

На правах рукописи

БРАНДИНА Ирина Львовна

**РОЛЬ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ И РНК-БЕЛКОВЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ИМПОРТЕ тРНК В
МИТОХОНДРИИ ДРОЖЖЕЙ**

03.00.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2005



Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В.Ломоносова, г. Москва и в Институте Физиологии и Биохимии (Страсбург, Франция).

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук, профессор

Крашенинников Игорь Александрович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор

Добров Евгений Николаевич

доктор биологических наук профессор

Тер-Аванесян Михаил Давыдович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится 10 июля 2005 года в 10 ч
на заседании Диссертационного Совета Д 501.001.76 при Московском
Государственном Университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119992,
Москва, Ленинские Горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии им.
А.Н. Белозерского, ауд. 536.

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

Автореферат разослан 6 июля 2005 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор биологических наук

Калинина

Н.О.Калинина

2006-4
13347

2173803

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Митохондрии осуществляют широкий спектр функций, включая обеспечение клеток энергией за счет окислительного фосфорилирования. Для митохондрий характерно наличие собственной ДНК и системы биосинтеза белка, однако большое число макромолекул импортируется в органеллы из цитоплазмы. Было показано, что в ряде случаев в митохондрии транспортируются не только белки, но также и тРНК. К настоящему времени импорт тРНК в митохондрии был обнаружен у простейших, у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, ряда растений и сумчатых млекопитающих. Механизм переноса тРНК в митохондрии и его специфичность значительно отличается от вида к виду.

В случае дрожжей *S. cerevisiae* было показано, что из цитоплазмы в митохондрии импортируется два вида тРНК – тРНК^{Lys}_{CUU} (Martin et al., 1979) и тРНК^{Gln} (Reinehardt et al., 2005). Импорт тРНК является высокоспецифичным процессом, так как одна из двух изоакцепторных лизиновых тРНК (тРНК^{Lys}_{CUU}) направляется в митохондрии дрожжей, в то время как вторая (тРНК^{Lys}_{UUU}) присутствует только в цитоплазме. Такое различие в локализации довольно близких тРНК может быть объяснено отличиями в структуре этих тРНК (Entelis et al., 1998). Следующий уровень селекции может быть опосредован белками, взаимодействующими с тРНК. Ранее в нашей лаборатории было показано, что для импорта тРНК^{Lys}_{CUU} должна быть аминокислотирована с помощью цитоплазматической лизил-тРНК-синтетазы, затем необходимо ее взаимодействие с предшественником митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (Tarassov, Entelis et al., 1995). Однако присутствия аминокислотированной импортируемой тРНК^{Lys}_{CUU} и pre-Msk1p не достаточно для импорта этой тРНК в митохондрии, что говорит о необходимости дополнительных белковых факторов, направляющих ее импорт.

Данная работа была направлена на обнаружение белков, участвующих в импорте тРНК в митохондрии дрожжей и изучение их роли в этом процессе.

Во время выполнения данной работы в нашей лаборатории были получены данные, указывающие на участие гликолитического фермента – енолазы – в импорте тРНК (Н.Энтелис, неопубликованные данные). В данной работе была детально изучена роль енолазы в импорте тРНК в митохондрии дрожжей, охарактеризована митохондриальная локализация енолазы, а также других ферментов гликолиза. Полученные данные расширяют представления об альтернативных функциях ферментов гликолиза и взаимодействии клеточных компартментов. При выполнении данной работы были получены указания на роль убиквитин-протеасомной системы в импорте тРНК в митохондрии, что представляет собой новый пример разнообразия функций убиквитина в клетке.

Изучение механизма импорта тРНК в митохондрии представляет особый интерес не только как одна из актуальных проблем современной биологии, но имеет и прикладное значение. Ряд наследственных болезней человека связан с мутациями в митохондриальных тРНК, приводящими к нарушениям функционирования органелл. Показано, что импортируемая тРНК способна компенсировать нарушения митохондриальной трансляции в клетках человека (Kolesnikova et al., 2004). Понимание молекулярного механизма импорта тРНК необходимо для увеличения эффективности импорта ТРК1 в митохондрии человека.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы было исследование роли белковых факторов и РНК-белковых взаимодействий в импорте тРНК в митохондрии дрожжей.

Для этого в ходе исследования предполагалось выполнить следующие задачи:

1. Идентифицировать белковые факторы, потенциально участвующие в импорте тРНК в митохондрии дрожжей (так называемые факторы импорта) с использованием дву- и тригибридной систем в дрожжах.
2. Изучить влияние выявленных факторов на импорт тРНК в митохондрии дрожжей.
3. Исследовать роль гликолитического фермента – енолазы дрожжей - в импорте тРНК.
4. Охарактеризовать митохондриальную локализацию енолазы в клетках дрожжей и идентифицировать митохондриальные белки, взаимодействующие с енолазой.

Научная новизна и практическая ценность работы

В данной работе тригибридная система впервые использована для поиска белков, взаимодействующих с тРНК. С использованием полногеномных скринингов идентифицированы белки, потенциально участвующие в импорте тРНК в митохондрии. Впервые показано участие убиквитин-протеасомной системы в импорте тРНК в митохондрии. Обнаружена митохондриальная локализация гликолитических ферментов. В настоящей работе впервые доказана роль енолазы в импорте тРНК и описан состав макромолекулярных митохондриальных комплексов, включающих енолазу.

Полученные результаты позволяют приблизиться к пониманию механизмов импорта тРНК в митохондрии дрожжей, что будет использоваться для оптимизации системы искусственного импорта тРНК в митохондрии человека для лечения ряда заболеваний, вызываемых точечными мутациями в митохондриальной ДНК.

Апробация работы

Диссертация была апробирована на заседании кафедры молекулярной биологии Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова. Материалы исследований, представленных в работе, докладывались или были представлены в виде стендовых сообщений на следующих международных конференциях: конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия в 2005, 2002 и 2001 годах), на III и IV мировом конгрессах международной организации «Протеом Человека» (Пекин, Китай, 2004 г. и Мюнхен, Германия, 2005 г.), на XX научной конференции «ТРНК» (Банц, Германия, 2003 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из глав. «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение». Работа завершается выводами и списком цитируемой литературы (271 ссылка). Работу иллюстрируют 53 рисунка, 10 таблиц и 3 приложения. Общий объем диссертации 198 страниц.

