

УДК 577.2

Aim23p ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С МАЛОЙ СУБЪЕДИНИЦЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ ДРОЖЖЕЙ*

© 2019 И.В. Чичерин¹, В.В. Зинина¹, С.А. Левицкий¹,
М.В. Серебрякова², П.А. Каменский^{1**}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: peter@protein.bio.msu.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: fxb@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 23.08.18

После доработки 12.09.18

Принята к публикации 12.09.18

Биосинтез белка в митохондриях в целом организован по бактериальному типу, но в то же время имеет ряд уникальных черт. Этап инициации трансляции в органеллах обеспечивается двумя белковыми факторами – mtIF2 и mtIF3. Ранее мы показали, что белок пекарских дрожжей Aim23p является ортологом бактериального IF3, однако данных о межмолекулярных взаимодействиях с участием Aim23p не имелось. В настоящей работе с использованием коиммунопреципитации и седиментации в градиенте плотности мы продемонстрировали, что Aim23p взаимодействует с малой субъединицей митохондриальных рибосом *Saccharomyces cerevisiae* как *in vivo*, так и *in vitro*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, трансляция, рибосома, фактор инициации, Aim23p.

DOI: 10.1134/S032097251901010X

Митохондрии – органеллы эукариотических клеток, выполняющие многие важные функции, такие как клеточное дыхание, биосинтез АТФ, жирных кислот и железосерных кластеров, участие в метаболизме гема, обеспечение программируемой клеточной смерти (апоптоза). Митохондрии, скорее всего, произошли от эндосимбиотической α -протеобактерии [1], в связи с чем у них имеется собственный геном и система экспрессии генов. Митохондриальные геномы животных и грибов относительно малы по размеру и кодируют всего несколько десятков транскриптов, поскольку большая часть митохондриальных генов в ходе эволюции переместилась в ядро. Митохондриальный геном пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой кольцевую молекулу ДНК размером ~85 т.п.н., содержащую восемь белок-кодирующих генов [2]. Большинство этих белков являются мембранными компонентами комплексов дыхательной цепи: комплекса IV (цитохром *c*-оксидазы, COX1, COX2 и COX3), комплекса V

(АТФ-синтазы, АТФ6, АТФ8 и АТФ9) и комплекса III (цитохром *b*). Помимо этого в митохондриальной ДНК дрожжей закодирован один белок митохондриальных рибосом (VAR1).

Аппарат митохондриальной трансляции в процессе эволюции подвергся тонкой настройке, направленной на биосинтез небольшого количества белков, оставшихся закодированными в ДНК органелл. Такая настройка привела к появлению в органеллах высокоспециализированных рибосом [3] и к существенному отклонению от канонического набора факторов трансляции. Это наиболее ярко выражено в случае факторов инициации трансляции [4]. Фактор инициации 2 (mtIF2) – единственный из стандартного набора факторов (IF1, IF2 и IF3), обнаруживаемый в митохондриях всех изучавшихся организмов. Гомолог IF1 в митохондриях не найден; более того, в органеллах сахаромикетов долгое время не могли идентифицировать и IF3 [5]. Однако при помощи комбинации биоинформатического подхода и экспериментов по комплементации *in vivo* было сделано заключение, что белок Aim23p дрожжей является митохондриальным ортологом бактериального IF3 [6]. Отсутствие IF3 у прокариот приводит к остановке трансляции и, как следствие, к гибели клетки [7]. В то

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/bioximiya>, в рубрике «Papers in Press», BM18-239, 22.10.2018.

** Адресат для корреспонденции.

же время у дрожжей делеция гена *AIM23* не ингибирует биосинтез белка в митохондриях полностью, а вызывает лишь разбалансировку синтезируемых в митохондриях белков [8]. В частности, в штамме AIM23Δ скорость биосинтеза Atp9p существенно увеличена, в то время как субъединицы комплекса IV (Cox1p, Cox2p и Cox3p) синтезируются заметно медленнее, чем в штамме дикого типа. Такой эффект заставляет вспомнить о другой группе белков, вовлеченных в митохондриальную трансляцию у пекарских дрожжей, а именно о трансляционных активаторах. Каждый из этих белков специфически воздействует на одну конкретную митохондриальную мРНК, тем самым активируя ее трансляцию [9]. Известно, что трансляционные активаторы взаимодействуют с 5'-UTR мРНК, с большими или малыми субъединицами митохондриальных рибосом, а также с внутренней мембраной митохондрий. Делеции генов, кодирующих трансляционные активаторы, приводят к деградации митохондриальных мРНК [10], трансляционной репрессии [11], уменьшению количества других трансляционных активаторов [12] и увеличению скорости синтеза белков с митохондриальных мРНК, не подверженных действию отсутствующего активатора [13]. Избирательное влияние Aim23p на трансляцию митохондриальных мРНК, кодирующих субъединицы цитохром-оксидазного и АТР-синтазного комплексов, заставляет предположить, что данный белок может выполнять активаторную функцию и вовлекаться во взаимодействия с другими активаторами.

