолога указывают на то, что линкер обладает значительной гибкостью [67].

Как и бактериальный фактор, IF3_{mt} способствует сборке инициаторного комплекса на 28S субъединице при наличии в системе мРНК и IF2_{mt} : GTP. Это достигается путем активной диссоциации 55S рибосом на большую и малую субъединицы [65]. Свойственная бактериальному фактору корректирующая активность, направленная на диссоциацию неканонических инициаторных комплексов, у IF3_{mt} не наблюдается. Более того, предполагаемые аминокислотные остатки, вовлеченные в данный процесс, не сохранились в составе митохондриального фактора [55].

Распределение ролей между N- и C-доменами бактериального и митохондриального факторов существенно различается. У бактериального белка все функции выполняет C-домен, в то время как N-домен усиливает связывание C-концевого участка с рибосомой, при этом сам почти не взаимодействует с ней. Линкер лишь механически соединяет оба домена и не несет никакой функциональной нагрузки. У IF3_{mt} наибольшей аффинностью к малой субъединице обладает C-домен с линкером (K_d 60 нМ против 30 нМ для полноразмерного белка) [68]. Связывание N-домена с 28S субъединицей характеризуется большей величиной K_d – 240 нМ. Интересно, что в обоих случаях удаление линкера приводит к падению аффинности (K_d 90 и 390 нМ соответственно). Следовательно, линкерный участок модулирует IF3_{mt}, затрудняя его замещение большой субъединицей. Замены аминокислотных остатков C-концевого домена в позициях 170, 171 и 175 на остатки аланина приводят к практически полной утрате способности диссоциировать митоторибосомы и стимулировать образование инициаторного комплекса. При этом мутантные формы белка связываются с малой субъединицей так же хорошо, как и немутированный фактор [66]. Вероятнее всего эти остатки играют важную роль в блокировании межсубъединичного мостика B2b. Эти наблюдения легли в основу современной концепции, согласно которой IF3_{mt} выступает в роли фактора, осуществляющего активную диссоциацию митоторибосом. Делеция N- и C-концевых хвостов приводит к десятикратному увеличению сродства фактора к большой субъединице, при этом большая часть этого эффекта определяется именно N-концевым удлинением. Как было упомянуто в предыдущем разделе, IF3_{mt} проявляет еще одну любопытную активность, не

встречающуюся у бактериальных гомологов: диссоциация fMet-tRNA_i, если она связалась с 28S субъединицей при отсутствии мРНК. Данный феномен наблюдается только при наличии С-хвоста и линкера, а аминокислотные остатки С-концевого хвоста в положениях 247 и 248 играют ключевую роль в данном процессе [68]. Согласно имеющейся трехмерной модели, С-концевое удлинение направлено в сторону линкерного региона, что позволяет этим участкам белка действовать сообща.

Что касается участка связывания IF3_{mt} с малой субъединицей, то здесь наблюдаются значительные отличия от бактериальной системы. Большинство данных было получено с использованием методики химического сшивания с последующей масс-спектрометрией. Полноразмерный IF3_{mt} связывается с белками MRPS5, MRPS9, MRPS10, MRPS18, которые имеют соответствующих гомологов в 70S рибосоме, а также с группой специфичных митохондриальных белков малой субъединицы: MRPS29, MRPS32, MRPS36 и PTCD3. При этом только белок MRPS10, расположенный в области головы 28S субъединицы, сшивался с N-доменом IF3_{mt}, в то время как остальные обнаруженные белки сшивались с С-доменом и линкером. Любопытно, что удаление обоих хвостовых доменов не изменяет характер связывания фактора с миторибосомой [69].

СТАДИЯ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В МИТОХОНДРИЯХ

Общая характеристика. Если провести сравнение между всеми известными системами трансляции, то самой консервативной окажется именно стадия элонгации полипептидной цепи, не претерпевшая в процессе эволюции существенных изменений. Митохондриальный фактор элонгации ГТФаза EF-Tu_{mt} (от англ. Elongation Factor Thermounstable) образует тройственный комплекс с аминоацил-тРНК и ГТР и доставляет активированные аминокислотные остатки в А-сайт миторибосомы [70]. В случае формирования правильного кодон-антикодонного дуплекса происходит гидролиз ГТР, после чего фактор высвобождается из комплекса с рибосомой. Замена связанного молекулой EF-Tu_{mt} GDP на ГТР осуществляется под действием соответствующего фактора обмена гуанидилловых нуклеотидов – EF-Ts_{mt}. Рибосома катализирует реакцию транспептидации, в результате которой деацилированная тРНК остается в Р-сайте, а удлиненная на один аминокислотный остаток пептидил-тРНК располагается в А-сайте. На за-

вершающей стадии рабочего цикла элонгации ГТФаза митохондриальный фактор транслокации 1, EF-G1 (от англ. Elongation Factor G 1), катализирует смещение относительно мРНК на один кодон в направлении 5'–3', в результате чего деацилированная тРНК покидает рибосому, а пептидил-тРНК перемещается в Р-сайт и цикл начинается заново. Существование у 55S рибосомы универсального для бактериальных и цитоплазматических рибосом эукариот Е-сайта до сих пор ставится под сомнение [30].

