

## ИМПОРТ тРНК В МИТОХОНДРИИ

© 2004 г. О. А. КОЛЕСНИКОВА,  
Н. С. ЭНТЕЛИС, И. А. КРАШЕНИННИКОВ,  
Р. П. МАРТЭН, И. А. ТАРАСОВ

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,  
Москва и  
FRE 2375 CNRS, Страсбург*

I. Введение. II. Импорт тРНК в митохондрии простейших.  
III. Импорт тРНК в митохондрии растений. IV. Импорт тРНК в  
митохондрии дрожжей. V. Импорт тРНК в митохондрии живот-  
ных. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии — это органеллы, обеспечивающие клетки энергией за счет окислительного фосфорилирования [60]. Митохондрии имеют собственную ДНК и обладают собственной системой биосинтеза белка. Однако большая часть митохондриальных белков закодирована в ядерном геноме и импортируется из цитоплазмы. Кроме того, для некоторых организмов малые РНК, закодированные в ядре, также необходимы для функционирования митохондриальной системы биосинтеза белка. Механизм переноса тРНК через митохондриальные мембраны и специфичность этого процесса сильно варьируют от вида к виду. Так, например, у трипаносоматид все митохондриальные тРНК импортируются из цитоплазмы, а в митохондрии пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* проникает только одна — одна из двух изоакцепторных лизиновых тРНК [62]. В митохондрии млекопитающих в естественных условиях тРНК не импортируется, однако в эти органеллы проникают РНК, входящие в состав РНКазы Р и MRP (сайт-специфической эндорибонуклеазы), а также 5S рРНК.

Большая часть импортируемых в митохондрии тРНК необходима для обеспечения митохондриальной трансляции. Однако роль единственной импортируемой в митохондрии дрожжей лизиновой тРНК

---

*Принятые сокращения:* KRS — дрожжевая лизил-тРНК-синтаза; пре-MSK — предшественник дрожжевой митохондриальной лизил-тРНК-синтазы.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: olya@protein.bio.msu.su

Авторы благодарят РФФИ за финансовую поддержку (грант 03–04–22001–НЦНИ\_a).

остаётся неясной, поскольку эти органеллы содержат собственную митохондриальную лизиную тРНК, способную узнавать оба лизинных кодона AAA и AAG.

Механизмы импорта белков в митохондрии достаточно подробно изучены, чего нельзя сказать о механизмах импорта в них тРНК. Исследование последних интересно не только с фундаментальной, но и с прикладной точки зрения. До сегодняшнего дня в мире не существует эффективной векторной системы для доставки генетического материала в митохондрии. Такую систему можно было бы использовать в генной терапии для лечения ряда заболеваний человека, обусловленных мутациями в генах митохондриальных тРНК. Феномен импорта тРНК в митохондрии представляет собой естественную систему адресной доставки. С этой точки зрения представляется особо интересным исследовать возможность создания искусственной системы импорта тРНК в митохондрии человека, в норме их не импортирующие.

## II. ИМПОРТ тРНК В МИТОХОНДРИИ ПРОСТЕЙШИХ

Импорт тРНК в митохондрии достаточно широко распространён (табл.). Этот феномен был впервые обнаружен у простейших, а затем у грибов, растений и некоторых животных.

### ИМПОРТ тРНК В МИТОХОНДРИИ *TETRAHYMENA*

Предположение об импорте тРНК в митохондрии впервые возникло при изучении простейших рода *Tetrahymena* [71, 15]. Было показано, что только небольшая часть митохондриальных тРНК гибридизуется с митохондриальной ДНК, а все остальные тРНК гибридизовались с ядерной ДНК. На основании этих данных был сделан вывод о возможном импорте тРНК из цитоплазмы в органеллы. Оказалось, что из 36 митохондриальных тРНК *Tetrahymena* только 10 закодированы в митохондриальном геноме, а большая часть тРНК импортируется из цитоплазмы. Поскольку митохондриальные аминоксил-тРНК-синтетазы импортируются из цитоплазмы и имеют высокое сродство к тРНК, было высказано предположение, что эти белки могут играть роль переносчиков тРНК в митохондрии [72].

Из трёх закодированных в ядре изоакцепторных глутаминовых тРНК в митохондрии *Tetrahymena thermophila* проникает только одна тРНК с антикодоном UUG [58]. Она локализуется преимущественно в цитоплазме, однако небольшая её часть (10%) обнаруживается в митохондриях. Две другие глутаминовые тРНК узнают кодоны UAA и UAG, которые являются терминирующими кодонами в универсальном генетическом коде, но используются для кодирования глутамина

Таблица.  
**Митохондриальные РНК, кодируемые ядерной ДНК**

Вид	Тип импортируемой РНК	Число импортируемых тРНК
<b>Простейшие</b>		
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	тРНК	26
<i>Paramecium aurelia</i>	—"	19
<i>Trypanosoma brucei</i>	—"	все
<i>Leishmania tarentolae</i>	—"	все
<i>Pedinomonas minor</i>	—"	15
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	—"	все, кроме 3
<i>Chysochlamydomonas synuroides</i>	—"	2
<i>Ochromonas danica</i>	—"	2
<i>Cafeteria roenbergensis</i>	—"	2
<i>Thraustochytrium aurelium</i>	—"	2
<i>Theileria parva</i>	—"	все
<i>Plasmodium falciparum</i>	—"	все
<i>Dictyostellium discoideum</i>	—"	4
<i>Acanthamoeba castellani</i>	—"	7
<i>Jacoba libera</i>	—"	1
<i>Reclinomonas americana</i>	—"	1
<b>Грибы</b>		
<i>Phytophthora infectans</i>	тРНК	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—"	1
<i>Spizellomyces punctatus</i>	—"	все, кроме 8
<i>Harposchizium sp.</i>	—"	все, кроме 8
<b>Растения</b>		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	тРНК	>8
<i>Solanum tuberosum</i>	—"	>11
<i>Triticum aestivum</i>	—"	14
<i>Zea mais</i>	—"	>8
<i>Marchantia polymorpha</i>	—"	4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	—"	6
<i>Chondrus crispus</i>	—"	2
<i>Porphyra purpurea</i>	—"	2
<b>Животные</b>		
<i>Crassostrea gigas</i>	тРНК	4
<i>Metridium senile</i>	—"	все, кроме 2
<i>Didelphis virginiana</i>	—"	1
Млекопитающие	5S рРНК	
	РНК компонент MRP	
	РНК компонент РНКазыР	

в цитоплазматической системе трансляции у *Tetrahymena*. Эти тРНК обнаруживаются только в цитоплазме и в митохондрии не импортируются. В ходе исследований было показано, что сигнал импорта находится в последовательности зрелой тРНК, поскольку импорт тРНК с антикодоном UUG не зависел от окружения соответствующего гена. Сравнение последовательностей импортируемой и неимпортируемых глутаминовых тРНК позволило выявить несколько участков, которые могут выступать в роли детерминант импорта. Эти участки локализованы в аминокцепторном стебле, D-ветви и в антикодоновой ветви (рис. 1).

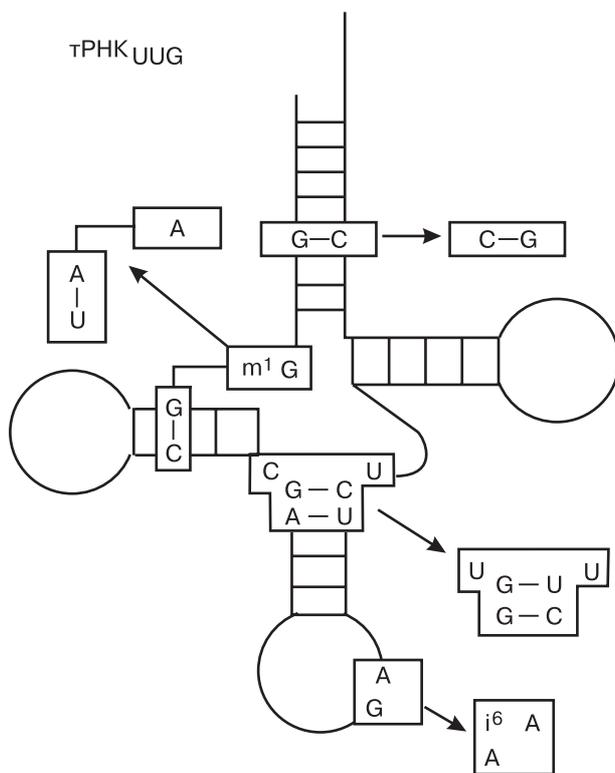


Рис. 1. Возможные сигнальные последовательности митохондриального импорта тРНК<sup>Gln</sup>(UUG) *Tetrahymena thermophila*.

Структура тРНК<sup>Gln</sup>(UUG) показана схемой клеверного листа. Нуклеотиды, различающиеся у импортируемой и неимпортируемых глутаминовых тРНК, выделены. Стрелками указаны соответствующие нуклеотиды неимпортируемых глутаминовых тРНК.