Взаимодействие Aim23p с митохондриальными рибосомами дрожжей было ранее продемонстрировано в двух независимых исследованиях. В первой работе Aim23p был детектирован в образцах GFP-меченных митохондриальных рибосом после иммунопреципитации с антителами к GFP [14]. Любопытно, что этот белок обнаруживался в образцах в том случае, если выделение митохондриальных рибосом производилось при низкой концентрации соли (в этих же условиях с рибосомами были ассоциированы некоторые классические трансляционные активаторы), в то время как в условиях «высокосолевого» выделения рибосом Aim23p в соответствующих образцах не детектировался. В другом исследовании митохондриальные лизаты дрожжей фракционировались в градиентах сахарозы, и Aim23p был обнаружен во фракциях, содержащих митохондриальные рибосомы [8]. Эти экспериментальные факты указывают на возможное взаимодействие Aim23p с митохондриальными рибосомами дрожжей, но не демонстрируют этого напрямую. Более того, в работах,

посвященных разрешению структуры митохондриальных рибосом дрожжей [15] и их большой субъединицы [16], Aim23p обнаружен не был. Целью данной работы являлась прямая демонстрация взаимодействия Aim23p с митохондриальными рибосомами дрожжей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы дрожжей. В данной работе были использованы два штамма дрожжей, обозначаемые wt (дикий тип; D273-10B DUL2, *MATa mal (lys2, ura3)*); любезно предоставлен д-ром Т. Фоксом, Корнельский университет, США) и AIM23Δ (D273-10B DUL2, *MATa mal (lys2, ura3) AIM23::KanMX4*) [8].

Среды и условия культивирования. Клетки *S. cerevisiae* выращивали при 30 °С при покачивании со скоростью 200 об/мин в среде YPGal (1%-ный дрожжевой экстракт, 2%-ный пептон, 2%-ная галактоза; «Amresco», США). Для штамма AIM23Δ в среду добавляли антибиотик G418 («Sigma», США).

Выделение митохондрий. Дрожжи культивировали в 1 л среды YPGal до достижения OD₆₀₀ 2,0–3,0. Клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 5 мин) и промывали водой milliQ. Затем клетки взвешивали и ресуспендировали в буфере для выделения митохондрий (20 мМ HEPES-КОН, pH 7,4, 2 мМ ЭГТА, 0,6 М сорбитол, 0,2%-ный голубой декстран, 1× смесь ингибиторов протеаз; на каждый грамм осажденных клеток добавляли 1 мл буфера). Суспензию смешивали со стеклянными шариками (1 г на 1 г осажденных клеток), после чего проводили разрушение клеток посредством встряхивания смеси в приборе Fast Prep (MP) со скоростью 4 м/с в течение 30 с. Получившуюся суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 1000 g и 4 °С для удаления стеклянных шариков. Собранный супернатант помещали в чистые пробирки и центрифугировали несколько раз по 5 мин при 3000 g и 4 °С (для удаления неразрушенных клеток и ядер) до момента, когда осадок переставал быть видимым. После этого суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 12 000 g и 4 °С для осаждения митохондрий. Получаемые митохондрии ресуспендировали в минимальном объеме буфера для выделения митохондрий, после чего суспензию разделяли на небольшие части, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °С.

Имунопреципитация. За основу процедуры иммунопреципитации был взят протокол, описанный в работе Gerace и Moazed [17]. Митохондрии суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ

Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM CH_3COOK , 2 mM MgCl_2 , 0,5%-ный Triton X-100, 0,5%-ный NP-40) и инкубировали в течение 10 мин при 4 °С и легком перемешивании. После этого суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 20 000 g и 4 °С. Концентрацию белка в собранном супернатанте измеряли при помощи коммерческого набора 660 nm Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США). К каждому образцу добавляли 6 мкг антител к Aim23p, после чего пробирки инкубировали в течение 30 мин при 4 °С и легком перемешивании. По окончании инкубации к каждому образцу добавляли 50 мкл суспензии протеин А-сефарозы («GE Healthcare», Германия), предварительно промытой буфером для лизиса. Образцы снова инкубировали в течение 30 мин при 4 °С и легком перемешивании. Затем протеин А-сефарозу собирали центрифугированием в течение 2 мин при 300 g и 4 °С, дважды промывали 1 мл буфера для лизиса, смешивали с 100 мкл 2× буфера для нанесения образцов по Лэммли и хранили при температуре –20 °С.

Осаждение белков при помощи метанола и хлороформа. Объем каждого образца доводили до 500 мкл водой milliQ. После этого образцы тщательно смешивали с 500 мкл метанола и 125 мкл хлороформа, интенсивно встряхивали в течение 10 с и центрифугировали в течение 2 мин при 16 000 g. Верхнюю фазу удаляли, а к нижней фазе добавляли 500 мкл метанола, после чего производили аккуратное перемешивание посредством переворачивания пробирок. Белки осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 16 000 g. Осадки высушивали на воздухе в течение 2 мин при 80 °С и растворяли в буфере для нанесения образцов по Лэммли.