Митохондриальные факторы элонгации трансляции. EF-Tu_{mt} выделяется из фракции митохондрий печени быка исключительно в виде крайне прочного комплекса с EF-Ts_{mt} (от англ. Elongation Factor Thermostable), не диссоциирующего при наличии GDP в концентрации до 1 мМ [71]. Такое поведение факторов объясняется необычными термодинамическими характеристиками EF-Tu_{mt}: K_d для его комплексов с GDP и GTP равны 1 и 18 мкМ соответственно, в то время как для комплекса с EF-Ts_{mt} – 5,5 нМ [72]. Стехиометрически оба фактора присутствуют в митохондриях *in vivo* в соотношении 1 : 1 и в количестве ≈400 копий на одну митохондрию, что довольно сильно отличается от ситуации, наблюдаемой в бактериальной клетке (8 : 1 и ≈200 000 молекул соответственно) [73]. Сигнал митохондриальной локализации был точно определен для обоих белков путем установления последовательности N-конца в очищенных препаратах, выделенных из митохондрий [74].

Рентгеноструктурный анализ кристаллов EF-Tu_{mt} : GDP показал, что белок сохраняет трехдоменную схему организации, характерную для бактериальных гомологов [75]. Домен I состоит из 8 α-спиралей и 8 β-тяжей, образующих карман для связывания гуанидилловых нуклеотидов. Гибкий линкерный участок из 11 аминокислотных остатков соединяет G-домен с доменом II, который образован 11 β-тяжами, сложенными в мотив «греческий ключ». Домен III сворачивается в структуру «jellyroll», образованную β-слоем из 6 цепей. Любопытной чертой митохондриальных факторов по сравнению с бактериальными является присутствие С-концевого удлинения. Так, у человека и быка его длина составляет 11, а у *C. elegans* – целых 57 а.о. Считается, что у нематод этот участок необходим для образования тройственного комплекса с тРНК, для которых типичны необычно короткие Т-стебли и полное отсутствие D-стебля. Однако у млекопитающих его функцию связывают с участием в связывании аминоацил-тРНК с малой рибосомальной субъединицей.

Карман для связывания акцепторной руки аминоацил-тРНК образован на стыке между до-

менами I и II/III. Интересно, что EF-Tu_{mt} остается активным в системе с бактериальными тРНК, а EF-Tu из *E. coli* не способен участвовать в элонгации, используя митохондриальные тРНК [76, 77]. Образование правильного кодон-антикодонного дуплекса в А-сайте посылает через тело молекулы тРНК к G-домену EF-Tu сигнал, приводящий к гидролизу GTP [78]. Предположительно, более короткие молекулы митохондриальных тРНК в комплексе с бактериальным фактором позиционируются на рибосоме не совсем правильно и не могут в должной степени стимулировать гидролиз нуклеотидов.

Помимо участия в стадии элонгации трансляции, EF-Tu_{mt} выступает в роли шаперона в процессе контроля качества митохондриальных белков [79]. EF-Tu_{mt} связывается с несвернутыми или неправильно уложенными новосинтезированными полипептидами и направляет их к протеазному комплексу, где они подвергаются деградации.

Низкая степень гомологии с бактериальными гомологами (25–35%) долгое время не позволяла получить достоверных сведений о трехмерной организации EF-Ts_{mt}. Бактериальный фактор состоит из четырех доменов: N-концевой, коровый (разделенный на N- и C-субдомены), домен димеризации с укладкой «coiled-coil» и C-концевой модуль [80]. Данные рентгеноструктурного анализа комплекса EF-Tu_{mt} : EF-Ts_{mt} показали, что часть митохондриального фактора довольно сильно отличается от описанной схемы организации. Самой консервативной частью белка является его N-домен, который подобно бактериальному гомологу сложен из трех α -спиралей. Хотя, в целом, коровый домен сохраняет укладку по типу « β -сэндвич», количество и характер организации β -тяжей варьирует. Наиболее существенное отличие — это сильная редукция домена димеризации, который в случае митохондриального фактора представляет большую петлю, упакованную напротив субдомена C, и полное отсутствие C-концевого модуля.