Основное содержание работы

Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* было показано, что в митохондрии импортируется одна из двух цитоплазматических лизиновых тРНК - тРНК^{Lys}_{CUU} (далее ТРК1), тогда как вторая тРНК^{Lys}_{UUU} (далее ТРК2) присутствует исключительно в цитоплазме. При этом митохондрии содержат закодированную в митохондриальной ДНК тРНК^{Lys}_{U-UU} (далее ТРК3), которая способна узнавать оба лизиновых кодона. В связи с этим, роль ТРК1 в митохондриях до сих пор остаётся загадкой, хотя есть экспериментальные данные, указывающие на то, что импортируемая тРНК способна участвовать в митохондриальной трансляции (Kolesnikova et al., 2000). Импорт тРНК в митохондрии происходит при участии минимум двух белков - цитоплазматической лизил-тРНК-синтетазы, аминоацилирующей ТРК1, и предшественника митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (далее pre-MSK1p). Присутствие этих двух белков необходимо, но не достаточно для импорта ТРК1 в изолированные митохондрии, значит существуют еще и другие белки, участвующие в импорте ТРК1.

В данной работе проводился поиск белков, участвующих в импорте ТРК1 в митохондрии дрожжей, так называемых факторов импорта, и анализ их роли в импорте ТРК1. Стратегия поиска этих факторов основывалась на предположении, что они взаимодействуют либо с ТРК1, либо с ее переносчиком в митохондрии - pre-MSK1p. Идентификация белков, связывающихся с pre-MSK1p, производилась

с применением двугибридной системы Белки, взаимодействующие с TRK1, были обнаружены с помощью тригибридной системы

Поиск белков, взаимодействующих с pre-Msk1p в двугибридной системе.

На первом этапе работы с помощью двугибридной системы в дрожжах мы осуществили поиск в библиотеке последовательностей кДНК *S. cerevisiae* открытых рамок считывания (ОРС), продукты трансляции которых взаимодействуют с pre-Msk1p. В качестве белка-приманки использовали полноразмерный белок pre-Msk1p или только его N-концевой домен (1-258 а.о.). Последний был выбран в связи с тем, что ранее в нашей лаборатории было показано, что этот РНК-связывающий домен способен направлять импорт TRK1 в изолированные митохондрии дрожжей. В результате были идентифицированы пять белков, взаимодействовавших с pre-Msk1p: Pil1p, Msk1p, Lsb4p, Drs1, Rpn13p, и четыре - с N-концевым доменом pre-Msk1p: Alr1p, Doa1p, Mth1p, Sen1p. Присутствие Msk1p среди идентифицированных белков было ожидаемым, так как известно, что pre-Msk1p функционирует в виде димера. Роль остальных белков, идентифицированных при помощи двугибридной системы, в импорте тРНК анализировалась в дальнейших экспериментах.

Поиск белков, взаимодействующих с импортируемой тРНК.

На следующем этапе мы осуществили поиск белков, с которыми взаимодействовала импортируемая лизинная тРНК (TRK1), с использованием тригибридной системы в дрожжах. В результате скрининга библиотеки кДНК обнаружено 404 клон, содержащих ОРС, продукты трансляции которых взаимодействуют с TRK1 в составе гибридной РНК. Для того чтобы исключить из рассмотрения белки, неспецифически взаимодействующие с РНК, проводили анализ взаимодействия найденных белков с РНК фага MS2 без гена TRK1. Поскольку нельзя однозначно утверждать того, что белки, участвующие в импорте тРНК, взаимодействуют только с TRK1, мы не исключали из рассмотрения белки, взаимодействующие как с TRK1, так и с TRK2 (неимпортируемой лизинной тРНК). В результате было идентифицировано 2 белка, специфически взаимодействующих с TRK1 (Leu9p, Pnc1p); 12 белков, связывающихся с TRK1 и с TRK2, и 14 белков - с TRK1 и с РНК фага MS2.

Для дальнейшего функционального анализа были выбраны белки, представляющие собой интерес как потенциальные факторы импорта (табл. 1).

Таблица 1. Потенциальные факторы импорта TPK1 в митохондрии.

Название OPC	Приманка, использованная в скрининге, где обнаружена данная OPC	РНК, взаимодействующая с OPC в тригибридной системе	Описание белка (в соответствии с базой данных SGD)	Среда, на которой рост штамма с делецией гена замедлен
ALR1	N-Msk1p	TPK1, MS2 ¹	переносчик Mg(2+) через плазматическую мембрану	- ²
DOA1	N-Msk1p	TPK1, TPK2, MS2 ¹	Убиквитин-зависимая деградация белков	Глицерин 37°C
DRS1	pre-Msk1p,	TPK1, MS2 ¹	предполагаемая АТФ-зависимая РНК-хеликаза, участвующая в созревании 60S рибосомальной субчастицы	- ²
LEU9	TPK1		α -изопропилмалат синтаза II, катализирует первую реакцию биосинтеза лейцина	этанол 30°C, лактат 25°C
MTH1	N-Msk1p	ни одна из проверенных РНК	Регулятор транскрипции в присутствии глюкозы	- ³
PIL1	pre-Msk1p	не определено	Ингибитор протеин-киназ Phk1p и Phk2p	- ³
PNC1	TPK1, pre-Msk1p		Никотинамидаза	- ³
RPN13	pre-Msk1p	TPK1, TPK2	Субъединица регуляторной частицы 19S протеасомы	Глицерин 25°C галактоза 30°C
RPN8	pre-Msk1p, TPK1, TPK2		Субъединица регуляторной частицы 19S протеасомы	- ²
SEN1	N-Msk1p	TPK1, MS2 ¹	РНК-хеликаза, участвующая в процессе тРНК, рРНК, мРНК	- ²

N-Msk1p - N-концевой домен pre-Msk1p

1 - РНК фара MS2, без тРНК в составе гибридной РНК

² - делеция гена летальна

³ - изменение фенотипа не обнаружено

Функциональный анализ роли потенциальных факторов импорта

Следующим шагом к пониманию роли потенциальных факторов импорта тРНК являлся функциональный анализ штаммов дрожжей, в которых

интересующие нас гены делетированы, кроме случаев, где делеция гена является летальной – *ALR1*, *DRS1*, *RPN8* и *SEN1*. Данные штаммы были получены нами от компании «Euroscarf» (Франкфурт, Германия). Сначала мы проанализировали уровень дыхательной активности митохондрий путем анализа роста штаммов с делециями интересующих нас генов на средах с разными источниками углерода. Известно, что если функции митохондрий нарушены, наблюдается нарушение роста штамма на средах с несбраживаемыми источниками углерода. Это и было обнаружено для штаммов с делециями генов *DOA1*, *LEU9* и *RPN13* (Табл 1). Однако следует заметить, что отсутствие фенотипа еще не говорит о том, что данные белки не играют роли в импорте тРНК. Роль импортируемой тРНК неизвестна и возможно, она является факультативной, то есть имеет значение для клетки при определенных условиях жизни, например, при стрессовых условиях.