С использованием плазмид, экспрессирующих мутантные варианты тРНК в клетках *T. thermophila*, было показано, что только последовательность нуклеотидов антикодона импортируемой глутаминовой тРНК важна для ее импорта в митохондрии [57]. Антикодон играет роль детерминанты импорта, поскольку любые изменения этой последовательности препятствуют импорту глутаминовой тРНК. Кроме того, антикодон может определять митохондриальную локализацию, так как он способен направлять импорт в митохондрии неимпортируемой глутаминовой тРНК.

Поскольку все три глутаминовые тРНК узнаются как цитоплазматической, так и митохондриальной глутамин-тРНК-синтетазами, авторы предположили наличие дополнительных факторов импорта, определяющих селективность этого процесса. Кроме того, пока остается неизвестным, участвует ли аппарат импорта белков в импорте тРНК.

#### ИМПОРТ тРНК В МИТОХОНДРИИ ТРИПАНОСОМАТИД

Простейшие отряда *Kinetoplastidae* представляют собой крайний случай импорта тРНК, поскольку все митохондриальные тРНК этих организмов импортируются из цитоплазмы [67]. Исследования *in vivo* показали, что подавляющее большинство тРНК у этих организмов обнаруживаются как в цитоплазме, так и в митохондриях. В *Trypanosoma brucei* один и тот же ген может кодировать цитоплазматическую и митохондриальную изоформы тРНК [63], что подтверждено прямым секвенированием тРНК [65]. При этом было показано, что митохондриальная изоформа тРНК<sup>Lys</sup>, тРНК<sup>Leu</sup> и тРНК<sup>Tyr</sup> отличается от цитоплазматической только наличием специфической модификации нуклеотида в 32 положении. Однако тРНК<sup>Tyr</sup>, неспособная модифицироваться, сохраняла способность проникать в митохондрии, следовательно, наличие данной модификации не является необходимым для импорта [66]. Цитоплазматическая и митохондриальная изоформы тРНК<sup>Glu</sup>(UUC) и тРНК<sup>Gln</sup>(UUG) *L. tarentolae* также отличаются друг от друга модификацией нуклеотида в wobble положении антикодона [33]. Цитоплазматическая форма содержит в 34 (wobble) положении 5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридин (mcm5s2U), тогда как митохондриальная изоформа содержит 5-метоксикарбонилметил-2'-о-метилуридин (mcm5Um). При этом в цитоплазме были обнаружены следовые количества (4%) тРНК с 5-метоксикарбонилметилуридином (mcm5U) в первом положении антикодона, что может означать существование общего предшественника цитоплазматической и митохондриальной изоформ. Синтезированный *in vitro* транскрипт тРНК<sup>Glu</sup> импортировался в митохондрии гораздо

эффективнее нативной цитоплазматической тРНК<sup>Glu</sup>. Возможно, специфичное для цитоплазматической изоформы тиреолизирование может оказывать ингибирующее воздействие на импорт данных тРНК.

Недавно опубликованные данные свидетельствуют о том, что в *Trypanosoma brucei* цитоплазматический и митохондриальный пулы тРНК качественно идентичны, за исключением инициаторной тРНК<sup>Met</sup><sub>i</sub>, которая локализована исключительно в цитоплазме [74]. Каким образом обеспечивается подобная селективность локализации тРНК<sup>Met</sup><sub>i</sub> пока не известно. Ни одной тРНК, кодируемой в ядре и локализованной исключительно в митохондриях, обнаружено не было.

В отличие от трипаносом, у лейшманий, в частности у *L. tarentolae*, исключительно цитоплазматическая локализация характерна для тРНК<sup>Gln</sup>(CUG), при этом тРНК<sup>Gln</sup>(UUG) частично проникает в митохондрии [43, 66]. Лима и Симпсон [41] показали, что сигнал импорта содержится в самой структуре тРНК. При сравнении последовательностей нуклеотидов частично импортируемой тРНК<sup>Gln</sup>(UUG) и неимпортируемой тРНК<sup>Gln</sup>(CUG) была обнаружена единичная замена С на U в D-петле и несколько замен в других участках молекулы [66]. По всей видимости, специфическая детерминанта импорта локализована именно в D-петле, поскольку замена D-ветви тРНК<sup>Gln</sup>(CUG) на соответствующий участок эффективно импортирующейся тРНК<sup>Ile</sup>(UAU) придает тРНК<sup>Gln</sup>(CUG) способность проникать в митохондрии. Другая группа исследователей обнаружила в D-петле тРНК<sup>Tyr</sup>(AGU) консервативный мотив (рис. 2), необходимый и достаточный для импорта этой тРНК в митохондрии *in vitro* [47] и *in vivo* [11]. Гомологичные последовательности были найдены в тРНК<sup>Tyr</sup>(GUA) *L. tarentolae* и в четырех других импортируемых тРНК трипаносом, тогда как в неимпортируемой тРНК<sup>Gln</sup>(CUG) этого мотива не обнаружено [46]. Однако нуклеотиды D-ветви, взаимодействуя с нуклеотидами других доменов тРНК, в значительной степени определяют третичную структуру всей молекулы [55]. Поэтому ряд исследователей полагают, что именно третичное взаимодействие нуклеотидов D-ветви имеет ключевое значение для импорта [41, 56]. Возможно, дополнительные элементы, определяющие специфичность импорта, расположены в других частях молекулы. Так, например, вставка четырех нуклеотидов в переменную петлю тРНК<sup>Thr</sup>(AGU) препятствует импорту этой тРНК в митохондрии *L. tarentolae* [14].

Анализ распределения импортируемой тРНК<sup>Tyr</sup> в митохондриях лейшманий показал, что импорт происходит в несколько стадий, причем кинетика транспорта через внутреннюю и внешнюю мембраны различны [51]. Транспорт через внешнюю мембрану — это АТР-зависимый процесс, а транспорт через внутреннюю мембрану зависит от электрохимического потенциала на мембране. На осно-

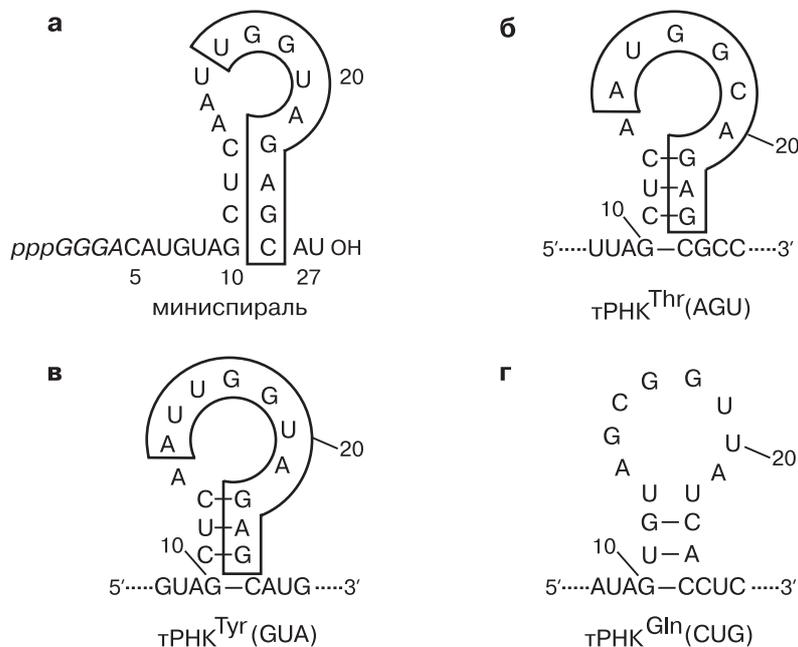


Рис. 2. Структурная гомология D-петель трех тРНК *Leishmania*. Консервативные мотивы выделены.

вании полученных данных была высказана гипотеза о существовании различных рецепторов на внешней и внутренней митохондриальных мембранах (рис. 3). Импортируемая тРНК взаимодействует с белковым рецептором на внешней митохондриальной мембране [45]. Этот белок был выделен и охарактеризован как 15кДа РНК-связывающий ТАВ белок (от англ. Tubulin Antisense Binding protein) [3]. При помощи антител к ТАВ белку было показано, что он взаимодействует с импортируемой тРНК<sup>Tyr</sup>, но не взаимодействует с тРНК<sup>Gln</sup>, которая локализована исключительно в цитоплазме [46], таким образом взаимодействие тРНК с ТАВ определяет специфичность импорта. Про рецептор на внутренней митохондриальной мембране пока ничего не известно.

Исследуя механизм импорта в митохондрии мини-спирали, представляющей собой D-петлю тРНК<sup>Tyr</sup>(GUA), индийские ученые высказали предположение о том, что для взаимодействия с рецептором на внешней митохондриальной мембране необходимо наличие консенсусной последовательности, тогда как для узнавания рецептора на внутренней митохондриальной мембране важна, по всей видимости, определенная вторичная структура [11].