Процесс обмена GDP на GTP сопровождается существенными конформационными перестройками в EF-Tu_{mt}, приводящими к разрыву сайта связывания гуаниловых нуклеотидов, и предположительно проходит в три стадии [81–83]. На первом этапе разрушается сайт связывания катионов Mg²⁺, затем дестабилизируется связывание одного атома кислорода при β -фосфате, и, в конечном счете, нарушаются связи с рибозой и пуриновым кольцом нуклеотида. Таким образом, взаимодействие EF-Ts_{mt} с EF-Tu_{mt} : GDP приводит к большим конформационным изменениям последнего, выражающимся в значительных изменениях в расположении доменов,

что не характерно для соответствующих комплексов *E. coli* и *T. thermophilus*.

Эквивалент бактериального EF-Ts отсутствует в почкующихся дрожжах *S. cerevisiae*, однако обнаружен у делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*. Это является еще одним доказательством того, что система митохондриальной трансляции делящихся дрожжей ближе к таковой у человека, нежели аналогичная система в митохондриях почкующихся дрожжей. Более того, EF-Tu_{mt} *S. cerevisiae* имеет иные константы связывания гуаниловых нуклеотидов (5 и 25 мкМ против 300 и 3 нМ у *E. coli*) и не стабилизируется GDP, как его бактериальный аналог [84]. Отсутствие EF-Ts_{mt} и особенности EF-Tu_{mt} в митохондриях *S. cerevisiae* смогли объяснить с помощью следующего мутационного эксперимента. Точечные замены определенных аминокислотных остатков в EF-Tu_{mt} *S. pombe* приводят к его независимости от EF-Ts_{mt} и тем самым имитируют ситуацию у *S. cerevisiae*, делая EF-Tu_{mt} *S. pombe* функционально похожим на EF-Tu_{mt} *S. cerevisiae* и на другие GTPазы, способные самостоятельно обменивать GDP на GTP [85].

В противоположность бактериям, у которых один и тот же белок EF-G работает во время и элонгации, и терминации, в митохондриальной системе млекопитающих существуют два гомолога EF-G: EF-G1_{mt} и EF-G2_{mt}, аминокислотная последовательность которых идентична на 35% [86]. EF-G1_{mt} проявляет транслокационную активность как в системе с 55S миторибосомами, так и с бактериальными 70S моносомами. В противоположность этому, бактериальный EF-G не работает с митохондриальными рибосомами. Эксперименты на гибридных рибосомах, имеющих гетерологические рибосомные белки L7/L12, показали, что данная специфичность действия связана именно с сайтом посадки трансляционных ГТФаз в районе выступа L7/L12 [87].

Несмотря на то, что EF-G1_{mt} был выделен из печени быка много лет назад, он остается одним из самых слабо охарактеризованных белков митохондриального аппарата трансляции [88]. По аналогии с бактериальным белком EF-G1_{mt} структурно подразделяется на пять доменов, а его форма поразительно схожа с таковой у тройственного комплекса EF-Tu : GDPNP : Phe-tRNA^{Phe} [89]. Примечательно, что фусидовая кислота не ингибирует EF-G1_{mt} в системе с миторибосомами, а при тестировании этого фактора на бактериальных рибосомах наблюдаемый от данного антибиотика эффект незначителен [88]. При этом все предположительно вовлеченные во взаимодействие с антибиотиком аминокислотные остатки представлены в митохондриальном факторе.

ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ И РЕЦИКЛИНГ В МИТОХОНДРИЯХ

Третья и четвертая стадии биосинтеза белка в митохондриях наступают тогда, когда стоп-кодон мРНК оказывается в А-сайте миторибосомы и декодируется *транс*-действующим белковым фактором. Согласно общепринятой рабочей модели терминации и рециклинга, стоп-кодон распознается фактором терминации RF1_{mt} (от англ. Release Factor 1), который способствует гидролизу сложноэфирной связи между находящейся в Р-сайте молекулой тРНК и присоединенным к ней новосинтезированным полипептидом, что приводит к освобождению последнего [90]. Расщепление происходит в пептидил-трансферазном центре большой субъединицы и сопровождается гидролизом ГТР. Механизм высвобождения RF1_{mt} из комплекса с миторибосомой до сих пор неизвестен. После освобождения новосинтезированного полипептида факторы RRF1_{mt} (от англ. Ribosome Recycling Factor) и RRF2_{mt}: ГТР (он же EF-G2_{mt}) вместе способствуют диссоциации тРНК и мРНК от рибосомы, а также диссоциации рибосомных частиц на субъединицы (рис. 3), создавая условия для повторного использования рибосомы в следующем эписикле трансляции. Для освобождения RRF1_{mt} и EF-G2_{mt} от большой субъединицы необходим гидролиз ГТР, связанного с EF-G2_{mt}.