Масс-спектрометрия. Вырезанную из геля узкую полосу, содержащую прокрашенную полосу белка, промывали 100 мкл 40%-ного ацетонитрила в 0,1 M NH_4HCO_3 (2 раза по 20 мин) и дегидратировали путем добавления 100 мкл ацетонитрила. После этого ацетонитрил полностью удаляли, и к высушенной полосе геля добавляли 5 мкл раствора трипсина (15 мкг/мл; «Promega», США) в 0,05 M NH_4HCO_3 . Протеазную реакцию проводили в течение 4 ч при 37 °С. Пептиды элюировали посредством добавления 10 мкл 0,5%-ной трифторуксусной кислоты, растворенной в 10%-ном водном растворе ацетонитрила, и использовали для получения спектров MALDI.

Образец (1 мкл) смешивали с 0,5 мкл 2,5-дигидробензойной кислоты («Sigma-Aldrich», США; раствор (30 мг/мл) в 30%-ном водном растворе ацетонитрила и 0,5%-ной трифторуксусной кислоты) и высушивали на воздухе. Спектры получали на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF («Bruker Daltonics», США) и

анализировали при помощи программы Flex Analysis 3.3 («Bruker Daltonics», США). Идентификацию белков осуществляли в программе Mascot (www.matrixscience.com) посредством поиска в базе данных NCBI. Достоверно идентифицированными признавали белки-кандидаты с параметром Score, превышающим 87 ($p < 0,05$).

Выделение митохондриальных рибосом. Митохондриальные рибосомы дрожжей выделяли по протоколу, описанному в работе Amunts et al. [16]. Дрожжи выращивали на среде YPGal до достижения $\text{OD}_{600} \approx 2$, осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000 g, дважды промывали водой и ресуспендировали в буфере DTT (0,1 M Tris- H_2SO_4 , pH 9,0, 10 mM DTT) в соотношении 2 мл буфера на 1 г клеток. После инкубации в течение 30 мин при 30 °С клетки осаждали центрифугированием, промывали зимолиазным буфером (20 mM калий-фосфатный буфер, pH 7,4, 1,2 M сорбитол) в соотношении 7 мл буфера на 1 г клеток и ресуспендировали в том же объеме зимолиазного буфера с добавлением зимолиазы 20T (1 мг на 1 г клеток). После инкубации в течение 1 ч при 30 °С и покачивания со скоростью 80 об/мин суспензию получившихся сферопластов центрифугировали, и сферопласты промывали зимолиазным буфером в том же соотношении. Затем сферопласты ресуспендировали в буфере для гомогенизации (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,6 M сорбитол, 1 mM ЭДТА, 1 mM фенолметилсульфонилфторид, 0,2%-ный БСА) и разрушали в гомогенизаторе Даунса (пестик «tight», 10 возвратно-поступательных движений). Получившуюся суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g, после чего отбирали супернатант и центрифугировали его в течение 15 мин при 17 000 g. Осадок митохондрий аккуратно ресуспендировали в минимальном объеме буфера SEM (10 mM MOPS-KOH, pH 7,2, 250 mM сахароза, 1 mM ЭДТА), наносили на ступенчатый (15, 23, 32 и 60%) градиент сахарозы и проводили ультрацентрифугирование в течение 1 ч при 134 000 g. Чистые митохондрии собирали из интерфазы между ступенями градиента сахарозы 60 и 32%, разводили в 3 раза буфером SEM и центрифугировали в течение 15 мин при 17 000 g.

Для выделения митохондриальных рибосом митохондрии аккуратно ресуспендировали в трех объемах буфера для лизиса (25 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 100 mM KCl, 20 mM ацетат магния, 1,7% Triton X-100, 2 mM DTT), инкубировали на льду в течение 30 мин и центрифугировали в течение 30 мин при 25 000 g. Супернатант наносили на «подушку» из 0,5 M сахарозы в том же буфере, но содержащем только 1% Triton X-100. После ультрацентрифугирования при 100 000 g в течение

ние 16 ч седиментировавшие миторибосомы ресуспендировали в минимальном объеме буфера, содержавшего 10 мМ Tris-HCl, pH 7,0, 60 мМ KCl, 60 мМ хлорида аммония, 10 мМ ацетата магния, 7 мМ 2-меркаптоэтанола и 0,25 мМ ЭДТА. После этого миторибосомы наносили на градиент сахарозы 15–40%, приготовленный с использованием того же буфера, и подвергали ультрацентрифугированию в течение 16 ч при 100 000 g. Градиенты фракционировали в направлении от верха к низу центрифужной пробирки; общее количество фракций составляло 40–45, объем каждой фракции – около 250 мкл.

Идентификацию больших и малых субъединиц митохондриальных рибосом осуществляли по профилю поглощения фракций при длине волны 260 нм.

Вестерн-блот-гибридизация. Препараты белков (по 10–20 мкг) наносили на 12%-ный денатурирующий ПААГ, электрофорез проводили по стандартному протоколу Лэммли. Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL («GE Healthcare», Германия), которую затем инкубировали в течение 1 ч в буфере PBS с добавлением 0,1% Tween 20 и 2,5% обезжиренного сухого молока. Первичные антитела кролика к Aim23p были произведены по заказу компанией «Альмабион» (Россия) с использованием рекомбинантного 6-His-Aim23p в качестве антигена.