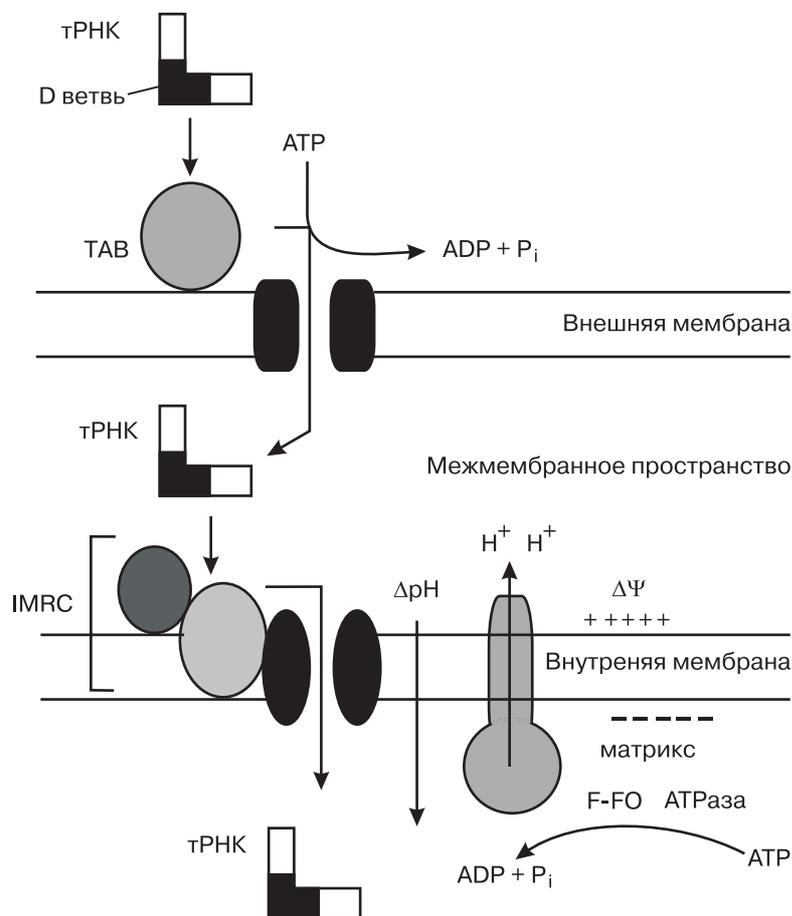


Рис. 3. Гипотетическая схема импорта тРНК через две митохондриальные мембраны лейшманий [11].

TAB – рецептор на внешней митохондриальной мембране, узнает консервативный мотив в D-петле импортируемой тРНК.

IMRC – рецепторный комплекс внутренней мембраны.

Для выявления последовательностей, узнаваемых рецепторами на мембранах митохондрий, был применен метод SELEX [10]. При помощи этого метода было показано, что роль сигналов импорта могут играть несколько консенсусных последовательностей, распределенных по всей длине тРНК. Помимо консервативного мотива

YAGAGY в D-петле, необходимого для импорта в митохондрии, был выявлен мотив  $UG_{3-4}U$  в районе V-петли и T-ветви (например, в тРНК<sup>Le</sup>), что соответствует данным, полученным ранее другими группами исследователей [14]. Третий мотив был локализован в антикодоновой ветви.

Исследуя импорт 16-членных фрагментов, полученных в ходе SELEX, и целых молекул тРНК, группа индийских ученых впервые обнаружила, что взаимодействие различных РНК может оказывать положительное и отрицательное влияние на их импорт в митохондрии [10]. Было показано, что РНК, способные эффективно проникать в изолированные митохондрии, могут стимулировать импорт в митохондрии других РНК, тогда как слабо импортируемые *in vitro* РНК могут оказывать негативный, ингибирующий эффект. Так, например, тРНК<sup>Tyr</sup> стимулирует проникновение в митохондрии тРНК<sup>Le</sup>, которая в свою очередь ингибирует импорт тРНК<sup>Tyr</sup>. На основании полученных результатов была выдвинута гипотеза сбалансированного импорта тРНК в митохондрии лейшманий, согласно которой эффективность импорта различных тРНК *in vivo* оказывается приблизительно одинаковой за счет взаимодействия молекул тРНК друг с другом.

В отличие от лейшманий, требования к импортируемому субстрату у трипаносом неизвестны. В митохондрии лейшманий импортируются зрелые, полностью процессированные молекулы тРНК [56, 34], но для трипаносом данные несколько противоречивые.

Единственная тРНК *T. brucei*, содержащая интрон — это тРНК<sup>Tyr</sup> [64]. Вставка двух нуклеотидов в область экзона и двух нуклеотидов в область интрона полностью блокирует сплайсинг этой тРНК. Несмотря на то, что мутантная тирозиновая тРНК сохраняет интрон (11 нуклеотидов) и не аминокислотизируется, она может проникать в митохондрии [63]; следовательно, структура антикодоновой петли не оказывает влияния на импорт.

Для *T. brucei* было показано, что возможен импорт гетерологичных тРНК, не зависящий от их геномного контекста [30]. Например, дрожжевая тРНК<sup>His</sup> импортировалась в митохондрии *T. brucei* в контексте 5'-фланкирующего участка трипаносомного гена тРНК<sup>Tyr</sup>, так же как и в собственном геномном контексте [61]. 3'-Фланкирующая область также не оказывает влияния на импорт. На этом основании было высказано предположение о том, что в митохондрии трипаносом импортируются зрелые тРНК, а сигнал импорта находится в самой структуре тРНК. В пользу этой гипотезы свидетельствуют и данные о том, что любая тРНК, экспрессирующаяся в *T. brucei*, частично импортируется в митохондрии, за исключением инициаторной тРНК [28].

Однако другая группа ученых показала, что для импорта тРНК в митохондрии, наоборот, важны 5'-фланкирующие последовательности [29]. Было показано, что некоторые тРНК, в частности тРНК<sup>Ser</sup>(CGA) и тРНК<sup>Leu</sup>(CAA), синтезируются в *T. brucei* в виде дицистронного транскрипта с 59-ю нуклеотидным спейсером [39]. С использованием системы импорта тРНК в изолированные митохондрии было показано, что только такой дицистронный транскрипт проникает в митохондрии *T. brucei*, тогда как зрелые тРНК не импортируются [79]. Интересно, что импортируемый дицистронный транскрипт не процессировался в митохондриях, несмотря на то, что в митохондриях *T. brucei* была обнаружена РНКазы Р-подобная активность [59]. Попытка воспроизведения этого эксперимента в условиях *in vivo* показала, что тРНК<sup>Leu</sup>(CAA) импортируется в митохондрии вне зависимости от геномного контекста [73], подтверждая гипотезу о том, что в митохондриях *T. brucei* импортируются зрелые, полностью процессированные молекулы. Возможно, причина данных противоречий заключается в том, что разные группы исследователей использовали разные линии трипаносом, а, как известно, получаемые результаты во многом зависят от способа выделения митохондрий.

По мнению разных групп исследователей для импорта тРНК в митохондрии трипаносом необходимо присутствие АТР внутри и снаружи митохондрий и наличие белковых компонентов на их поверхности. Согласно данным большинства лабораторий, для импорта тРНК в митохондрии трипаносоматид цитоплазматические факторы не требуются.

Поскольку инициаторная тРНК<sup>Met</sup> в митохондрии *T. brucei* не импортируется, элонгаторная тРНК<sup>Met</sup>, проникающая в митохондрии, частично формируется, обеспечивая инициацию митохондриального биосинтеза белка [73]. Митохондриальный геном трипаносоматид не содержит генов тРНК, поэтому предполагается, что тРНК, импортируемые из цитоплазмы, должны принимать участие в митохондриальном биосинтезе белка. Цитоплазматическая и митохондриальная системы биосинтеза белка различаются, поэтому ряд импортируемых тРНК подвергается в митохондриях некоторым модификациям. Так, в митохондриях *L. tarentolae* наблюдается редактирование С в первом положении антикодона тРНК<sup>Trp</sup> на U [7]. Такая модификация позволяет тРНК<sup>Trp</sup> считывать кодон UGA, кодирующий триптофан в митохондриальной ДНК. При помощи репортерного гена было доказано отсутствие UGA супрессорной тРНК в цитоплазме, что свидетельствует в пользу митохондриальной локализации этапа редактирования. Помимо этого, тРНК<sup>Trp</sup> подвергается в митохондриях значительным модификациям, в том числе происходит

тиолирование U в положении 33, который во всех известных тРНК немодифицирован [16].

Импорт тРНК в митохондрии наблюдается и у других представителей простейших. Так, в митохондриальной ДНК *Paramecium* [53] и ДНК водоросли *Chlamydomonas* [27] закодированы некоторые тРНК, которых явно недостаточно для биосинтеза белка. В митохондриальном геноме *Chlamydomonas reinhardtii* закодированы только три тРНК, следовательно для митохондриальной трансляции этому организму необходимо импортировать из цитоплазмы, по меньшей мере, 20 тРНК.