До недавнего времени в научной литературе было широко распространено мнение об использовании расширенного репертуара стоп-кодонов в митохондриях человека [91]. Две открытые рамки считывания заканчиваются нестандартными триплетами – АГА и АГГ в случае генов МТСО1 и МТНД6 соответственно. Лишь недавно появились данные, свидетельствующие о том, что 55S миторибосома при достижении этих триплетов вызывает сдвиг рамки считывания на –1 нуклеотид, что приводит к установке в А-сайте миторибосомы стандартного стоп-кодона УАГ, который распознается при помощи RRF_{mt} [92]. Таким образом, из модификаций генетического кода в митохондриях млекопитающих имеется лишь самая стандартная, а именно перекодировка УГА в триптофановый кодон.

Существуют два основных класса факторов терминации RF: класс I и класс II [93]. Механизм узнавания этими белками мРНК зависит от нуклеотидной последовательности последней в случае факторов первой, но не второй группы. В митохондриях изученных групп организмов не было обнаружено факторов, относящихся к классу II. У архей и в цитоплазме эукариот все три стоп-кодона узнаются одним единственным

белком – aRF1 и eRF1 соответственно, а у бактерий двумя, при этом кодон УАА узнается обоими факторами, RF1 вдобавок к этому распознает УАГ, а RF2 – УГА [94, 95]. Биоинформатический анализ показал, что митохондриальные факторы по своей аминокислотной последовательности схожи с бактериальным RF1 [96].

Используя известную структуру RF1 *Thermus thermophilus*, удалось смоделировать трехмерную организацию человеческого RF1_{mt} [90]. Оказалось, что все характерные для данного класса белков домены и мотивы сохранились в митохондриальном факторе. В частности, участвующий в узнавании стоп-кодона мотив РХТ домена 2 (РКТ в данном случае) и элемент верхушки α-спирали 5 домена 4, а также крайне консервативный мотив GGQ домена 3, катализирующий гидролиз сложноэфирной связи между тРНК и новосинтезированным пептидом [97], сохраняют пространственную организацию функционально активного белка. Именно эта, так называемая «открытая» конформация фиксируется на рибосоме после того, как стоп-кодон в А-сайте был распознан, а домен 3 развернулся перпендикулярно по отношению к остальной части белка и расположился в пептидил-трансферазном центре большой субъединицы [98]. Любопытно, что в человеческих митохондриях помимо RF1_{mt} было обнаружено еще два белка, имеющих GGQ мотив в аминокислотном окружении свойственном белкам семейства RF, а именно ICT1 и C12orf65 [99, 100]. Однако, как выяснилось позже, только ICT1 демонстрирует зависимость от рибосом, но в то же время независимость от кодона в А-сайте пептидил-гидролазную активность. Данный белок предположительно участвует в высвобождении пептида от «застывшей» на лишенной стоп-кодона матрице РНК рибосомы, т.е. выполняет в митохондриях млекопитающих функцию аналогичную той, которую играет тмРНК в цитоплазме бактерий [101]. Более того, согласно результатам экспериментов по ко-иммунопреципитации, белок ICT1 прочно ассоциирован с большой субъединицей миторибосом и функционально активен в гетерологической системе с 70S рибосомами.

Как уже упоминалось в предыдущей главе, в митохондриях животных существуют две формы белка EF-G: EF-G1_{mt} и EF-G2_{mt}. Первый задействован на стадии транслокации, а основная роль последнего – это участие в процессе рециклинга. Более того, результаты экспериментов *in vivo* на штамме *E. coli* с температурозависимым аллелем RRF дают основания считать EF-G2_{mt} неотъемлемым участником данной стадии трансляции, так как только в комбинации с

ним RRF_{mt} способен восстановить нормальный фенотип мутантного штамма [102]. Есть все основания полагать, что обнаруженное в митохондриях млекопитающих разделение функций, выполняемых у бактерий одним белком, свойственно митохондриям всех эукариотических организмов. Любопытно, что, как показал детальный биоинформатический анализ, такое разделение функциональных активностей явля-

ется асимметричным: в то время как у EF-G_{2mt} наблюдается сохранение общей архитектуры данного класса белков, у EF-G_{1mt} происходили изменения в G-домене, совершенствующие или видоизменяющие характер взаимодействия с нуклеотидами [103].