Нозерн-блот-гибридизация. Использовали олигонуклеотидные зонды к 25S рРНК (5'-CCATGGCCACCCGTCC-3'), 18S рРНК (5'-GTTTCTCAGGCTCCCTC-3'), 21S рРНК (5'-GCGGGACC-TCAATTATAGGCC-3') и 15S рРНК (5'-TAGAACTACACGGGTATCGAATCCG-3').

Зонды метили радиоактивным фосфором (^{32}P) при помощи T4-полинуклеотидкиназы («Thermo Scientific», США) по протоколу производителя. Меченые зонды очищали на колонках Micro Bio-Spin, содержавших Bio-Gel P-6 («Bio-Rad», США). РНК для гибридизации выделяли с использованием реагента Trizol («Invitrogen», США) по протоколу производителя. Образцы РНК (1–2 мкг на дорожку) наносили на 1%-ный агарозный гель с формальдегидом, после чего проводили электрофорез при напряженности электрического поля 5 В/см. РНК переносили на мембрану Hybond N+ («GE Healthcare», Германия) посредством пассивного переноса в течение ночи в 20× буфере SSC. После этого мембрану подвергали воздействию УФ-излучения (3 мин, 1500 Дж/см²) и инкубировали с одним из меченых зондов. Анализ гибридизации проводили с помощью прибора STORM Scanner («GE Healthcare», Германия) и программы Image Quant («GE Healthcare», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Aim23p коиммунопреципитирует с белками малой субъединицы митохондриальных рибосом дрожжей. Белковый интерактом Aim23p в митохондриях дрожжей ранее не изучался. Для идентификации партнеров Aim23p мы выделили митохондрии из двух штаммов *S. cerevisiae*: wt (штамм дикого типа) и AIM23Δ (штамм с делецией гена AIM23). Выделенные митохондрии лизировали, после чего проводили иммунопреципитацию с антителами к Aim23p (см. «Методы исследования»). Штамм AIM23Δ выступал в качестве отрицательного контроля: мы не ожидали обнаружить каких-либо партнеров в условиях делеции соответствующего гена. Преципитировавшие белки из обоих штаммов концентрировали и наносили на 12%-ный денатурирующий ПААГ. После проведения электрофореза гель окрашивали раствором Кумасси бриллиантового синего G-250. Мы сравнили профили полос на дорожках лизатов двух штаммов и идентифицировали множество полос, присутствующих в образце wt, но отсутствующих в образце AIM23Δ (рис. 1, а). Такие дифференциальные полосы могут соответствовать белкам, специфически связывающимся с Aim23p. В связи с этим они были вырезаны из геля и проанализированы при помощи масс-спектрометрии.

Белки, идентифицированные масс-спектрометрическим методом, представлены на рис. 1, б. Абсолютно все белки, потенциально взаимодействующие с Aim23p, оказались белками малой субъединицы митохондриальных рибосом. При этом полоса 4 соответствовала самому Aim23p. Белки, перечисленные на рис. 1, б, покрывают собой большую часть поверхности малой субъединицы, поэтому определить участок связывания Aim23p на рибосоме по нашим данным не представляется возможным. По всей видимости, малая субъединица коиммунопреципитирует с Aim23p в качестве единой частицы. Наши результаты прямо указывают на физическое взаимодействие Aim23p с малой субъединицей митохондриальных рибосом дрожжей *in vivo*.

Aim23p солокализуется с малой субъединицей митохондриальных рибосом дрожжей в градиенте сахарозы. Для получения дополнительных доказательств взаимодействия Aim23p с малой субъединицей митохондриальных рибосом дрожжей мы выделили рибосомы из очищенных митондрией штамма дрожжей дикого типа и разделили их в градиенте сахарозы. После этого фракции, соответствующие большой и малой субъединицам митохондриальных рибосом, были проанализированы на наличие Aim23p при помощи вестерн-блот-гибридизации (рис. 2, а–в).

После разделения митохондриальных рибосом в градиенте сахарозы наблюдались четкие пики поглощения при длине волны 260 нм, соответствующие малой (37S) и большой (54S) субъединицам, а также моносомам (74S) (рис. 2, а). При помощи нозерн-блот-гибридизации с олигонуклеотидными зондами, комплементарными цитозольным и митохондриальным рРНК, мы показали, что фракции не были загрязнены цитозольными рибосомами (отсутствие сигнала с зондами к 25S рРНК и 18S рРНК), но содержали митохондриальные рибосомы (наличие сигнала с зондами к 15S рРНК и 21S РНК; рис. 2, б). Анализ методом вестерн-блот-гибридизации показал, что Aim23p содержится только во фракциях малых субъединиц (рис. 2, в). Эти данные под-

тверждают наше заключение о физическом взаимодействии Aim23p с малыми субъединицами митохондриальных рибосом дрожжей *in vivo*.