Далее мы проверили, связано ли нарушение дыхания митохондрий с нарушениями импорта тРНК. Для этого было использовано два различных, но дополняющих друг друга подхода. Первый включает в себя анализ количества ТРК1 в митохондриях, выделенных из штаммов с делециями генов-кандидатов, с использованием гибридизации по Нозерну. Отсутствие загрязнения препарата митохондриальными тРНК цитоплазматическими тРНК проверяли путём гибридизации с олигонуклеотидом, комплементарным к ТРК2. Эффективность импорта ТРК1 определяли как соотношение сигнала при гибридизации с зондом, комплементарным к ТРК1 и сигналов при гибридизации с другими зондами, специфичными к митохондриальным тРНК, например, к ТРК3. Второй подход состоит в реконструкции реакции импорта *in vitro*. Для этого к изолированным митохондриям прибавляли радиоактивно-меченую ТРК1 в присутствии экстракта общеклеточных растворимых белков, направляющих импорт, или IDP (от англ. Import Directing Protein). Так можно определить, способны ли митохондрии, изолированные из штаммов с делециями кандидатов, импортировать тРНК, и могут ли общеклеточные растворимые белки, выделенные из этих же штаммов, направлять импорт тРНК *in vitro* (Табл. 2).

Результаты, полученные гибридизацией по Нозерну и при импорте *in vitro*, коррелируют для большинства проанализированных штаммов. Исключением из этого ряда являются штаммы с делециями генов *DOA1* и *RPN13*, кодирующие белки, относящиеся к убиквитин-протеасомной системе.

Табл. 2. Результаты импорта pre-Msk1p и ТРК1 в митохондрии штаммов с делециями генов-кандидатов.

импорт относительно штамма дикого типа		Δmt <i>h1</i>	$\Delta pil1$	$\Delta leu9$	$\Delta rpn1$	$\Delta rpn1$ 3	$\Delta doa1$
pre-Msk1p <i>in vitro</i>	pre-Msk1p/ Msk1p	0.9	0.9	1.5	0.9	2.1	1.5

ТРК1	<i>in vitro</i> IDP указанных штаммов	1.3 30°C Gal	5.6 30°C Gly	3.4 25°C лактат	2 30°C Gal	1.9 25°C Gly	зависит от темп. роста
	<i>In vivo</i> ТРК1/ТРК3	0,9 30°C Gly	2,4 30°C Gal	1,8 25°C лактат	1,9 25°C Gly	20 25°C Gly	3 30°C Gal

Роль убиквитин-протеасомной системы в импорте тРНК.

Убиквитин-протеасомная система (УПС) эукариот осуществляет деградацию полиубиквитинилированных субстратов, связанных с убиквитином либо через аминокгруппу одного из лизинов субстрата (тогда убиквитин-протеинлигаза связана с N-концом субстрата, "N-концевое правило"), либо через N-концевую аминокгруппу субстрата (UFD система). В итоге оба типа субстратов направляются для деградации в протеасому 26S. Среди потенциальных факторов импорта присутствовали три белка, относящихся к убиквитин-зависимой протеасомной системе деградации белков Rpn8, Rpn13 и Doa1. Это позволило нам предположить существование взаимосвязи между УПС и импортом ТРК1.

А. Анализ штаммов дрожжей с делециями или мутациями генов УПС.

Rpn8 и Rpn13 являются неАТФазными субъединицами 19S регуляторной частицы протеасомы. Rpn8 – эндопептидаза, участвующая в регуляции ядерной и цитоплазматической протеасомной деградации белков. Функция Rpn13 в настоящий момент неизвестна (Verma et al, 2000). Фрагмент ОРС, кодирующий Rpn13p, был идентифицирован в скрининге с pre-Msk1p в двугибридной системе, а Rpn8p – с ТРК1 и ТРК2 в тригибридной. После тестирования полноразмерных белков было обнаружено, что оба белка связывались с pre-Msk1p, с ТРК1, с ТРК2, и слабее с РНК фара MS2.

На следующем этапе изучения роли этих белков в импорте тРНК мы провели анализ штамма с делецией *RPN13*, так как делеция *RPN8* является летальной. Мы показали, что штамм *rpn13* (здесь и далее штаммы с делециями генов обозначены курсивом) обладает замедленным ростом на среде с глицерином при 25°C и с галактозой при 30°C. При анализе уровня импорта ТРК1 в штамме *rpn13* мы наблюдали увеличение импорта тРНК (табл.2). При импорте тРНК в митохондрии, изолированные из штамма *rpn13* с использованием общеклеточных белков того же штамма, мы также наблюдали повышенный импорт, что может указывать на негативную роль Rpn13 в импорте ТРК1.

Следующим кандидатом на роль фактора импорта, относящимся к УПС, являлся Doa1p, связывавшийся с N-концевым фрагментом pre-Msk1p в двугибридной системе и со всеми тестируемыми РНК в тригибридной системе. Doa1 – один из компонентов UFD-пути. Функция этого белка остаётся до конца невыясненной. В штамме с делецией *DOA1* деградация UFD-субстратов

существенно замедлена, уровень свободного убиквитина снижен и было показано, что данный фенотип восстанавливался экспрессией дополнительных копий полиубиквитина Ubi4 (Johnson et al, 1995). В связи с этим, мы решили проверить эффективность импорта тРНК в штамме *doa1* и в сконструированном нами штамме с повышенной экспрессией убиквитина - штамме Udo (от Ubi4 и Δ doa1). Штамм *doa1* характеризовался замедленным ростом на среде, содержащей глицерин при 37°C, в то время как штамм Udo нормально рос в тех же условиях. При анализе импорта ТРК1 было замечено, что дрожжи штамма *doa1* характеризовались повышенными значениями импорта ТРК1 в ~3 раза по сравнению со штаммом дикого типа. Экспрессия убиквитина в клетках Udo привела к снижению эффективности импорта ТРК1 до исходного уровня дикого типа. Этот результат позволяет предположить существование взаимосвязи импорта ТРК1 с UFD-системой деградации. Мы предполагаем два возможных механизма регуляции импорта ТРК1 при участии УПС. Первым может являться деградация репрессоров импорта тРНК с участием UFD-системы. Вторым может быть более косвенный эффект, являющийся следствием уменьшения уровня свободного убиквитина в штамме *doa1*. Известно, что УПС играет роль в митохондриальной локализации ряда белков (Zhuang et al, 1988, 1992), (Zoladek et al, 1997), возможно, в штамме *doa1* уменьшение уровня свободного убиквитина в клетке приводит к увеличению моноубиквитинилирования белков (в противоположность полиубиквитинилированию), что приводит к изменению функции и/или локализации митохондриальных белков, и как следствие, к увеличению импорта тРНК.