Стадия рециклинга в митохондриях имеет еще одну интересную особенность по сравнению с бактериальной системой: гидролиз свя-

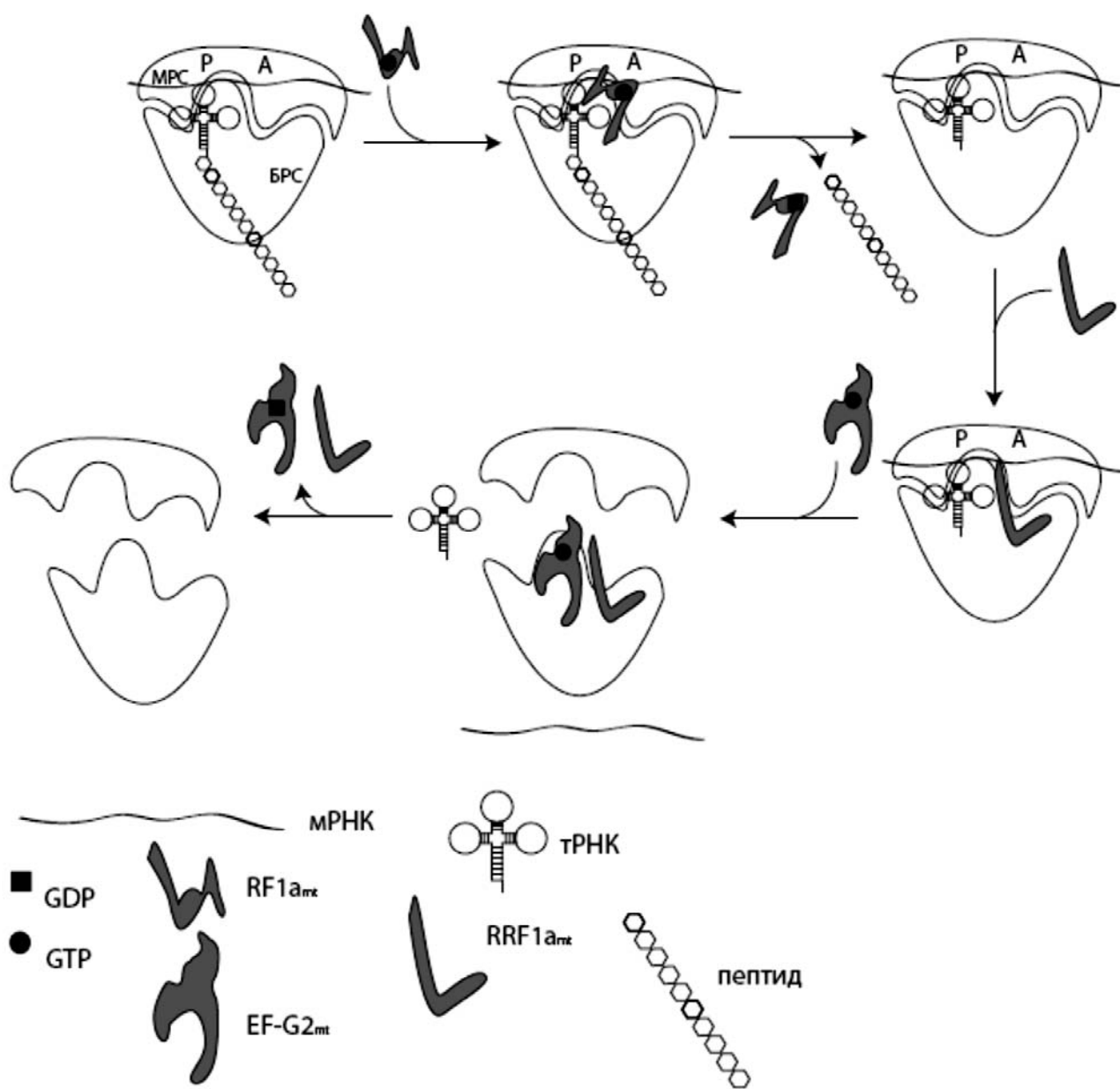


Рис. 3. Схематическое изображение терминации трансляции в митохондриях

занного с EF-G2_{mt} GTP происходит после диссоциации миторибосом на субъединицы и, скорее всего, необходим для ухода EF-G2_{mt} и, предположительно, RRF_{mt} с большой субъединицы, что позволяет субъединицам ассоциировать вновь в отсутствие IF3_{mt} [102].

В настоящем обзоре мы попытались свести воедино имеющиеся в распоряжении научного сообщества данные относительно биосинтеза белка в митохондриях эукариотических клеток. Очевидно, однако, что наши знания относительно биосинтеза белка в митохондриях вовсе не являются исчерпывающими. Не имеется ни детальных структурных данных относительно митохондриальных рибосом, ни точного биохимического описания процессов, происходящих в ходе митохондриальной трансляции. Несмотря на то, что, в целом, митохондриальная трансляция организована по прокариотическому типу, она характеризуется целым рядом существенных отличий от бактериальной системы. В последние годы, с появлением все новых и новых работ, описывающих такие отличия, интерес научного сообщества к биосинтезу белка в митохондриях неуклонно растет. В связи с этим мы считаем, что в самое ближайшее время следует ждать еще большего количества выполненных исследований, которые помогут пролить

свет на структурно-функциональные особенности данного процесса.