Рекомбинантный Aim23p взаимодействует с малыми и большими субъединицами митохондриальных рибосом дрожжей *in vitro*. Подтвердив взаимодействие Aim23p с малыми субъединицами митохондриальных рибосом дрожжей *in vivo*, мы решили проверить, может ли рекомбинантный Aim23p дрожжей (тэгированный на С-конце последовательностью из шести гистидиновых остатков, 6-His) взаимодействовать с миторибосомами дрожжей или их отдельными субъединицами *in vitro*. Для этого мы добавляли к образцам митохондриальных рибосом (очищенных так же, как и в предыдущем эксперименте) ре-

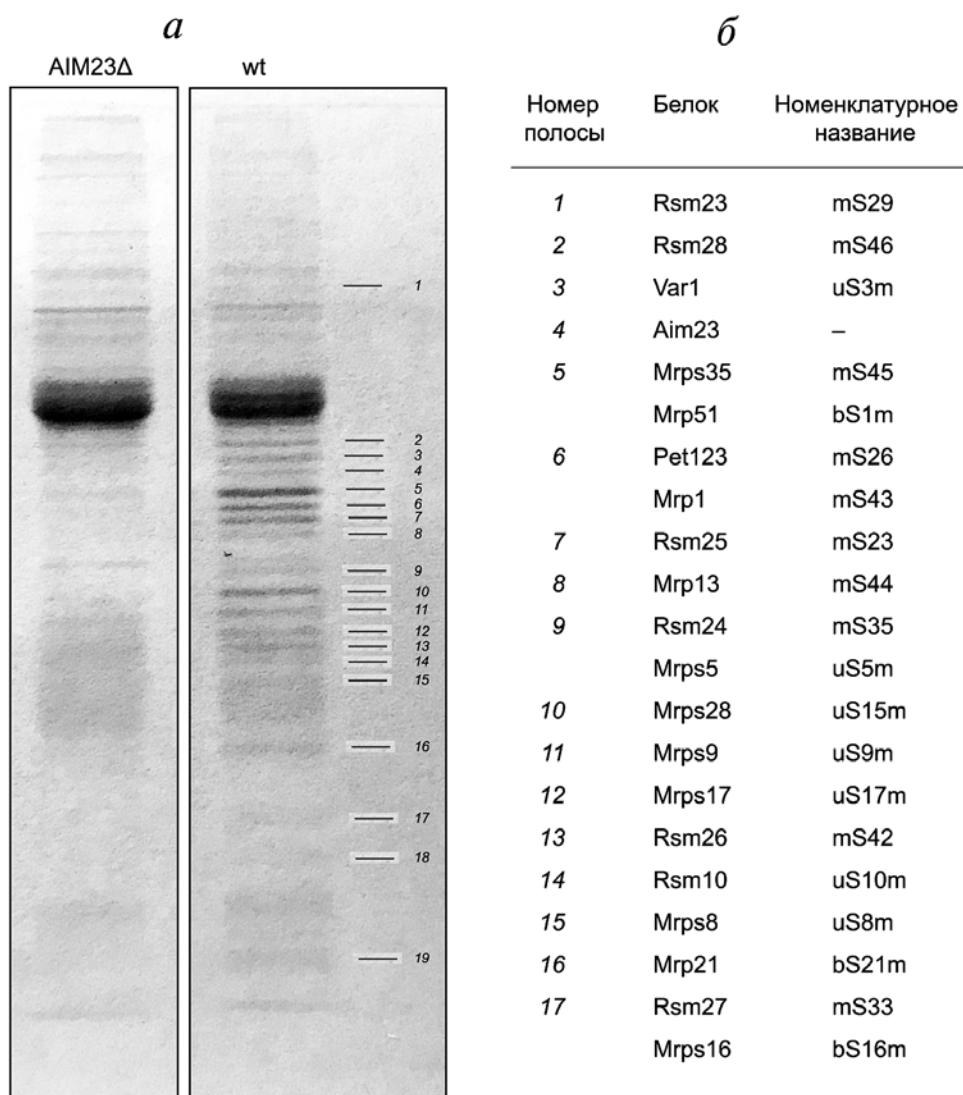


Рис. 1. а — Разделение митохондриальных белков в ПААГ по Лэмбли после коиммунопреципитации с антителами к Aim23p, окрашивание Кумасси. Видны полосы, соответствующие белкам штаммов wt и AIM23Δ. Полосы, детектируемые в штамме wt и не детектируемые в штамме AIM23Δ, отмечены справа линиями и пронумерованы (1–19); б — белки, идентифицированные в дифференциальных полосах при помощи масс-спектрометрии

комбинантный Aim23p в 50-, 25- и 10-кратном молярном избытке, инкубировали смесь в течение 30 мин при 30 °С и разделяли рибосомы в градиенте сахарозы. Присутствие белка во фракциях определяли при помощи вестерн-блот-гибридизации.