Б. Влияние ингибирования протеолитической функции протеасомы 26S на эффективность импорта ТРК1 в митохондриях дрожжей

Для понимания роли УПС в импорте тРНК, далее мы анализировали эффект частичного ингибирования протеолитической функции протеасомы 26S на импорт ТРК1. Для этого мы использовали штаммы дрожжей, содержащих мутации в генах, кодирующих две каталитических β -субчастицы протеасомы - β 4 (*PRE1*) или β 5 (*PRE2*), обладающих эндопептидазной активностью - расщепление по С-концу после нейтральных/гидрофобных аминокислот (Groll et al, 1999). Мы провели анализ митохондриальной активности в данных штаммах и обнаружили, что штаммы *pre1-1* и штамм с двойной мутацией *pre1-1/pre2-2*, обладающие 5,5% и 4% протеолитической активности протеасомы относительно штамма дикого типа, практически не растут при 37°C. То есть клетки, обладающие пониженной активностью протеасомы, хуже адаптируются к тепловому шоку и обладают также пониженной активностью митохондрий. Чтобы проверить, ассоциирован ли такого рода фенотип с изменением уровня импорта ТРК1, мы провели гибридизацию по Нозерну митохондриальных тРНК, выделенных из клеток данных штаммов, инкубированных в течение 24 ч при 25°C, а затем еще 12 ч при 37°C (Рис 1).

В результате было обнаружено, что штаммы с пониженной каталитической протеасомной активностью обладают пониженным импортом ТРК1. Снижение уровня импорта не так значительно, как протеасомной активности, но, тем не менее, корреляция очевидна, что указывает на возможную регуляцию импорта ТРК1 за счет расщепления фактора импорта при участии УПС.

Штаммы дрожжей	WCG4	<i>pre1-1</i>	<i>pre2-2</i>	<i>pre1-1/pre2-2</i>
ТРК1				
Митох ТРНК ^{Leu}				
ТРК2				
Соотношение сигналов ТРК1/ Митох ТРНК ^{Leu}	0,96	0,3	0,4	0,2

Рис. 1. Анализ состава митохондриальных тРНК, выделенных из штамма дикого типа (WCG4) и штаммов с мутациями каталитических субъединиц протеасомы. Радиоавтограф фильтра после гибридизации по Нозерну с олигонуклеотидами, специфичными к различным тРНК.

Другим подходом, использованным для изучения роли УПС в импорте, была искусственная временная остановка протеолитической функции протеасомы 26S и анализ ее влияния на импорт ТРК1 в митохондрии. MG132 является конкурентным субстратным ингибитором 20S каталитической частицы протеасомы и деубиквитинилирующих ферментов, которые необходимы для удаления остатков убиквитина с субстратов перед их расщеплением протеасомой и для поддержания уровня свободного убиквитина в клетке. Для экспериментов с MG132 мы использовали штамм *erg6* с повышенной проницаемостью мембран. Мы анализировали уровень импорта ТРК1 методом гибридизации по Нозерну после 3 ч роста на среде с MG132 (Рис.2). Было обнаружено, что в штамме *erg6* обработка MG132 приводит к снижению эффективности импорта ТРК1 на 25% относительно необработанных клеток. Для того, чтобы убедиться, что уменьшение импорта ТРК1 в митохондрии связано с остановкой функции УПС, мы измерили протеолитическую активность протеасомы в препарате растворимых общеклеточных белков, выделенных из штамма *erg6* до и после обработки MG132. Было обнаружено, что при данных условиях обработки MG132 эффективность протеасомы снизилась на 35% относительно необработанных клеток. Таким образом, мы наблюдали прямую корреляцию между активностью протеасомы в клетке и уровнем импорта ТРК1 в митохондрии. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу о существовании в клетках дрожжей системы регуляции митохондриального импорта тРНК, функционирующей при участии УПС.

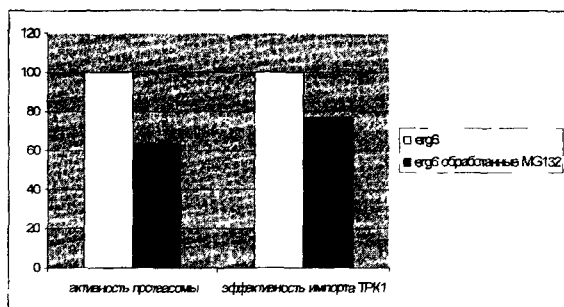


Рис. 2. Анализ эффективности импорта TRK1 в митохондрии и протеолитической активности протеасомы. Штамм *erg6* после инкубации с ингибитором протеасомы MG132 (обозначен черным цветом) по сравнению с необработанными клетками *erg6* (белый).

Анализ роли потенциальных факторов импорта тРНК

Одним из белков-кандидатов на роль фактора импорта являлся белок **Pil1p** Роль фосфорилированного Pil1p состоит в негативной регуляции систем устойчивости к тепловому шоку. При повышении температуры среды реакция фосфорилирования Pil1p протеин-киназой Pkh2p ингибируется, Pil1p становится неактивным и перестает ингибировать Pkh1p/Pkh2p. В двугибридной системе Pil1p взаимодействовал с pre-Msk1p, что косвенно может свидетельствовать о том, что pre-Msk1 регулируется Pil1p. Тогда можно предположить, что фосфорилированный Pil1p ингибирует импорт тРНК. Таким образом, при делеции гена *PIL1* следует ожидать увеличения импорта тРНК по сравнению с клетками дикого типа, что нами и было показано при анализе импорта TRK1 гибридизацией по Нозерну (Рис.3).

YRH501		<i>pil1</i>		
25	30	25	30	T, °C
				TRK1
				TRK3
1	1	65	24	Соотношение сигналов TRK1/TRK3 в штамме <i>pil1</i> относительно YRH501

Рис. 3. Анализ состава митохондриальных тРНК, выделенных из штамма дикого типа (YRH501) и штамма с делецией *PIL1* (*pil1*). Радиоавтограф фильтра после гибридизации по Нозерну с олигонуклеотидами, специфичными к различным тРНК

Следующим кандидатом на роль фактора импорта, выявленным нами в данной работе, был белок **Mth1**, участвующий в негативной регуляции транскрипции генов *HXT*, кодирующих транспортеры глюкозы. Показано, что наличие глюкозы в среде приводит к активации генов *HXT* посредством репрессии *MTH1*.