### III. ИМПОРТ тРНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

Несмотря на то, что митохондриальный геном высших растений имеет значительные размеры (от 200 до 2000 т.п.н.), он не содержит полного набора генов тРНК, необходимых для трансляции [19]. В среднем, митохондриальные геномы высших растений кодируют только 10–12 «собственно митохондриальных» тРНК [18]. Некоторые недостающие гены в процессе эволюции были заменены функциональными генами тРНК, кодируемыми фрагментами хлоропластной ДНК, встроившимися в митохондриальный геном. Некоторые митохондриальные тРНК становятся функциональными только в результате процесса редактирования. По всей видимости, остальные тРНК кодируются ядерной ДНК и импортируются из цитоплазмы [18, 38].

Сравнение числа и специфичности импортируемых в митохондрии растений тРНК позволило нарисовать эволюционную картину возникновения процесса импорта. По-видимому, импорт каждой тРНК возникал независимо у различных видов высших растений, при этом у древних растений феномен импорта отсутствовал, а в ходе эволюции число импортируемых в митохондрии тРНК увеличивалось [38].

Анализ полной последовательности митохондриального генома печеночника *Marchantia polymorpha* позволил предположить, что в митохондрии этого организма из цитоплазмы импортируются только две недостающие тРНК, поскольку остальные 27 закодированы в митохондриальном геноме [19]. Вскоре импорт из цитоплазмы недостающих тРНК<sup>Ile</sup>(AAU) и тРНК<sup>Thr</sup>(AGU) был подтвержден [5, 4]. Однако оказалось, что, помимо этих двух тРНК, в митохондрии *M. polymorpha* импортируются две тРНК<sup>Val</sup>(AAC), и это при том, что кодируемая митохондриальным геномом тРНК<sup>Val</sup>(UAC) способна считывать все валиновые кодоны [6].

Число и аминокислотная специфичность импортируемых в митохондрии растений тРНК значительно варьирует [19]. Так, в митохонд-

рии пшеницы импортируется 14 тРНК [26], в митохондрии картофеля – 11 тРНК [47], а в митохондрии *Phaseolus vulgaris* – 8 тРНК [54]. Состав импортируемых тРНК отличается даже у близкородственных видов растений. Например, в митохондрии пшеницы, в отличие от митохондрий кукурузы, импортируется гистидиновая тРНК [38].

Первое прямое подтверждение импорта тРНК из цитоплазмы в митохондрии растений было получено в результате экспериментов с трансгенными растениями картофеля. В растениях картофеля, несущих ген тРНК<sup>Leu</sup>(C\*AA) из ядерной ДНК гороха, гетерологичная тРНК гороха обнаруживалась как в цитоплазме, так и в митохондриях. Собственная лейциновая тРНК картофеля в матрикс митохондрий не переносилась. Транскрипт гена тРНК гороха импортировался даже в случае, когда в антикодоновую петлю были вставлены дополнительные 4 нуклеотида [68].

Механизм импорта тРНК в митохондрии растений пока остается загадкой. Высказывается ряд предположений о возможных механизмах этого процесса (рис. 4).

Прямое секвенирование ряда митохондриальных изоформ тРНК показало, что они отличаются от цитоплазматических наличием спе-

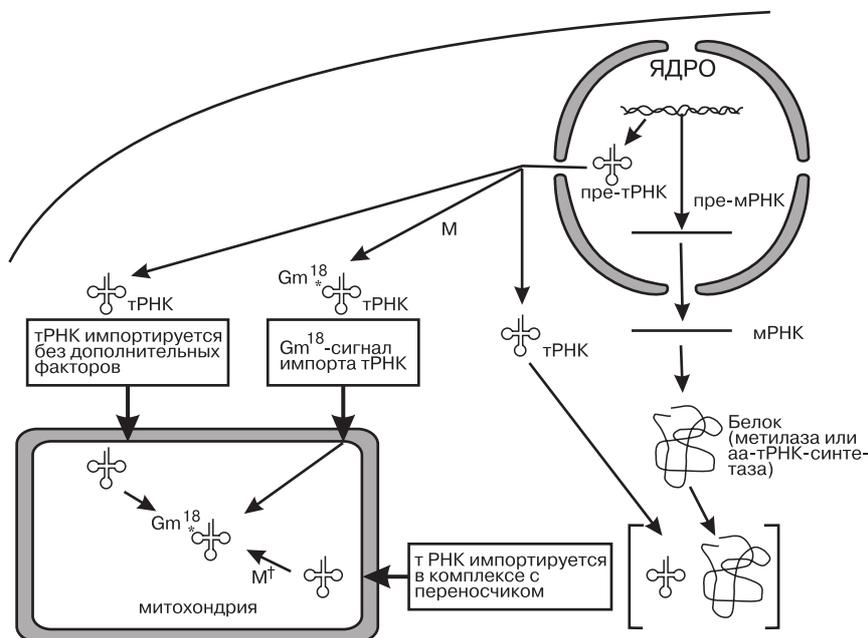


Рис. 4. Возможные механизмы импорта тРНК в митохондрии растений [19].

цифической модификации G в 18 положении [19]. В митохондриях растений была обнаружена специфичная тРНК метилаза. Однако является ли метилирование специфическим сигналом для импорта или оно происходит уже в митохондриях, неизвестно. Было даже высказано предположение, что метилаза, возможно, играет роль переносчика тРНК в митохондрии [54].

Сравнение ряда последовательностей импортируемых тРНК гороха не позволило выявить каких-либо консенсусных последовательностей в первичной или во вторичной структуре тРНК и фланкирующих последовательностей. По всей видимости, каждая импортируемая тРНК узнается специфическим фактором [18]. Вряд ли для каждой тРНК существует отдельный канал импорта, скорее можно предположить наличие специфического белкового фактора, взаимодействующего с тРНК. На роль такого фактора идеально подходят аминоксил-тРНК-синтетазы. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что замена U70 в тРНК<sup>Ala</sup> *Arabidopsis thaliana* на C70, препятствующая аминокислотированию такой тРНК аланил-тРНК-синтетазой, блокирует также и импорт данной тРНК *in vivo* [17]. Однако одной аминоксил-тРНК-синтетазы для обеспечения импорта недостаточно, поскольку при одновременной экспрессии тРНК<sup>Ala</sup> и митохондриальной аланил-тРНК-синтетазы *A. thaliana* в дрожжах *S. cerevisiae* в митохондриях последних обнаруживается только синтетаза, но не тРНК [50]. Авторы предполагают наличие, по крайней мере, еще одного фактора импорта.

Импорт тРНК, вероятно, возможен не только в митохондрии, но и в пластиды. В ДНК пластид паразитического нефотосинтезирующего растения *Epifagus virginia* содержится только 17 генов тРНК, в то время как в пластидах обнаружено 30 тРНК. Предполагается, что недостающие тРНК поступают в пластиды из цитоплазмы [42].

#### IV. ИМПОРТ тРНК В МИТОХОНДРИИ ДРОЖЖЕЙ

Митохондриальный геном дрожжей кодирует полный набор тРНК, необходимых для трансляции. Однако помимо них, в митохондриях присутствует одна тРНК, не гибридирующая с митохондриальной ДНК. Эта закодированная в ядре тРНК<sup>Lys</sup>CUU далее обозначается как тРНК1 [48]. Большая часть тРНК1 (>95%) локализована в цитоплазме, однако некоторое количество молекул (<5%) проникает из цитоплазмы в митохондрии [24]. Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* содержат еще две изоакцепторные лизиновые тРНК: цитоплазматическую тРНК с антикодоном mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>UUU (далее тРНК2) и митохондриальную тРНК с антикодоном cmnm<sup>5</sup>UUU (обоз-

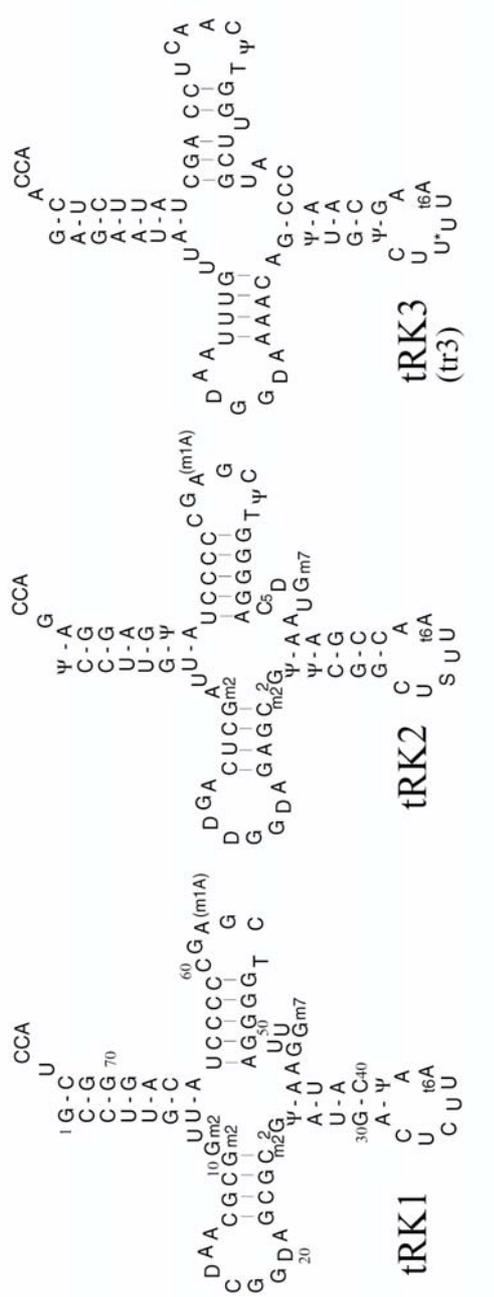


Рис. 5. Вторичная структура трех лизиновых тРНК дрожжей.