Авторы глубоко признательны всем работникам лабораторий П.А. Каменского, В. Гаврилюка и Н. Зенкина за помощь в написании данной работы.

Исследования в лаборатории П.А. Каменского финансово поддерживаются средствами Международной ассоциированной лаборатории «RNA-mitocig» и грантами РФФИ и Минобрнауки РФ (соглашение 8817), в лаборатории В. Гаврилюка – Эстонским научным фондом (ETF9012 и PUT37) и Европейским региональным фондом развития (код RLOTITIPP), в лаборатории Н. Зенкина – научным советом по биотехнологии и биологическим наукам Соединенного Королевства и Европейским советом по науке (ERC-2007-StG 202994-MTP). А.В. Кузьменко финансово поддержан программой Архимедес Европейского социального агентства и программой У.М.Н.И.К. Фонда содействия малым формам предпринимательства в научно-технической сфере. Д. Аткинсон – Эстонским научным фондом (ETF9020) и Европейским социальным фондом (грант «Mobilitas» MJD99).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., and Woese, C.R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4443–4447.
- Leon, S.A., and Mahler, H.R. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 305–319.
- Linnane, A.W., Lamb, A.J., Christodoulou, C., and Lukins, H.B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 1288–1293.
- Wagner, R.P. (1969) *Science*, **163**, 1026–1031.
- Watanabe, K. (2010) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **86**, 11–39.
- Christian, B.E., and Spremulli, L.L. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 1035–1054.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 560–567.
- Gray, M.W. (2012) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011403.
- Wilson, R.J., and Williamson, D.H. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 1–16.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. (1981) *Nature*, **290**, 457–465.
- Unsold, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A. (1997) *Nat. Genet.*, **15**, 57–61.
- Gray, M.W., Lang, B.F., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T.G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y., and Burger, G. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 865–878.
- Brown, W.M., George, M., Jr., and Wilson, A.C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1967–1971.
- Jacob, J.E., Vanholme, B., Van Leeuwen, T., and Gheysen, G. (2009) *BMC Res. Notes*, **2**, 192.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K., and Muto, A. (1992) *Microbiol. Rev.*, **56**, 229–264.
- Masters, B.S., Stohl, L.L., and Clayton, D.A. (1987) *Cell*, **51**, 89–99.
- Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apollito, M.F., Centra, M., Rocchi, M., and Zeviani, M. (1997) *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 615–625.
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y.I., Litonin, D., Cramer, P., and Temiakov, D. (2011) *Nature*, **478**, 269–273.
- Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981) *Nature*, **290**, 470–474.
- Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1081–1085.
- Montoya, J., Ojala, D., and Attardi, G. (1981) *Nature*, **290**, 465–470.
- Groot, G.S., Flavell, R.A., Van Ommen, G.J., and Grivell, L.A. (1974) *Nature*, **252**, 167–169.
- Grohmann, K., Amairic, F., Crews, S., and Attardi, G. (1978) *Nucleic Acids Res.*, **5**, 637–651.
- Dunstan, H.M., Green-Willms, N.S., and Fox, T.D. (1997) *Genetics*, **147**, 87–100.