Мы обнаружили, что Mth1 взаимодействовал с N-концевым доменом pre-Msk1 в двугибридной системе. При проверке взаимодействий Mth1 с различными

РНК в тригибридной системе было обнаружено, что *Mth1* не связывался ни с одной из тестированных РНК. Это говорит о том, что если *Mth1* участвует в импорте тРНК, то его участие должно быть ограничено уровнем белок-белкового взаимодействия, и, возможно, его мишенью является *pre-Msk1*. Далее мы анализировали рост штамма *mth1* на средах с различными источниками углерода и никакого видимого фенотипа нами найдено не было. Однако при анализе эффективности импорта ТРК1 в митохондрии было обнаружено, что при смене источника углерода в среде с глицерина на галактозу в клетках дикого типа происходит уменьшение уровня импорта в два раза, а в штамме *mth1* этого не происходит (Рис. 4). Таким образом, мы можем предположить, что в условиях изменения источника углерода в среде, когда происходит индукция гена *MTN1*, мы наблюдаем уменьшение импорта ТРК1. Однако клетки, не содержащие *Mth1*, не обладают способностью переключать импорт так, чтобы адаптироваться к изменениям в среде.

<i>mth1</i>		YRH501		Штамм дрожжей
Галактоза	Глицерин	Галактоза	Глицерин	Источник углерода в среде роста
				ТРК1
				ТРК3
5,6	8,3	3,2	6,4	Соотношение сигнала ТРК1/ТРК3
1,9	0,9	1,8	1	Соотношение сигнала ТРК1/ТРК3 в штамме <i>mth1</i> относительно YRH501

Рис. 4. Анализ состава митохондриальных тРНК, выделенных из штамма дикого типа (YRH501) и штамма с делецией *MTN1* (*mth1*). Радиоавтограф фильтра после гибридизации по Нозерну с олигонуклеотидами, специфичными к различным тРНК.

В настоящее время существуют указания на то, что одним из уровней регуляции *Mth1* при смене метаболических условий роста является его избирательная деградация при участии УПС (Flick et al., 2003). Возможно, *Mth1* является репрессором импорта тРНК, регулируемым при участии УПС.

В качестве кандидатов на роль факторов импорта тРНК нами были выбраны также белки, специфически связывавшиеся с ТРК1 в тригибридной системе *Pnc1* и *Leu9*. *Pnc1* является никотинамидазой, чья экспрессия активируется в клетке в ответ на различные стрессовые условия (Frothingham et al., 1996). При анализе штамма *pnc1* нами не было найдено дефектов роста на средах с разными источниками углерода. Импорт ТРК1, проанализированный

гибридизацией митохондриальных тРНК по Нозерну, был выше в два раза, чем в диком типе (Рис 5) Таким образом, мы можем сделать вывод в возможном негативном эффекте *Pnc1p* на импорт тРНК.

Leu9 - это митохондриальная лиаза, осуществляющая синтез 2-изопропилмалата и гомоцитрата в ходе биосинтеза лейцина в митохондриях, и полностью импортирующаяся из цитоплазмы (Casalone et al., 2000) При анализе штамма *leu9* было замечено замедление роста на среде с лактатом при 25°C По результатам гибридизации митохондриальных тРНК штамма *leu9* по Нозерну, было обнаружено, что импорт ТРК1 увеличен в 1,8 раза по сравнению со штаммом дикого типа (Рис 5) Эти данные свидетельствуют, что делеция гена *LEU9*, как и *PNC1* приводит к увеличению уровня импорта тРНК в органеллы.

Штамм дрожжей	<i>pnc1</i>		<i>leu9</i>	
	галактоза	глицерин	лактат	
Источник углерода в среде роста	25	30	25	30
Температура роста °С	25	30	25	30
ТРК1				
ТРК3				
ТРК1/ ТРК3	6,2	5,7	5,9	4,9
Соотношение сигнала в штамме с мутацией относ. дикого типа	1,9	0,9	1,8	1,5

Рис. 5. Анализ состава митохондриальных тРНК, выделенных из штамма дикого типа (YPH501) и штаммов с делециями *PNC1* (*pnc1*) и *LEU9* (*leu9*). Радиоавтограф фильтра после гибридизации по Нозерну с олигонуклеотидами, специфичными к различным тРНК.

Alr1 является транспортером Mg^{2+} в эукариотических клетках (Graschopf et al., 2001) Делеция гена *ALR1* летальна при обычных условиях роста (MacDiarmid et al., 1998), поэтому мы не проводили анализ штамма *alr1* Нами было показано физическое взаимодействие *Alr1p* с N-концевым доменом *pre-Msk1p* в двугибридной системе Затем при проверке его связывания с тРНК в тригибридной системе никаких взаимодействий обнаружено не было Это говорит о том, что если *Alr1p* участвует в импорте тРНК, то это должно происходить на уровне белковых взаимодействий *Alr1p* содержит 2 предсказанных трансмембранных домена, и было показано, что по крайней мере часть *Alr1* локализована в митохондриях (Graschopf et al., 2001) Кроме того, минорная фракция *Alr1* подвергается убиквитинилированию Таким образом, на основании обнаруженного физического взаимодействия *Alr1* с фрагментом *pre-Msk1p* в двугибридной системе и его митохондриальной локализации мы можем предположить участие *Alr1* в импорте ТРК1 Возможно, уровень импорта тРНК регулируется в зависимости от концентрации Mg^{2+} в среде, и эта регуляция может быть опосредована *pre-Msk1p* при участии *Alr1* и УПС.

Хеликазы как потенциальные факторы импорта тРНК

В данной работе при скрининге библиотек нами были найдены 2 РНК-зависимые хеликазы - Drs1p и Sen1p. Drs1p необходима для созревания и сборки 60S рибосомальной субчастицы. Sen1p – это АТФ-зависимая РНК-хеликаза, участвующая в процессинге тРНК, рРНК и мяРНК. Мы обнаружили взаимодействие Drs1p с ТРК1 и с pre-Msk1p, а Sen1p, идентифицированная в двугибридном скрининге с N-концевым доменом pre-Msk1p, в тригибридной системе связывалась более эффективно с ТРК1, чем с ТРК2 и с РНК фара MS2. Наличие родства к РНК со стороны РНК-зависимых хеликаз Drs1p и Sen1p является ожидаемым, однако наличие физического взаимодействия обоих хеликаз с pre-Msk1p, являющимся необходимым элементом для переноса тРНК в митохондрии, является существенным указанием на то, что данные хеликазы могут играть специфическую роль в импорте. Анализ мутантов с делециями генов *DRS1* или *SEN1* не представляется возможным, так как делеции этих генов являются летальными. Ранее было показано, что мутации в гене *SEN1* оказывают плейотропные эффекты, что существенно усложняет задачу анализа эффекта мутации на импорт. В связи с этим, дальнейший анализ роли хеликаз в данной работе не проводился.

Таким образом, нами было идентифицировано 10 потенциальных факторов импорта ТРК1 в митохондрии дрожжей. Мы показали, что делеция каждого из шести проанализированных генов приводит к увеличению эффективности импорта ТРК1. Это свидетельствует о негативной роли рассмотренных кандидатов в регуляции импорта ТРК1.