tRK1 – цитоплазматическая импортируемая лизиновая тРНК<sub>CUU</sub>; tRK2 – цитоплазматическая неимпортируемая тРНК<sub>SUU</sub>; tRK3 – митохондриальная лизиновая тРНК<sub>U\*UU</sub> [48, 1]. S= mmm<sup>5,2</sup>U, U\*= smm<sup>5</sup>U.

начается далее как тРНК3) (рис. 5). тРНК2 кодируется ядерной ДНК, но в митохондрии не импортируется, а тРНК3 закодирована в митохондриальном геноме и локализована исключительно в органелле.

Поскольку в митохондрии дрожжей импортируется только одна лизинная тРНК, этот объект является удобной экспериментальной моделью. С использованием разработанных в нашей лаборатории систем импорта тРНК в митохондрии *in vitro* [77] и *in vivo* [22] было показано, что биохимические и энергетические параметры импорта тРНК напоминают соответствующие условия импорта белков в дрожжевые митохондрии. Для импорта тРНК1 необходимо наличие АТФ, разность потенциалов ( $\Delta\Psi$ ) на митохондриальных мембранах, а также растворимые цитоплазматические белки и белки, ассоциированные с внешней митохондриальной мембраной. Удаление экспонированных на поверхности митохондрий белков предварительной мягкой обработкой протеиназами (эластазой, протеиназой К или трипсином) ингибирует импорт тРНК, что подтверждает участие белковых рецепторов в этом процессе. Анализ дрожжей с делециями генов, кодирующих рецепторы транслоказ внешней и внутренней митохондриальных мембран, показал, что по всей вероятности, импорт тРНК и белков происходит по одинаковому пути [75]. Для транспорта тРНК1 в митохондрии необходим рецептор внешней митохондриальной мембраны Tom20, узнающий N-концевые и внутренние сигнальные последовательности импортируемых в митохондрии белков [52], тогда как рецептор Tom70, отвечающий за узнавание внутренних сигнальных последовательностей гидрофобных белков, в процессе импорта тРНК не участвует. Удаление белка Tim44 — одного из важнейших компонентов транслоказы внутренней мембраны, обеспечивающей импорт в митохондриальный матрикс белков с N-концевыми сигнальными последовательностями [52], также препятствовало импорту тРНК1 в митохондрии. На основании полученных результатов было высказано предположение о том, что тРНК импортируется в митохондрии по каналам белкового импорта, либо сама по себе, либо в комплексе с предшественником белка, импортируемого в митохондрии.

Известно, что при низкой концентрации АТФ с одновременным снятием электрического потенциала на внутренней митохондриальной мембране предшественники белков «застревают» в транслокационном аппарате [69]. Оказалось, что импорт тРНК в таких условиях также прекращается. По всей видимости, тРНК импортируется в митохондрии в комплексе с белком, который «застревает» в транслокационной поре [75].

Для импорта тРНК1 в изолированные митохондрии требуются растворимые цитоплазматические белковые факторы. Логично предположить, что они необходимы либо для транспортировки тРНК к поверхности митохондрии, либо непосредственно для ее переноса через мембрану. Два цитоплазматических белковых фактора были идентифицированы. Это цитоплазматическая лизил-тРНК-синтетаза (далее KRS) и предшественник митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (далее пре-MSK) [76].

Цитоплазматическая лизил-тРНК-синтетаза является необходимым фактором для транспортировки деацилированной тРНК1 в митохондрии. Антитела к этому белку препятствуют переносу деацилированной формы, но при этом они не мешают транспорту аминоацилированной формы тРНК1. Кроме того, способность различных мутантных версий KRS направлять импорт тРНК1 в митохондрии коррелирует с их способностью к аминоацилированию. Вероятно, основная роль KRS заключается в аминоацилировании тРНК1, которая не может импортироваться в деацилированной форме [76].

Пре-MSK необходим для импорта как деацилированной, так и аминоацилированной форм тРНК1. При этом удаление сигнальной последовательности из предшественника приводит к прекращению импорта как пре-MSK, так и тРНК1. Несмотря на то, что пре-MSK не аминоацилирует тРНК1, он образует стабильный комплекс с аминоацилированной тРНК1.

На основании полученных данных была предложена модель импорта тРНК1 в митохондрии (рис. 6). KRS аминоацилирует тРНК1, которая затем взаимодействует с пре-MSK с образованием РНП-комплекса, в состав которого входят, возможно, и другие белки. После диссоциации KRS РНП-комплекс транслоцируется через митохондриальную мембрану [76].

Какие факторы определяют селективность импорта одной из двух цитоплазматических лизиновых тРНК пока до конца не ясно. Последовательности тРНК1 и тРНК2 отличаются по 21 положению. Отличающиеся нуклеотиды расположены в аминокцепторном стебле, D-ветви, антикодоновой ветви и в варибельной петле. Поскольку в митохондрии импортируется только тРНК1, было высказано предположение, что один или несколько отличающихся нуклеотидов могут играть роль детерминант импорта. Анализ химерных молекул импортируемой тРНК1, содержащих фрагменты последовательности неимпортируемой тРНК2, показал, что отличающиеся нуклеотиды в районе D- и V-петель не оказывают значительного влияния на специфичность импорта тРНК1 [22]. Основные детерминанты импорта расположены в аминокцепторном стебле (первая пара G1—C72) [35] и в

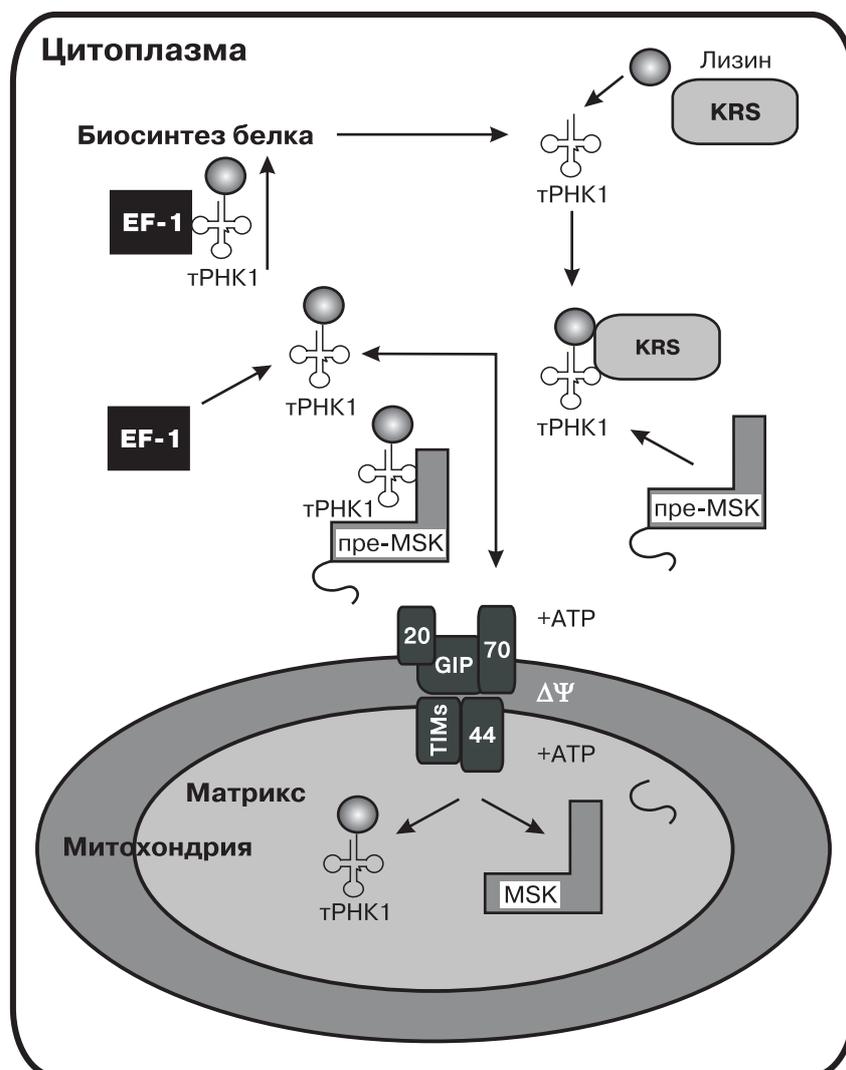


Рис. 6. Модель взаимодействия тРНК1 с белками в процессе ее импорта в митохондрии дрожжей [76].