Профили поглощения при длине волны 260 нм (A_{260}) для образцов рибосом, содержащих разные количества рекомбинантного Aim23p, были

практически идентичны друг другу: во всех случаях наблюдались два пика, соответствующие малым и большим субъединицам рибосом (на рис. 2, *а* представлен профиль поглощения для образца, содержавшего 25-кратный молярный избыток Aim23p; остальные профили выглядели точно так же). Пик моносом не наблюдался; вероятно, это связано с IF3-подобным действием Aim23p, приводящим к диссоциации рибосом

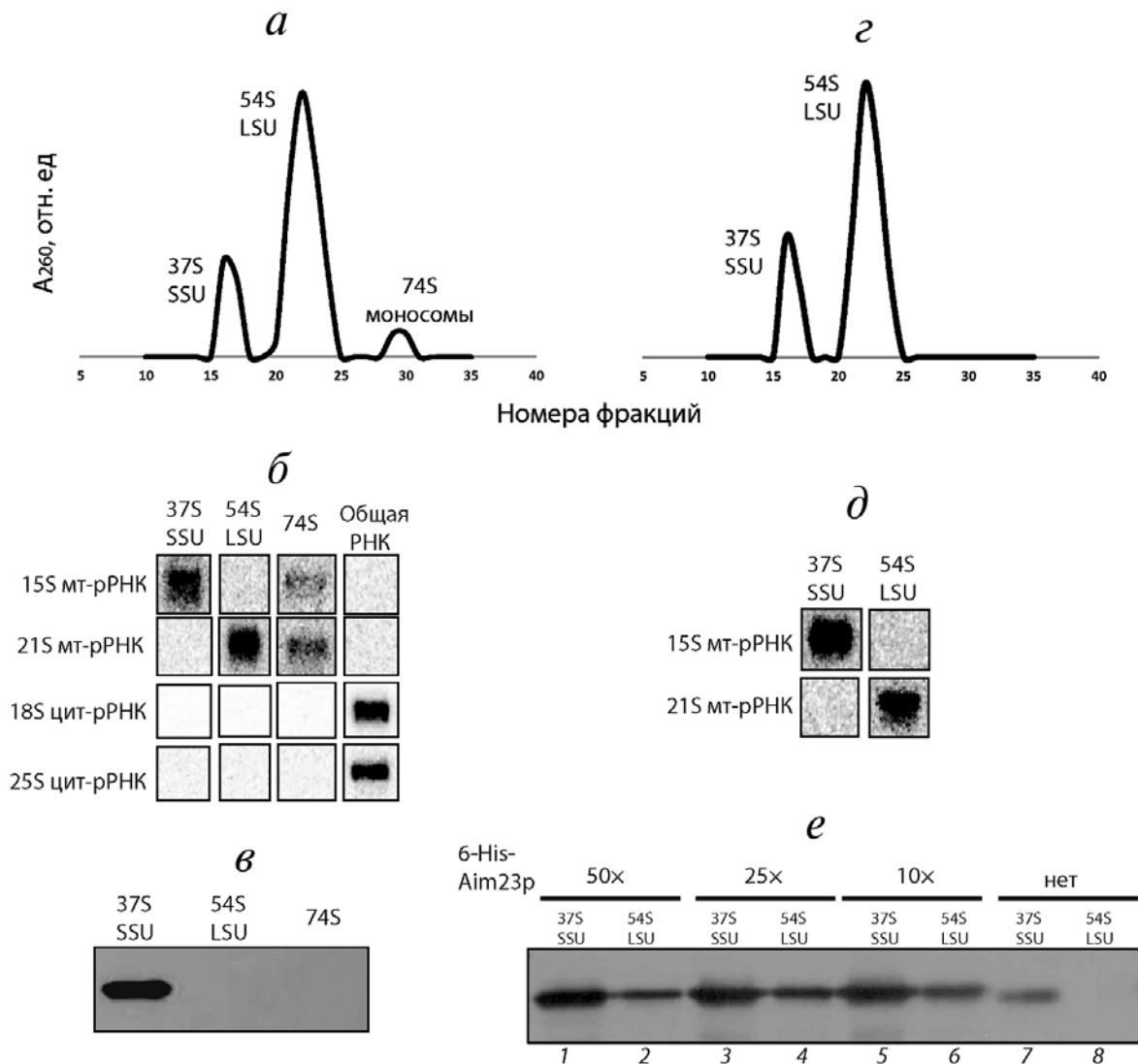


Рис. 2. *а* – Профиль УФ-поглощения фракций, собранных после разделения миторибосом дрожжей в градиенте сахарозы. Отмечены зоны, соответствующие малым субъединицам (37S SSU), большим субъединицам (54S LSU) и моносомам (74S); *б* – анализ пиковых фракций (см. панель *а*) методом нозерн-блот-гибридизации. Использовали олигонуклеотидные зонды, комплементарные рРНК малой (15S) и большой (21S) субъединиц миторибосом дрожжей, а также рРНК малой (18S) и большой (25S) субъединиц цитозольных рибосом дрожжей; *в* – анализ пиковых фракций (см. панель *а*) методом вестерн-блот-гибридизации с антителами к Aim23p; *г* – профиль УФ-поглощения фракций, собранных после разделения миторибосом дрожжей, предварительно инкубированных с рекомбинантным Aim23p, в градиенте сахарозы. Отмечены зоны, соответствующие малым (37S SSU) и большим (54S LSU) субъединицам; *д* – анализ пиковых фракций (см. панель *г*) методом нозерн-блот-гибридизации. Использовали олигонуклеотидные зонды, указанные в описании панели *б*; *е* – анализ пиковых фракций (см. панель *г*) методом вестерн-блот-гибридизации с антителами к Aim23p. Сверху указан молярный избыток 6-His-Aim23p относительно соответствующих субъединиц рибосом