Енолаза как фактор импорта тРНК.

В нашей лаборатории было показано, что в импорте ТРК1 *in vitro* принимает непосредственное участие енолаза (Н.Энтелис, неопубликованные данные) - фермент, осуществляющий предпоследнюю реакцию гликолиза. В дрожжах *S. cerevisiae* два изоэнолазы кодируются генами *ENO1* и *ENO2*, незначительно отличающимися по первичной структуре. Экспрессия двух изоформ зависит от условий роста дрожжей (McAlister et al., 1982).

В данной работе было показано, что присутствия двух рекомбинантных белков – pre-Msk1p и енолазы – достаточно для направления импорта ТРК1 в изолированные митохондрии дрожжей. Эффективность такого импорта в присутствии pre-Msk1p и Eno2p составила 20% относительно импорта в присутствии экстракта общеклеточных растворимых белков, для pre-Msk1p и Eno1p – 5% (рис. 6). Таким образом, была впервые реконструирована система импорта ТРК1 в изолированные митохондрии, что, однако, не отрицает существования в клетке дополнительных белковых факторов, участвующих в регуляции процесса импорта.

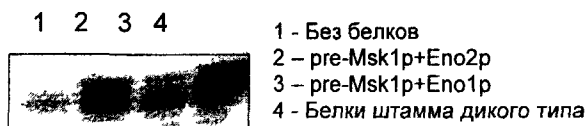


Рис. 6. Импорт P^{32} -ТРК1 в изолированные дрожжевые митохондрии. Реакция проходила при добавлении препарата общеклеточных белков или рекомбинантных белков: pre-Msk1p, Eno1p и Eno2p. Радиоавтограф электрофореграммы РНК, выделенных из обработанных РНКазой митопластов

Затем мы обнаружили, что оба изоформа енолазы одинаково связывают pre-Msk1p в двугибридной системе, но в тригибридной системе Eno2p специфически взаимодействовала с ТРК1 с большим сродством, чем Eno1p. Можно предполагать, что Eno2p направляет импорт ТРК1 в митохондрии за счет сильного и специфического сродства с импортируемой тРНК.

Недавно было получено несколько независимых доказательств того, что енолаза присутствует во фракции митохондриальных белков дрожжей (Zischka et al., 2003, Ohlmeier et al., 2004, Prokisch et al., 2004, Grandier-Vazeille et al., 2001). Мы проанализировали локализацию енолазы в клетках дрожжей при помощи фракционирования и Western-гибридизации высокоочищенной фракции митохондрий. В результате было показано, что енолаза частично локализована на внешней митохондриальной мембране (Рис. 7).

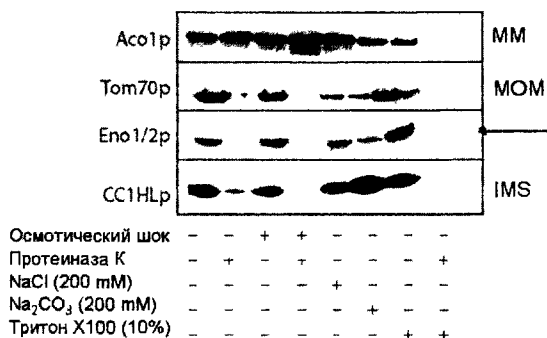


Рис. 7. Локализация митохондриальных дрожжевых белков. Western-гибридизация митохондриальных фракций внешних мембран (MOM), матрикса (MM) и межмембранного пространства (IMS) с антителами к аконитазе (Aco1), белку внешней мембраны Tom70p и гемлиазе цитохромоксидазы 1 (CC1HLP)

Далее мы провели анализ локализации двух изоформ енолазы, полученных *in vitro*. Для этого синтезировали радиоактивно-меченые белки в системе

сопряженной транскрипции-трансляции в присутствии S^{35} -метионина. Затем проводили импорт полученной Eno1p или Eno2p в изолированные митохондрии и фракционировали митохондриальные компартменты с последующей Western-гибридизацией. Было показано, что Eno2p не импортировалась в органеллы, но связывалась с внешнемембранной фракцией митохондрий значительно более эффективно, чем Eno1p. Это говорит о том, что Eno2p прочно связана с митохондриальными мембранами, а Eno1p удерживается там намного слабее. Чтобы количественно оценить распределение енолаз в клетке, после импорта радиоактивно-меченых енолаз в изолированные митохондрии мы провели обработку последних карбонатом натрия с последующим центрифугированием в трехступенчатом градиенте плотности сахарозы. Это позволило разделить свободную интегрированную во внешнюю мембрану и агрегированную с остатками мембран формы белков. Значительная разница была замечена в локализации двух енолаз: 3% Eno2p было найдено во фракции внешнемитохондриальных мембран, в то время как лишь следовые количества Eno1p были агрегированы с мембранами.

Для проверки результатов локализации Eno2p *in vivo* мы создали гибридный белок, Eno2p-YFP, содержащий енолазу 2 и желтый флуоресцентный белок (YFP) на ее С-конце. Клетки, содержащие экспрессирующийся и функциональный белок, Eno2p-YFP, были проанализированы при помощи конфокальной микроскопии. Было обнаружено, что часть сигнала, соответствующего YFP-меченой енолазе, пересекалась с сигналом Митотракера, специфически связывающегося с заряженной поверхностью митохондрий. То есть в клетках дрожжей часть енолазы 2 действительно связана с поверхностью митохондрий.

Для подтверждения функциональной активности енолазы, связанной с митохондриями дрожжей, мы определяли ее энзиматическую активность. При этом мы учитывали эффективность выделения митохондрий и степень их очистки от цитоплазматических белков. Эффективность выделения митохондрий составила 9 ± 3 % и определялась по энзиматической активности митохондриальных белков - цитохром-оксидазы с и цитрат-синтазы - в митохондриальной и постмитохондриальной фракциях. Для определения степени загрязнения митохондрий цитоплазматическими белками мы измеряли активность алкогольдегидрогеназы в митохондриальной фракции дрожжей, и она составила 4%. Данные значения вычитались из активности, измеренной для енолазы в митохондриальной фракции. Таким образом, мы определили, что в клетках дрожжей 7 % энзиматически активной енолазы связано с митохондриальной фракцией. Это значение сопоставимо с количеством енолазы, зафиксированной в митохондриальной фракции *Arabidopsis* - 3% (Giege, Heazlewood et al 2003).

Далее мы проверили присутствие остальных ферментов гликолиза в митохондриях дрожжей, а также клеток печени быка и в клетках человека линии HepG2. Было показано, что энзиматические активности практически всех гликолитических ферментов были зафиксированы в митохондриальных фракциях дрожжей и клеток печени быка.

Анализ митохондриальных белковых комплексов, содержащих енолазу.