тРНК1 – импортируемая в митохондрии лизиновая тРНК; KRS – цитоплазматическая лизил-тРНК-синтетаза дрожжей; пре-MSK – предшественник митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы дрожжей; GIP, «General insertion pore» – транслоказа внешней митохондриальной мембраны. TIMs – компоненты транслоказы внутренней митохондриальной мембраны.

антикодоновой петле (С в положении 34) [22]. Замена U34 на C34 в антикодоне тРНК2 придавала полученному транскрипту способность импортироваться в изолированные митохондрии дрожжей. Однако следует отметить, что лишенный посттранскрипционных модификаций Т7-транскрипт тРНК2 с антикодоном UUU и сам был способен проникать в изолированные митохондрии дрожжей, хотя и с малой эффективностью. По всей видимости, гипермодифицированный уридин (mnm5s2 U) в положении 34 тРНК2 может играть роль антидетерминанты импорта, запрещающей транспорт тРНК2 в митохондрии. Похожий эффект имеет замена С в «wobble» положении антикодона тРНК1 на G. Т7-транскрипт тРНК1 с антикодоном GUU теряет способность взаимодействовать с пре-MSK и проникать в митохондрии [36]. Остальные однонуклеотидные замены в положениях 34, 35 и 36 антикодона на способность транскриптов импортироваться в митохондрии значительного влияния не оказывали. В результате исследования данной серии мутантных транскриптов мы обнаружили, что взаимодействие с пре-MSK строго необходимо для импорта транскриптов, тогда как взаимодействие с KRS — нет. Оказалось, что некоторые молекулы тРНК могут взаимодействовать с пре-MSK в деацелированной форме. В отличие от транскрипта тРНК1, транскрипты с антикодонами CGU и CUG связывались с пре-MSK в деацелированной форме, при этом эффективность импорта всех трех была примерно одинакова. Мы предполагаем, что некоторые мутации в области антикодона могут вызывать конформационные изменения молекулы тРНК, аналогичные изменениям, обусловленным взаимодействием тРНК с KRS.

Помимо специфических нуклеотидных детерминант для импорта тРНК1 в митохондрии важна также ее пространственная структура, поскольку ряд мутаций, нарушающих L-форму тРНК, негативно сказывались на способности таких транскриптов импортироваться в митохондрии [22]. Подтверждение этой гипотезы было получено при исследовании импорта транскрипта тРНК1, состоящего из двух фрагментов — длинного 3'-концевого (48 оснований) и короткого — 5'-концевого (28 оснований), образующих в результате гибридизации нормальную молекулу тРНК. Оказалось, что 3'-концевой фрагмент тРНК1 способен направлять импорт в митохондрии 5'-концевого фрагмента, который сам по себе не импортировался. Таким образом, молекула тРНК1 проникает в митохондрии, сохраняя вторичную, а возможно, и третичную структуру.

Роль импортируемой тРНК в митохондриях до сих пор не ясна. Модифицированный уридин в «wobble» положении антикодона тРНК3 позволяет ей узнавать А и G в третьем положении лизиновых кодонов

AAA и AAG, иными словами, теоретически, тРНК3 достаточна для обеспечения митохондриального биосинтеза белка [49]. Первоначально предполагалось, что импортируемая тРНК1 не принимает участия в митохондриальном биосинтезе белка, поскольку она не аминоацилируется митохондриальной лизил-тРНК-синтетазой [48], а выполняет какую-либо иную функцию. Так, например, при анализе последовательностей РНК [2] была обнаружена частичная комплементарность последовательностей лизиновой тРНК1 и участков премРНК, имеющих ключевое значение для сплайсинга, на основании чего было высказано предположение об участии тРНК1 в сплайсинге митохондриальных транскриптов у дрожжей. Согласно другой гипотезе, тРНК1 может принимать участие в обратной транскрипции или репликации ДНК в митохондриях [48]. Однако, после того как было показано, что тРНК1 импортируется в митохондрии в аминоацилированной форме [22], мы не можем исключить вероятность ее участия в митохондриальном биосинтезе белка.

Доказать непосредственное участие тРНК1, аминоацилируемой лизином, в митохондриальном биосинтезе белка оказалось технически сложно, поэтому были получены производные тРНК1, способные аминоацилироваться метионином и аланином. Изменив антикодон тРНК1 с CUU на CAU, мы получили молекулу тРНК, способную аминоацилироваться метионином (поскольку антикодон является основным элементом узнавания для метионил-тРНК-синтетазы [9]) и способную проникать в митохондрии дрожжей (поскольку сохранились основные нуклеотидные детерминанты импорта: пара G1: C72 и C34). Импортируя аминоацилированные <sup>35</sup>S-метионином транскрипты, мы зафиксировали хлорамфеникол-чувствительное включение метки в митохондриальные белки [37].

Для проверки нашей гипотезы в условиях *in vivo*, мы использовали полученную нами ранее молекулу тРНК1 с антикодоном CUA, комплементарным амбер кодону. На основе этой молекулы за счет внесения элементов узнавания для аланил-тРНК-синтетазы дрожжей (пары G3—U70 [31]) была получена супрессорная тРНК, которая экспрессировалась в клетках дрожжей и импортировалась в митохондрии. Экспрессия данной тРНК в штамме дрожжей, несущих амбер мутацию в одном из генов митохондриальной ДНК, приводила к восстановлению дыхательной активности дрожжей данного штамма и к появлению полноразмерного продукта гена, несущего нонсенс-мутацию [37].

Таким образом, мы показали, что импортируемая тРНК, проникнув в митохондрии, принимает участие в митохондриальном биосинтезе белка как *in vitro*, так и *in vivo*. На основании полученных нами

данных нельзя утверждать, что именно тРНК1 участвует в биосинтезе белка в митохондриях, однако это представляется весьма вероятным. Если это действительно так, то, участвуя в митохондриальной трансляции, тРНК1 может «замещать» собственную митохондриальную лизиновую тРНК, которая, например, менее стабильна при повышенных температурах. Ведь концентрация тРНК1 в органелле сравнима с концентрацией других тРНК, кодируемых митохондриальной ДНК. Кроме того, тРНК1 может обеспечивать более эффективное узнавание редких AAG кодонов.

## V. ИМПОРТ тРНК В МИТОХОНДРИИ ЖИВОТНЫХ

Поскольку в митохондриальном геноме позвоночных закодированы все тРНК, необходимые для трансляции [8], считается, что у этих организмов тРНК не импортируется в митохондрии. Единственный пример такого импорта найден у сумчатых млекопитающих [21]. На основании сравнения последовательности митохондриального гена, кодирующего лизиновую тРНК у 11 представителей рода сумчатых, исследователи пришли к заключению, что этот ген не кодирует функциональную тРНК [32]. Поскольку дополнительных генов митохондриальной лизиновой тРНК не обнаружено ни в митохондриальном геноме, ни в ядерном, остается предположить, что функциональные лизиновые тРНК в митохондриях сумчатых образуются либо за счет редактирования, либо импортируются из цитоплазмы. РНК-редактирование достаточно широко распространено в митохондриях простейших [7], растений [25] и животных [12]. Однако в случае лизиновой тРНК сумчатых было показано, что ее транскрипты не подвергаются редактированию, а единственной функциональной лизиновой тРНК, ассоциированной с митохондриями, оказалась тРНК<sup>Lys</sup>, кодируемая в ядре.

В митохондрии млекопитающих импортируются другие виды малых РНК. Это РНК компонент РНКазы MRP – сайт-специфической эндорибонуклеазы, участвующей в расщеплении РНК-затравки в ходе репликации митохондриальной ДНК [13, 40], а также РНК компонент РНКазы Р – эндорибонуклеазы, участвующей в процессинге 5'-конца тРНК [20]. В обоих случаях РНК являются компонентами РНП комплексов, белковая часть которых также закодирована в ядре и импортируется из цитоплазмы. Механизм импорта этих РНК пока не известен. Возможно, они импортируются в комплексе с белками, однако пока не получено прямых доказательств этой гипотезы.

Не так давно появились свидетельства в пользу того, что в митохондрии млекопитающих импортируется 5S рибосомальная РНК

[23]. Эта малая рибосомальная РНК не кодируется митохондриальным геномом млекопитающих [8], однако она обнаруживается в митохондриях быка и митопластах (митохондриях, лишенных внешней мембраны), обработанных РНКазами [80]. Встраивание в ядерный ген 5S рРНК маркерной последовательности не препятствует импорту такой молекулы, что позволило обнаружить мутантную 5S рРНК во фракции очищенных митопластов из клеток человека [44].