25. Dziembowski, A., Piwowarski, J., Hoser, R., Minczuk, M., Dmochowska, A., Siep, M., van der Spek, H., Grivell, L., and Stepien, P.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1603–1611.
26. Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M., Lightowers, R.N., Morse, H.C., 3rd, Koehler, C.M., and Teitell, M.A. (2010) *Cell*, **142**, 456–467.
27. Suzuki, T., and Nagao, A. (2011) *Annu. Rev. Genet.*, **45**, 299–329.
28. Helm, M., Brule, H., Friede, D., Giege, R., Putz, D., and Florentz, C. (2000) *RNA*, **6**, 1356–1379.
29. Yokogawa, T., Watanabe, Y., Kumazawa, Y., Ueda, T., Hirao, I., Miura, K., and Watanabe, K. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6101–6105.
30. Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spremulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2003) *Cell*, **115**, 97–108.
31. Kamenski, P., Kolesnikova, O., Jubenot, V., Entelis, N., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 625–637.
32. Hancock, K., and Hajduk, S.L. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 19208–19215.
33. Schneider, A. (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 1033–1053.
34. O'Brien, T.W. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 3409–3417.
35. Maslov, D.A., Sharma, M.R., Butler, E., Falick, A.M., Gingery, M., Agrawal, R.K., Spremulli, L.L., and Simpson, L. (2006) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **148**, 69–78.
36. Borst, P., and Grivell, L.A. (1971) *FEBS Lett.*, **13**, 73–88.
37. Agrawal, R.K., and Sharma, M.R. (2012) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 797–803.
38. Smirnov, A., Entelis, N., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2011) *Genes Dev.*, **25**, 1289–1305.
39. Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P., and Tarassov, I.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 45642–45653.
40. Agrawal, R.K., Yassin, A., Lahiri, I., Spremulli, L.L. (2011) *Structure and function of organellar ribosomes as revealed by cryo-EM*, SpringerWien, New York.
41. Gruschke, S., and Ott, M. (2010) *Bioessays*, **32**, 1050–1057.
42. Sharma, M.R., Booth, T.M., Simpson, L., Maslov, D.A., and Agrawal, R.K. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9637–9642.
43. Watson, K. (1972) *J. Cell. Biol.*, **55**, 721–726.
44. Fiori, A., Mason, T.L., and Fox, T.D. (2003) *Eukaryot. Cell*, **2**, 651–653.
45. Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 6448–6457.
46. Jia, L., Dienhart, M., Schram, M., McCauley, M., Hell, K., and Stuart, R.A. (2003) *EMBO J.*, **22**, 6438–6447.
47. Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., and Herrmann, J.M. (2006) *EMBO J.*, **25**, 1603–1610.
48. Bauerschmitt, H., Mick, D.U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P., and Herrmann, J.M. (2010) *Mol. Biol. Cell*, **21**, 1937–1944.
49. Frazier, A.E., Taylor, R.D., Mick, D.U., Warscheid, B., Stoepel, N., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Guiard, B., and Rehling, P. (2006) *J. Cell. Biol.*, **172**, 553–564.
50. Surovtseva, Y.V., Shutt, T.E., Cotney, J., Cimen, H., Chen, S.Y., Koc, E.C., and Shadel, G.S. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17921–17926.
51. Surovtseva, Y.V., and Shadel, G.S. (2013) *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2479–2488.
52. Atkinson, G.C., Kuzmenko, A., Kamenski, P., Vysokikh, M.Y., Lakunina, V., Tankov, S., Smirnova, E., Soosaar, A., Tenson, T., and Hauryluk, V. (2012) *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6122–6134.
53. Spremulli, L.L., Coursey, A., Navratil, T., and Hunter, S.E. (2004) *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **77**, 211–261.
54. Christian, B.E., and Spremulli, L.L. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 28379–28386.
55. Bhargava, K., and Spremulli, L.L. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 7011–7018.
56. Lee, C., Tibbetts, A.S., Kramer, G., and Appling, D.R. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 34116–34125.
57. Ellis, T.P., Helfenbein, K.G., Tzagoloff, A., and Dieckmann, C.L. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 15728–15733.
58. Spencer, A.C., and Spremulli, L.L. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5464–5470.
59. Towpik, J. (2005) *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **10**, 571–594.
60. Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W., and Bonnefoy, N. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 286–294.
61. Yassin, A.S., Haque, M.E., Datta, P.P., Elmore, K., Banavali, N.K., Spremulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3918–3923.
62. Gaur, R., Grasso, D., Datta, P.P., Krishna, P.D., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R.K., Spremulli, L., and Varshney, U. (2008) *Mol. Cell*, **29**, 180–190.
63. Laalami, S., Sacerdot, C., Vachon, G., Mortensen, K., Sperling-Petersen, H.U., Cenatiempo, Y., and Grunberg-Manago, M. (1991) *Biochimie.*, **73**, 1557–1566.
64. Spencer, A.C., and Spremulli, L.L. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1750**, 69–81.
65. Koc, E.C., and Spremulli, L.L. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 35541–35549.
66. Christian, B.E., and Spremulli, L.L. (2009) *Biochemistry*, **48**, 3269–3278.
67. Hua, Y., and Raleigh, D.P. (1998) *J. Mol. Biol.*, **278**, 871–878.
68. Haque, M.E., Grasso, D., and Spremulli, L.L. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 589–597.
69. Haque, M.E., Koc, H., Cimen, H., Koc, E.C., and Spremulli, L.L. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 1779–1784.
70. Smits, P., Smeitink, J., and van den Heuvel, L. (2010) *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 737385.
71. Schwartzbach, C.J., and Spremulli, L.L. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 19125–19131.
72. Cai, Y.C., Bullard, J.M., Thompson, N.L., and Spremulli, L.L. (2000) *Protein. Sci.*, **9**, 1791–1800.
73. Worlax, V.L., Bullard, J.M., Ma, L., Yokogawa, T., and Spremulli, L.L. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1352**, 91–101.
74. Worlax, V.L., Burkhart, W., and Spremulli, L.L. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1264**, 347–356.
75. Andersen, G.R., Thirup, S., Spremulli, L.L., and Nyborg, J. (2000) *J. Mol. Biol.*, **297**, 421–436.
76. Hunter, S.E., and Spremulli, L.L. (2004) *Mitochondrion*, **4**, 21–29.
77. Bullard, J.M., Cai, Y.C., Zhang, Y., and Spremulli, L.L. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1446**, 102–114.
78. Piepenburg, O., Pape, T., Pleiss, J.A., Wintermeyer, W., Uhlenbeck, O.C., and Rodnina, M.V. (2000) *Biochemistry*, **39**, 1734–1738.
79. Suzuki, H., Ueda, T., Taguchi, H., and Takeuchi, N. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 4076–4084.
80. Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S., and Leberman, R. (1996) *Nature*, **379**, 511–518.
81. Zhang, Y., Li, X., and Spremulli, L.L. (1996) *FEBS Lett.*, **391**, 330–332.
82. Zhang, Y., Sun, V., and Spremulli, L.L. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21956–21963.
83. Zhang, Y., and Spremulli, L.L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28142–28148.