Для того, чтобы определить функциональное значение связывания енолазы с митохондриями, из митохондриальной фракции дрожжей в нативных условиях были выделены высокомолекулярные белковые комплексы, содержащие енолазу. Для этого нами были использованы два подхода: двумерный нативный электрофорез и иммунопреципитация с антителами к енолазе.

Двумерный нативный электрофорез по Шаггеру и фон Ягову (далее BN-PAGE от англ. Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) является широко используемым подходом для изучения комплексов митохондриальных белков (Schagger et al, 1995). Использование этого метода позволило нам разделить нативные комплексы митохондриальных белков после их солиubilизации Тритоном X-100, и идентифицировать комплекс, содержащий енолазу, с использованием Western-гибридизации с антителами к енолазе. Мы наблюдали три комплекса, содержащих енолазу (далее обозначенных как KCE), с размером 700 кДа, 520 кДа и 350 кДа (Рис. 8). По результатам Western-гибридизации с антителами к альдолазе, было обнаружено, что только KCE2 с массой 520 кДа содержал два гликолитических фермента - и енолазу, и альдолазу. Чтобы идентифицировать остальные белки, входящие в состав KCE2, после электрофоретического разделения белковых комплексов в первом направлении, полоска, соответствующая KCE2, вырезалась, обрабатывалась трипсином и полученные пептиды анализировались с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF или nanoLC-MS/MS (анализ выполнялся совместно с Кристель Гийер и Лабораторией Протеомного Анализа в Институте Молекулярной и Клеточной Биологии, Страсбург, Франция). Была проведена серия из четырех независимых экспериментов, и в результате нами было идентифицировано 15 белков (Таблица 3).

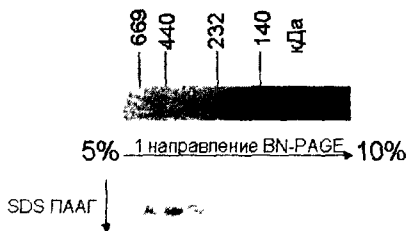


Рис. 8. Идентификация комплексов, содержащих енолазу. Western-гибридизация с антителами к енолазе, после разделения белков методом двумерного электрофореза

Второй метод, использованный для определения митохондриальных белков, связывающихся с енолазой, - иммунопреципитация с антителами к енолазе с последующей идентификацией белков методами масс-спектрометрического анализа. Выделенные дрожжевые митохондрии или фракцию, обогащенную внешними митохондриальными мембранами, солибилизировали при использовании Тритона X-100. Далее проводили реакцию иммунопреципитации с использованием антител к енолазе, иммобилизованных на Протеин-А Сефарозе. После разделения продуктов реакции электрофоретически по системе Лэмли, белки визуализировали при помощи окрашивания нитратом серебра, полоски вырезали из геля и анализировали масс-спектрометрическим анализом MALDI-TOF. Этот подход позволил нам идентифицировать 18 различных белков (Таблица 3). Присутствие енолазы в смеси элюированных белков проверяли методом Western-гибридизации. В качестве негативного контроля проводили иммунопреципитацию с использованием неспецифических антител, или с Протеин-А Сефарозой без добавления антител.

При использовании двух методов - BN-PAGE и иммунопреципитации - нами было идентифицировано 21 белок, входящий в состав макромолекулярного митохондриального комплекса, содержащего енолазу. Причем 12 из этих белков были обнаружены обоими методами (Таблица 3).

Таблица 3 Белки *Saccharomyces cerevisiae*, идентифицированные с использованием масс-спектрометрических методов, при описании комплексов, содержащих енолазу.

Название белка	Описание белка из базы данных SGD (www.yeastgenome.org)	Локализация	Число идентификаций ^{а)}			
			Иммунопреципитация	BN-PAGE	Итого	
VDAC 1 POR1	Митохондриальный порин	MOM	1	3	4	
AAC2	Основной ADP/ATP-переносчик внутренней митохондриальной мембраны	MIM	4	3	7	
MIR1	Митохондриальный переносчик неорганических фосфатов	MIM	2	4	6	
ATP1	Альфа субъединица F1-сектора митохондриальной F1-F0 АТФ синтазы, предшественник	MIM	3	3	6	
ATP2	Бета субъединица F1-сектора митохондриальной F1-F0 АТФ синтазы	MIM	0	4	4	
FBA1	Фруктозо-1,6-дифосфата альдозаза	ЦТП	0	4 ^{б)}	4	
ENO1	Енолаза, катализирует первую реакцию, общую в гликолизе и глюконеогенезе	ЦТП	1 ^{б)}	4 ^{б)}	5	
TDH3	Основная форма глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы	КЛСТ, ЦТП	2	2	4	
TDH1	Минорная форма глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы	КЛСТ, ЦТП	2	0	2	
TEF1	фактор элонгации трансляции альфа EF-1	ЦТП	3	0	3	
RPC34	С34 субъединица РНК-полимеразы III	Ядро	1	1	2	
MOD5	2-изопентенилпирофосфат-тРНК-изопентилтрансфераза	ЦТП, ММ, Ядрышко, Ядро	2	0	2	
CIT1	Цитратсинтаза	ММ	2	0	2	
MDH1	Митохондриальная малатдегидрогеназа	ММ	2	0	2	
SDH2	Железосерный белок – субъединица сукцинатдегидрогеназы	MIM	0	2	2	
IDH1	Субъединица митохондриальной NAD(+)-зависимой изоцитратдегидрогеназы	ММ	0	2	2	
PUT1	Импортируемая в митохондрии пролиноксидаза	ММ	1	1	2	
NDE1	Митохондриальная внешняя NADH-дегидрогеназа	MIM, IMS	1	1	2	
NDI1	NADH: убихинооксидоредуктаза	MIM	3	0	3	
RIP1	Убихинон-цитохромоксидаза с, железосерный белок Риске	MIM	2	2	4	
COR1	центральная субъединица комплекса убихинон-цитохром с редуктазы (bc1 комплекс)	IMS	3	2	5	

- а) Число идентификаций из семи независимых экспериментов по иммунопреципитации и четырех BN-PAGE
 б) Белок идентифицирован по результатам Western-гибридизации
 Локализация белка обозначена сокращениями
 ЦТП – цитоплазма
 КЛСТ – клеточная стенка
 IMS – межмембранное митохондриальное пространство
 ММ – Митохондриальная внутренняя мембрана
 ММ – Митохондриальный матрикс
 MOM – Митохондриальная внешняя мембрана