Функция 5S рРНК в митохондриях млекопитающих пока остается неясной. У растений, водорослей и некоторых простейших 5S рРНК входит в состав митохондриальных рибосом, а у дрожжей и млекопитающих в составе митоторибосом 5S рРНК не обнаружены. Однако выделенные из клеток млекопитающих митоторибосомы не транслировали природные мРНК *in vitro*, а лишь направляли синтез полифенилаланина с poly(U)-матрицы. Таким образом, вопрос о том, являются ли 5S рРНК компонентами митохондриальных рибосом, потерявшимися в ходе очистки, или они выполняют в митохондриях какую-то иную функцию, остается открытым.

Эффективность импорта 5S рРНК в изолированные митохондрии клеток человека сравнима с эффективностью импорта 5S рРНК в митохондрии *in vivo* [23]. Этот процесс зависит от наличия АТФ, трансмембранного электрохимического потенциала и обеспечивается растворимыми цитоплазматическими белками. Кроме того было показано, что в импорте 5S рРНК принимает участие аппарат импорта белков. Для этого был получен неразворачивающийся (за счет дисульфидных связей) белок, который блокировал поры в митохондриальных мембранах. В результате прекращался не только импорт предшественников митохондриальных белков, но и импорт 5S рРНК.

Условия импорта 5S рРНК в митохондрии человека напоминают условия импорта тРНК в митохондрии дрожжей. Поэтому мы решили проверить, способна ли дрожжевая тРНК проникать в митохондрии человека. Оказалось, что дрожжевая тРНК1 импортируется в изолированные митохондрии клеток человека как в присутствии дрожжевых белковых факторов, так и в присутствии белкового экстракта из клеток человека. Следовательно, в клетках человека содержатся все белковые факторы, необходимые для обеспечения этого процесса [23]. При этом выяснилось, что импорт 5S рРНК и тРНК1 обеспечивается различными белковыми факторами.

В дрожжевом экстракте были идентифицированы два белковых фактора импорта тРНК1: KRS и пре-MSK. Мы показали, что в импорте тРНК1 в изолированные митохондрии человека также участвуют эти белки или их аналоги из клеток человека. Так, для импорта деацелированной формы тРНК1 в митохондрии человека необходимо ее пред-

варительное взаимодействие с цитоплазматической аминоацил-тРНК-синтетазой из клеток человека или с дрожжевой KRS, тогда как предварительно аминоацелированная молекула такого взаимодействия не требует. По всей видимости, так же как и в дрожжах, тРНК1 импортируется в митохондрии в аминоацелированной форме, при этом синтетаза из клеток человека успешно заменяет дрожжевой фермент. Добавление к изолированным митохондриям человека дрожжевого пре-MSK также способствовало импорту в митохондрии тРНК1. При помощи антител к пре-MSK в экстракте белков из клеток человека был обнаружен полипептид, соответствующий митохондриальной лизил-тРНК-синтетазе человека. Добавление к белковому экстракту из клеток человека антител к пре-MSK приводит к прекращению импорта тРНК1 в митохондрии человека. На основании этих данных мы пришли к заключению, что в импорте тРНК1 принимает участие предшественник митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы человека.

В то же время добавление антител к пре-MSK в белковый экстракт из клеток человека никак не отражалось на его способности направлять импорт 5S рРНК в изолированные митохондрии человека, то есть импорт 5S рРНК не зависит от присутствия пре-MSK или его аналога. При дифференциальном высаливании сульфатом аммония нам удалось разделить факторы, направляющие импорт 5S рРНК и тРНК1, однако конкретные белки пока не охарактеризованы.

Помимо тРНК1, в митохондрии человека проникают и некоторые производные дрожжевых лизиновых тРНК, в частности версия тРНК1 с антикодоном CAU. Инкубируя митохондрии человека с этой тРНК, аминоацелированной 35S-метионином, мы зафиксировали включение меченой аминокислоты в митохондриальные белки [37]. Иными словами, производная дрожжевой тРНК, проникая в митохондрии клеток человека, может принимать участие в митохондриальном биосинтезе белка. В общем, специфичность импорта тРНК в митохондрии человека сохраняется такой же, как и в клетках дрожжей [36], то есть тРНК, импортирующиеся в дрожжевые митохондрии, способны проникать в митохондрии человека, а неимпортируемые тРНК не импортируются и в митохондрии человека.

Интересно отметить, что транскрипты митохондриальных лизиновых тРНК дрожжей и человека могут проникать в изолированные митохондрии человека [23]. При этом импорт дрожжевой тРНК направлялся как дрожжевыми белками, так и белковым экстрактом из клеток человека, а импорт митохондриальной лизиновой тРНК человека направлялся исключительно белками из клеток человека.

Таким образом, нами продемонстрирована возможность импорта различных тРНК в изолированные митохондрии клеток человека.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Явление импорта тРНК в митохондри достаточно часто встречается у различных групп организмов. При этом механизмы транспорта тРНК через двойную митохондриальную мембрану и количество импортируемых тРНК значительно варьируют у разных организмов и не всегда коррелируют с их положением на филогенетическом древе [62]. По всей видимости, природа создала две стратегии, обеспечивающие селективность импорта тРНК в митохондри. Первая стратегия основана на принципе антидетерминации. Так, тРНК, не проникающие в митохондри, несут какой-либо сигнал, обуславливающий их строго цитоплазматическую локализацию. Таким сигналом может быть гипермодифицированный уридин в тРНК<sup>Glu</sup>(UUC) и в тРНК<sup>Gln</sup>(UUG) у трипаносоматид [33] или в тРНК<sub>2</sub> дрожжей [22]. Вторая стратегия использует противоположный механизм, когда тРНК несет какой-либо сигнал, обуславливающий ее импорт в митохондри. Как правило, селективность в данном случае обеспечивается на стадии взаимодействия тРНК с растворимым белковым фактором импорта. Чаще всего такими факторами являются аминоксил-тРНК-синтетазы [17, 77]. Идея об их участии в импорте тРНК впервые была высказана японскими исследователями более 30 лет назад [70]. В основе этого предположения лежит тот факт, что аминоксил-тРНК-синтетазы обладают высоким сродством к индивидуальным тРНК. Кроме того, все митохондриальные аминоксил-тРНК-синтетазы импортируются в органеллы из цитоплазмы. Однако факторы, обуславливающие специфичность процесса импорта, пока мало изучены. По-видимому они сохраняются и в организмах, в митохондри которых тРНК не импортируются. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что в митохондри клеток человека могут проникать дрожжевые импортируемые тРНК.

Создание искусственной системы импорта тРНК в митохондри человека представляет не только фундаментальный интерес, но и прикладной. Известно, что ряд наследственных заболеваний человека, поражающих в первую очередь мышечные и нервные ткани, обусловлен мутациями в митохондриальном геноме — точечными мутациями или делециями в структурных генах мтДНК, мутациями в генах рРНК или точечными мутациями в генах тРНК [78]. (Подробнее см. Интернет-сайт MITOMAP: <http://www.gen.emory.edu/cgi-bin/MITOMAP/bin/tbl9gen.pl>). Большая часть подобных заболеваний обусловлена точечными мутациями в генах тРНК. Среди них чаще всего встречаются синдром MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) и синдром MERRF (myoclonic epilepsy and ragged-red fibers).

В настоящее время не существует каких-либо эффективных подходов к лечению заболеваний, вызванных мутациями в митохондриальной ДНК. В большинстве случаев лечение направлено на компенсацию последствий, а не на исправление исходного дефекта митохондриальной ДНК. Создание искусственной системы импорта тРНК в митохондрии клеток человека является важным этапом в разработке подходов к лечению таких заболеваний и представляет собой один из возможных способов доставки генетического материала в митохондрии. Импортируемая тРНК может замещать нефункциональную митохондриальную тРНК или супрессировать нонсенс-мутацию в митохондриальной ДНК. Кроме того, можно использовать импортируемую РНК (в частности 5S рРНК) в качестве вектора для доставки в митохондрии антисмысловой РНК или РНК, препятствующей репликации дефектной митохондриальной ДНК.