на субъединицы. Результаты нозерн-блот-гибридизации подтвердили, что анализируемые пики содержали соответствующие митохондриальные рРНК (рис. 2, *д*). Мы не тестировали цитозольное загрязнение образцов, поскольку проведенные ранее эксперименты с рибосомами, выделенными точно таким же образом, показали полное отсутствие такого загрязнения (рис. 2, *б*). Aim23p был детектирован во фракциях, содержащих обе субъединицы митохондриальных рибосом, однако большие субъединицы были ассоциированы с существенно меньшим количеством Aim23p, чем малые (рис. 2, *е*). В этот эксперимент также были включены образцы рибосом, к которым не добавляли рекомбинантный Aim23p (рис. 2, *е*, 7, 8), а именно фракции, собранные и проанализированные в предыдущем эксперименте (рис. 2, *а–в*). Эндогенный Aim23p был идентифицирован только во фракциях, содержащих малые субъединицы (рис. 2, *е*, 7). Данный эксперимент показал, что рекомбинантный 6-His-Aim23p способен связываться *in vitro* как с малой, так и с большой субъединицами митохондриальных рибосом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы исследовали белковый интерактом Aim23p, поскольку не имелось практически никакой информации о белковых партнерах этого белка. Нам удалось получить биохимическое доказательство взаимодействия Aim23p с малыми субъединицами митохондриальных рибосом дрожжей. Это согласуется с данными о том, что Aim23p в митохондриях дрожжей выполняет функцию IF3: у бактерий этот фактор также связывается с малыми субъединицами [18]. Также нужно отметить, что Aim23p не был идентифицирован во фракциях целых миторибосом (74S) *in vivo*. Это свидетельствует о том, что Aim23p не является рибосомным белком или структурной частью рибосомы. По всей видимости, он временно связывается с малыми субъединицами и диссоциирует на более поздних стадиях рибосомного цикла. Мы полагаем, что эксперимент по коиммунопреципитации, проведенный в данной работе, позволил нам идентифицировать только мажорные белки митохондрий дрожжей, поскольку чувствительность данного метода делает обнаружение белков, представленных в малых количествах, практически невозможным. По этой причине вопрос о полном белковом интерактоме Aim23p остается открытым. Особый интерес представляют возможные взаимодействия Aim23p с

трансляционными активаторами, количества которых составляют менее пяти молекул на митохондрию [19, 20]. Для того чтобы достоверно продемонстрировать такие взаимодействия, потребуется тэгирование активаторов *in vivo* с последующей коиммунопреципитацией.

Эксперименты *in vitro*, проведенные в данной работе с рекомбинантным 6-His-Aim23p, подтверждают взаимодействие данного белка с малыми субъединицами митохондриальных рибосом дрожжей. В то же время была показана способность Aim23p к связыванию с большими субъединицами. Остается неясным, имеет ли место такое взаимодействие *in vivo*, но в целом исключать этого нельзя, поскольку в 2017 г. на больших субъединицах бактериальных рибосом был найден альтернативный участок связывания IF3 [21]. Более того, недавно мы показали, что Aim23p способен к специфическому связыванию как с малыми, так и с большими субъединицами бактериальных рибосом *in vitro* [22]. Вполне вероятно, что способность связываться с большими субъединицами рибосом является природным свойством Aim23p, однако возможно и то, что такое связывание имеет неспецифический характер. В любом случае, мы не экстраполируем полученные нами результаты на процесс инициации трансляции в митохондриях живых клеток. Вероятно, единственным способом ответа на вопрос о способности Aim23p связываться с большими субъединицами рибосом является проведение структурных исследований.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-14-01005).