84. Rosenthal, L.P., and Bodley, J.W. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 10955–10959.
85. Chiron, S., Suleau, A., and Bonnefoy, N. (2005) *Genetics*, **169**, 1891–1901.
86. Hammarsund, M., Wilson, W., Corcoran, M., Merup, M., Einhorn, S., Grander, D., and Sangfelt, O. (2001) *Hum. Genet.*, **109**, 542–550.
87. Terasaki, M., Suzuki, T., Hanada, T., and Watanabe, K. (2004) *J. Mol. Biol.*, **336**, 331–342.
88. Chung, H.K., and Spremulli, L.L. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 21000–21004.
89. al-Karadaghi, S., Aevansson, A., Garber, M., Zheltonosova, J., and Liljas, A. (1996) *Structure*, **4**, 555–565.
90. Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Pajak, A., and Lightowlers, R.N. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 34479–34485.
91. Richter, R., Pajak, A., Dennerlein, S., Rozanska, A., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010) *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 1523–1526.
92. Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010) *Science*, **327**, 301.
93. Loh, P.G., and Song, H. (2010) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **20**, 98–103.
94. Dontsova, M., Frolova, L., Vassilieva, J., Piendl, W., Kisselev, L., and Garber, M. (2000) *FEBS Lett.*, **472**, 213–216.
95. Ito, K., Frolova, L., Seit-Nebi, A., Karamyshev, A., Kisselev, L., and Nakamura, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8494–8499.
96. Soleimanpour-Lichaei, H.R., Kuhl, I., Gaisne, M., Passos, J.F., Wydro, M., Rorbach, J., Temperley, R., Bonnefoy, N., Tate, W., Lightowlers, R., and Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2007) *Mol. Cell*, **27**, 745–757.
97. Trobro, S., and Aqvist, J. (2009) *Biochemistry*, **48**, 11296–11303.
98. Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H.F. (2008) *Nature*, **454**, 852–857.
99. Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P.M., Wessels, H.J., Huynen, M.A., Smeitink, J.A., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010) *EMBO J.*, **29**, 1116–1125.
100. Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., Pedersen, A.M., Rodenburg, R.J., van der Knaap, M.S., Smeitink, J.A., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., and Shoubridge, E.A. (2010) *Am. J. Hum. Genet.*, **87**, 115–122.
101. Haque, M.E., and Spremulli, L.L. (2010) *EMBO J.*, **29**, 1019–1020.
102. Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., Nierhaus, K.H., and Takeuchi, N. (2009) *Mol. Cell*, **35**, 502–510.
103. Atkinson, G.C., and Baldauf, S.L. (2011) *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 1281–1292.

PROTEIN BIOSYNTHESIS IN MITOCHONDRIA

A. V. Kuzmenko^{1,2}, S. A. Levitskii¹, E. N. Vinogradova¹,
D. Atkinson², V. Haurlyuk², N. Zenkin³, P. A. Kamenski^{1*}

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Molecular Biology Department, Faculty of Biology, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-4309, E-mail: mail@mail.bio.msu.ru

² Institute of Technology, University of Tartu, Nooruse St. 1, 50411 Tartu, Estonia; fax: +(372)737-4900, E-mail: info@tuit.ut.ee, peter@protein.bio.msu.ru

³ Centre for Bacterial Cell Biology, Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE2 4AX, United Kingdom; fax: +44(191)208-3205, E-mail: n.zenkin@ncl.ac.uk

Received December 21, 2012

Revision received March 23, 2013

Translation, that is biosynthesis of polypeptides in accordance with information encoded in the genome, is one of the most important processes in living cells and has been in the spotlight of international research for many years. The mechanisms of protein biosynthesis in bacteria and in the eukaryotic cytoplasm are now understood in great detail. However, much less is known about translation in eukaryotic mitochondria, which is characterized by a number of unusual features. In this review we summarize current knowledge about mitochondrial translation in different organisms while paying special attention to the aspects of this process that differ from cytoplasmic protein biosynthesis.

Key words: mitochondria, translation, ribosomes, translation factors