В настоящее время в нашей лаборатории в сотрудничестве с французскими и английскими коллегами ведутся работы по созданию и оптимизации таких систем.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мартен Р.П., Дирхаммер Г. (1983) Молекулярная биология, **17**, 1117–1125.
2. Сойдла Т.Р., Голованов Е.И. (1984) Молекулярная биология, **18**, 277–285.
3. Adhya, S., Ghosh, T., Das, A., Bera, S.K., Mahapatra, S. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 21396–402.
4. Akashi, K., Hirayama, J., Takenaka, M., Yamaoka, S., Suyama, Y., Fukuzawa, H., Ohyama, K. (1997) Biochim. Biophys. Acta, **1350**, 262–266.
5. Akashi, K., Sakurai, K., Hirayama, J., Fukuzawa, H., Ohyama, K. (1996) Curr. Genet. **30**, 181–185.
6. Akashi, K., Takenaka, M., Yamaoka, S., Suyama, Y., Fukuzawa, H., Ohyama, K. (1998) Nucleic Acids Res., **26**, 2168–2172.
7. Alfonzo, J.D., Blanc, V., Estevez, A.M., Rubio, M.A., Simpson, L. (1999) Embo J. **18**, 7056–7062.
8. 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.
9. Aphasizhev, R., Senger, B., Fasiolo, F. (1997) RNA, **3**, 489–497.
10. Bhattacharyya, S.N., Chatterjee, S. and Adhya, S. (2002) Mol. Cell Biol., **22**, 4372–4382.
11. Bhattacharyya, S.N., Mukherjee, S. and Adhya, S. (2000) Mol. Cell Biol., **20**, 7410–7417.
12. Borner, G.V., Morl, M., Janke, A. and Paabo, S. (1996) Embo J., **15**, 5949–5957.
13. Chang, D.D., Clayton, D.A. (1987) Embo J., **6**, 409–417.
14. Chen, D.H., Shi, X., Suyama, Y. (1994) Mol. Biochem. Parasitol., **64**, 121–133.
15. Chiu, N., Chiu, A. and Suyama, Y. (1975) J. Mol. Biol., **99**, 37–50.
16. Crain, P.F., Alfonzo, J.D., Rozenski, J., Kapushoc, S.T., McCloskey, J.A., Simpson, L. (2002) RNA, **8**, 752–761.
17. Dietrich, A., Marechal-Drouard, L., Carneiro, V., Cosset, A. and Small, I. (1996) Plant J., **10**, 913–918.

18. *Dietrich, A., Small, I., Cosset, A., Weil, J.H. and Marechal-Drouard, L.* (1996) *Biochimie*, **78**, 518–529.
19. *Dietrich, A., Weil, J.H. and Marechal-Drouard, L.* (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 115–131.
20. *Doersen, C.J., Guerrier-Takada, C., Altman, S. and Attardi, G.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 5942–5949.
21. *Dorner, M., Altmann, M., Paabo, S. and Morl, M.* (2001) *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2688–2698.
22. *Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 2838–2843.
23. *Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P., Tarassov, I.A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 45642–45653.
24. *Entelis, N.S., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A.* (1996) *FEBS Lett.*, **384**, 38–42.
25. *Fey, J., Weil, J.H., Tomita, K., Cosset, A., Dietrich, A., Small, I., Marechal-Drouard, L.* (2002) *Gene*, **286**, 21–24.
26. *Glover, K.E., Spencer, D.F., Gray, M.W.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 639–648.
27. *Gray, M.W. and Boyer, P.H.* (1988) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **319**, 135–147.
28. *Hancock, K., Hajduk, S.L.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 19208–19215.
29. *Hancock, K., LeBlanc, A.J., Donze, D., Hajduk, S.L.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 23963–23971.
30. *Hauser, R., Schneider, A.* (1995) *EMBO J.*, **14**, 4212–4220.
31. *Hou, Y.M., Schimmel, P.* (1988) *Nature*, **333**, 140–145.
32. *Janke, A., Xu, X., Arnason, U.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 1276–1281.
33. *Kaneko, T., Suzuki, T., Kapushoc, S.T., Rubio, M.A., Ghazvini, J., Watanabe, K., Simpson, L., Suzuki, T.* (2003) *EMBO J.*, **22**, 657–667.
34. *Kapushoc, S.T., Alfonzo, J.D., Rubio, M.A., Simpson, L.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 37907–37914.
35. *Kazakova, H.A., Entelis, N.S., Martin, R.P., Tarassov, I.A.* (1999) *FEBS Lett.*, **442**, 193–197.
36. *Kolesnikova, O., Entelis, N., Kazakova, H., Brandina, I., Martin, R.P., Tarassov, I.* (2002) *Mitochondrion*, **2**, 93–105.
37. *Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P., Tarassov, I.A.* (2000) *Science*, **289**, 1931–1933.
38. *Kumar, R., Marechal-Drouard, L., Akama, K., Small, I.* (1996) *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 404–411.
39. *LeBlanc, A.J., Yermovsky-Kammerer, A.E., Hajduk, S.L.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 21071–21077.
40. *Li, K., Smagula, C.S., Parsons, W.J., Richardson, J.A., Gonzalez, M., Hager, H.K., Williams, R.S.* (1994) *J. Cell Biol.*, **124**, 871–882.
41. *Lima, B.D., Simpson, L.* (1996) *RNA*, **2**, 429–440.
42. *Lohan, A.J. and Wolfe, K.H.* (1998) *Genetics*, **150**, 425–433.
43. *Lye, L.F., Chen, D.H., Suyama, Y.* (1993) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **58**, 233–245.
44. *Magalhaes, P.J., Andreu, A.L., Schon, E.A.* (1998) *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2375–2382.
45. *Mahapatra, S., Adhya, S.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 20432–20437.
46. *Mahapatra, S., Ghosh, S., Bera, S.K., Ghosh, T., Das, A., Adhya, S.* (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2037–2041.
47. *Marechal-Drouard, L., Guillemaut, P., Cosset, A., Arbogast, M., Weber, F., Weil, J.H., Dietrich, A.* (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3689–3696.
48. *Martin, R.P., Schneller, J.M., Stahl, A.J., Dirheimer, G.* (1979) *Biochemistry*, **18**, 4600–4605.
49. *Martin, R.P., Sibler, A.P., Gehrke, C.W., Kuo, K., Edmonds, C.G.*

- McCloskey, J.A., Dirheimer, G. (1990) *Biochemistry*, **29**, 956–959.
50. Mireau, H., Cosset, A., Marechal-Drouard, L., Fox, T.D., Small ID, Dietrich A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 13291–13296.
51. Mukherjee, S., Bhattacharyya, S.N., Adhya, S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 31249–31255.
52. Pfanner, N. and A. Geissler (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 339–349.
53. Pritchard, A.E., Seilhamer, J.J., Mahalingam, R., Sable, C.L., Venuti, S.E., Cumming, S.D.J. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 173–180.
54. Ramamonjisoa, D., Kauffmann, S., Choisine, N., Marechal-Drouard, L., Green, G., Wintz, H., Small, I., Dietrich, A. (1998) *Plant Mol. Biol.*, **36**, 613–625.
55. Rich, A., RajBhandary, U.L. (1976) *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 805–860.
56. Rubio, M.A., Liu, X., Yuzawa, H., Alfonzo, J.D., Simpson, L. (2000) *RNA*, **6**, 988–1003.
57. Rusconi, C.P., Cech, T.R. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2870–2880.
58. Rusconi, C.P., Cech, T.R. (1996) *EMBO J.*, **15**, 3286–3295.
59. Salavati, R., Panigrahi, A.K. and Stuart, K.D. (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **115**, 109–117.
60. Saraste, M. (1999) *Science*, **283**, 1488–1493.
61. Schneider, A. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1225–1228.
62. Schneider, A., Marechal-Drouard, L. (2000) *Trends Cell Biol.*, **10**, 509–513.
63. Schneider, A., Martin, J., Agabian, N. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2317–2322.
64. Schneider, A., McNally, K.P., Agabian, N. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 21868–21874.
65. Schneider, A., McNally, K.P., Agabian, N. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3699–3705.
66. Shi, X., Chen, D.H., Suyama, Y. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **65**, 23–37.
67. Simpson, A.M., Suyama, Y., Dewes, H., Campbell, D.A., Simpson, L. (1989) *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5427–5445.
68. Small, I., Marechal-Drouard, L., Masson, J., Pelletier, G., Cosset, A., Weil, J.H., Dietrich, A. (1992) *Embo J.*, **11**, 1291–1296.
69. Sollner, T., Rassow, J., Pfanner, N. (1991) *Methods Cell Biol.*, **34**, 345–358.
70. Suyama, Y. (1967) *Biochemistry*, **6**, 2829–2839.
71. Suyama, Y., Eyer, J. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 746–751.
72. Suyama, Y., Hamada, J. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**, 437–443.
73. Tan, T.H., Bochud-Allemann, N., Horn, E.K., Schneider, A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1152–1157.
74. Tan, T.H., Pach, R., Crausaz, A., Ivens, A., Schneider, A. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3707–3717.
75. Tarassov, I., Entelis, N., Martin, R.P. (1995) *J. Mol. Biol.*, **245**, 315–323.
76. Tarassov, I., Entelis, N., Martin, R.P. (1995) *EMBO J.*, **14**, 3461–3471.
77. Tarassov, I.A., Entelis, N.S. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1277–1281.
78. Wallace, D.C. (1999) *Science*, **283**, 1482–1488.
79. Ermovskiy-Kammerer, A.E., Hajduk, S.L. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6253–6259.
80. Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K., Watanabe, K. (1994) *FEBS Lett.*, **338**, 137–142.