Благодарности

Авторы выражают благодарность Константину Ходосевичу (Копенгагенский университет, Дания), Василию Гаврилоку (Университет г. Умея, Швеция; Тартуский университет, Эстония), Ивану Тарасову (Страсбургский университет, Франция), Станиславу Козловскому и Алексею Харитонову (МГУ) за предоставление необходимых для работы реактивов, а также нашим студентам Анне Мирной, Анастасии Капусте и Маргарите Чуденковой за помощь в проведении экспериментов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria, *Nature*, **396**, 133–140.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **440**, 325–331.
- Greber, B.J., and Ban, N. (2016) Structure and function of the mitochondrial ribosome, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 103–132.
- Kuzmenko, A., Atkinson, G.C., Levitskii, S., Zenkin, N., Tenson, T., Haurlyuk, V., and Kamenski, P. (2014) Mitochondrial translation initiation machinery: conservation and diversification, *Biochimie*, **100**, 132–140.
- Кос, Е.С., and Spremulli, L.L. (2002) Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs, *J. Biol. Chem.*, **277**, 35541–35549.
- Atkinson, G.C., Kuzmenko, A., Kamenski, P., Vysokikh, M.Y., Lakunina, V., Tankov, S., Smirnova, E., Soosaar, A., Tenson, T., and Haurlyuk, V. (2012) Evolutionary and genetic analyses of mitochondrial translation initiation factors identify the missing mitochondrial IF3 in *S. cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6122–6134.
- Olsson, C.L., Graffe, M., Springer, M., and Hershey, J.W. (1996) Physiological effects of translation initiation factor IF3 and ribosomal protein L20 limitation in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, **250**, 705–714.
- Kuzmenko, A., Derbikova, K., Salvatori, R., Tankov, S., Atkinson, G.C., Tenson, T., Ott, M., Kamenski, P., and Haurlyuk, V. (2016) Aim-less translation: loss of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation initiation factor mIF3/Aim23 leads to unbalanced protein synthesis, *Sci. Rep.*, **6**, 18749.
- Herrmann, J.M., Woellhaf, M.W., and Bonnefoy, N. (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 286–294.
- Islas-Osuna, M.A., Ellis, T.P., Marnell, L.L., Mittelmeier, T.M., and Dieckmann, C.L. (2002) Cbp1 is required for translation of the mitochondrial cytochrome *b* mRNA of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 37987–37990.
- Manthey, G.M., and McEwen, J.E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, **14**, 4031–4043.
- De Silva, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., Perez-Martinez, X., Fontanesi, F., and Barrientos, A. (2017) The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6628–6643.
- Su, C.H., McStay, G.P., and Tzagoloff, A. (2014) The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase, *Mol. Biol. Cell*, **25**, 965–976.
- Kehrein, K., Schilling, R., Moller-Hergt, B.V., Wurm, C.A., Jakobs, S., Lamkemeyer, T., Langer, T., and Ott, M. (2015) Organization of mitochondrial gene expression in two distinct ribosome-containing assemblies, *Cell Rep.*, **10**, 843–853.
- Desai, N., Brown, A., Amunts, A., and Ramakrishnan, V. (2017) The structure of the yeast mitochondrial ribosome, *Science*, **355**, 528–531.
- Amunts, A., Brown, A., Bai, X.C., Llacer, J.L., Hussain, T., Emsley, P., Long, F., Murshudov, G., Scheres, S.H., and Ramakrishnan, V. (2014) Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit, *Science*, **343**, 1485–1489.
- Gerace, E., and Moazed, D. (2014) Coimmunoprecipitation of proteins from yeast, *Methods Enzymol.*, **541**, 13–26.
- Hussain, T., Llacer, J.L., Wimberly, B.T., Kieft, J.S., and Ramakrishnan, V. (2016) Large-scale movements of IF3 and tRNA during bacterial translation initiation, *Cell*, **167**, 133–144.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast, *Nature*, **425**, 737–741.
- Derbikova, K.S., Levitsky, S.A., Chicherin, I.V., Vinogradova, E.N., and Kamenski, P.A. (2018) Activation of yeast mitochondrial translation: who is in charge? *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 87–97.
- Goyal, A., Belardinelli, R., and Rodnina, M.V. (2017) Non-canonical binding site for bacterial initiation factor 3 on the large ribosomal subunit, *Cell Rep.*, **20**, 3113–3122.
- Levitskii, S., Derbikova, K., Baleva, M.V., Kuzmenko, A., Golovin, A.V., Chicherin, I., Krashennnikov, I.A., and Kamenski, P. (2018) 60S dynamic state of bacterial ribosome is fixed by yeast mitochondrial initiation factor 3, *PeerJ*, **6**, e5620.

Aim23p INTERACTS WITH THE YEAST MITOCHONDRIAL RIBOSOMAL SMALL SUBUNIT

I. V. Chicherin¹, V. V. Zinina¹, S. A. Levitskiy¹, M. V. Serebryakova², and P. A. Kamenski^{1*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: peter@protein.bio.msu.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: fxb@genebee.msu.ru

Received August 23, 2018

Revision received September 12, 2018

Accepted September 12, 2018

Protein synthesis in mitochondria is generally organized in a bacterial-like manner but, at the same time, possesses several unique traits. Translation initiation in mitochondria is regulated by two protein factors, mtIF2 and mtIF3. Previously we demonstrated that *Saccharomyces cerevisiae* protein Aim23p is an ortholog of IF3 in budding yeast. However, the data on the interactions between Aim23p and other proteins are limited. Here, we demonstrated that Aim23p interacts with the yeast mitochondrial ribosomal small subunit both *in vivo* and *in vitro* using co-immunoprecipitation and density gradient sedimentation.

Keywords: mitochondria, translation, ribosome, initiation factor, Aim23p