Состав описанного нами комплекса согласуется с ранее высказанной гипотезой о топологической близости белков, участвующих в окислительном фосфорилировании, NADH-дегидрогеназ и ферментов митохондриального матрикса, таких как ферменты цикла Кребса и биосинтеза аминокислот (Grandier-Vazeille et al, 2001) (Рис 9) Функциональное значение КСЕ может состоять в транспорте синтезированного в гликолизе пирувата в митохондрии Также известно, что проницаемость митохондриального порина (VDAC1) зависит от уровня глюкозы и цитозольного NADH, образованного в гликолизе Возможно, что функция КСЕ, содержащего VDAC1, состоит также в ингибировании дыхания в присутствии глюкозы

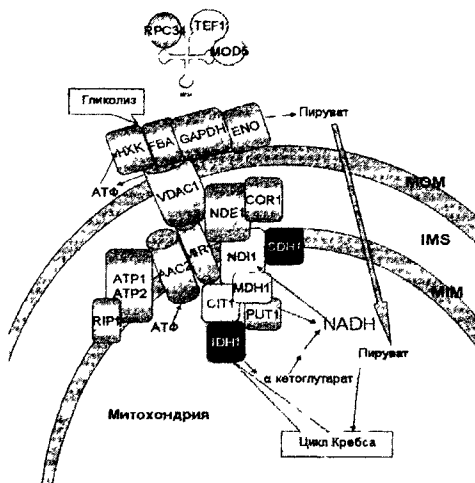


Рис. 9. Модель организации макромолекулярного комплекса, содержащего енолазу.

Белки, идентифицированные после двумерного электрофореза, обозначены темно-серым, после иммунопреципитации – белым, а обоими методами – светло-серым

Альтернативной функцией КСЕ может быть импорт TRK1 в митохондрии Для проверки этой гипотезы мы анализировали присутствие тРНК в КСЕ, изолированном после иммунопреципитации, при помощи реакции обратной транскрипции с последующей ПЦР (RT-ПЦР) Мы обнаружили, что TRK1 присутствовала в этом комплексе, в отличие от TRK2 Кроме того, в составе КСЕ были идентифицированы несколько РНК-связывающих белков - глицеральдегид-

3-фосфатдегидрогеназа, Rps34p, Tef1p и Mod5p. Все эти белки на том или ином этапе функционирования связываются с тРНК и, таким образом, могут потенциально участвовать в импорте ТРК1. Кроме того, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа была обнаружена нами ранее при скрининге библиотек кДНК в тригибридной системе, где она взаимодействовала как с ТРК1, так и с РНК фага MS2. Особый интерес в KCE также представляет белок Mod5p. Это тРНК-изопентенилтрансфераза, модифицирующая аденин в 37 положении цитоплазматических и митохондриальных тРНК, в том числе и ТРК1. Интересно, что механизм тройной локализации - в ядре, в цитоплазме и в митохондриях - белка Mod5p регулируется при участии УПС (Zoladek et al., 1997). Роль Mod5p в импорте ТРК1 нуждается в дальнейшей проверке.

Таким образом, в данной работе доказано непосредственное участие енолазы в импорте и продемонстрирована ее локализация на поверхности митохондрий в составе высокомолекулярного комплекса, содержащего также другие ферменты гликолиза.

Выводы

1. Идентифицировано 9 белков, взаимодействующих с импортируемой в митохондрии дрожжей лизиновой тРНК и ее переносчиком - pre-Msk1p. и являющихся потенциальными факторами импорта ТРК1.
2. Делеция каждого из шести проанализированных генов (*DOA1*, *LEU9*, *MTH1*, *PIL1*, *PNC1*, *RPN13*) приводит к увеличению эффективности импорта лизиновой тРНК. Это может указывать на то, что они являются репрессорами импорта.
3. Показана прямая корреляция между протеолитической функцией 26S протеасомы и эффективностью импорта тРНК в митохондрии дрожжей.
4. Доказано, что гликолитический фермент - енолаза 2 - частично локализован на внешней митохондриальной мембране дрожжей в составе макромолекулярного белкового комплекса, включающего также импортируемую лизиновую тРНК.
5. Продemonстрировано, что енолаза 2 специфически взаимодействует с импортируемой лизиновой тРНК дрожжей и непосредственно принимает участие в ее импорте.
6. Реконструирована система импорта лизиновой тРНК дрожжей в митохондрии из индивидуальных компонентов.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи

1. Brandina, I., Tarassov, I. Importation d'ARN dans les mitochondries (2003) *Regard sur la Biochimie*, 4, pp. 37- 45

- 2 Entelis, N, Kolesnikova, O., Kazakova, H, **Brandina, I.**, Kamenski, P., Krasheninnikov, IA & Tarassov, I (2002) Import of nuclear-encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications *Genetic Engineering: Principles & Methods*, Kluwer Academic/Plenum Publishers (U.S.A.), 24, pp 191-215
- 3 Kolesnikova, O, Entelis, N, Kazakova, H, **Brandina, I**, Martin, R. P, Tarassov, I. (2002) Targeting of tRNA into mitochondria: the role of anticodon nucleotides *Mitochondrion*, 2 (1/2), pp 95-107

Тезисы

- 1 **Brandina, I** Entelis, N Krasheninnikov, IA., Martin, RP, Tarassov I A glycolytic enzyme, enolase, participates in tRNA targeting into yeast mitochondria (2005) *Proceedings of 4th World Annual Congress of Human Proteome Organisation, Munich, Germany*, p. S 3.
- 2 Смирнов А.В., **Брандина И.Л.**, Тарасов И.А., Колесникова О.А., Крашенинников И.А. Влияние некоторых компонентов убиквитин-протеасомной системы на эффективность импорта тРНК в митохондрии *S cerevisiae* (2005) *Тезисы докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2005»*, МаксПресс, Москва, стр 200.
- 3 **Brandina, I**, Entelis, N, Krasheninnikov, I, Martin R.P, Tarassov I Yeast enolase as a part of macromolecular complexes on the outer mitochondrial membrane (2004) *Molecular and Cellular Proteomics*, 3 supp, p. 324
- 4 **Brandina I.**, Tarassov I, Martin R P Genetic tool for search of proteins targeting tRNA into yeast mitochondria (2003) *Proceedings of 20th tRNA Workshop*, Banz, Germany, p 65.
- 5 **Брандина И.Л.** Поиск белковых факторов импорта тРНК в митохондрии дрожжей с использованием дрожжевых дву- и тригибридной систем (2002) *Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов»*, Выпуск 7, стр 15
- 6 **Брандина И.Л.** Цитоплазматическая тРНК, импортируемая в митохондрии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, участвует в митохондриальной трансляции. (2001), *Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов»*, Выпуск 6, Московский Университет, стр 13

№ 18 190

РНБ Русский фонд

2006-4
13347

Подписано в печать 28.09.2005
Формат 60×88 1/16. Объем 1.5 п.л.
Тираж 50 экз. Заказ № 115
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102