

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Ханнанова Рината Асхатовича на тему: «Тонкая регуляция митохондриальной трансляции в клетках пекарских дрожжей» по специальности

1.5.3. Молекулярная биология

Представленная диссертационная работа состоит из двух логически взаимосвязанных с собой частей. В первой части, автор попытался ответить на вопрос, являются ли популяции митохондриальных рибосом в клетках дрожжей однородными, т.е. состоящими из строго одного и того же набора рРНК и белковых компонент. Альтернативная возможность заключается в том, что в клетках присутствует специализированные рибосомы, с разным набором составляющих их белков и, возможно, выполняемых ими функций. Автор работы предполагает, что разные по составу рибосомы могут специализироваться на трансляции разных мРНК. В качестве модельного объекта автором были выбраны пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Во второй части работы автор провел эксперименты по гетерологической экспрессии компонент митохондриальной трансляции в клетках дрожжей — такой подход называется гуманизацией дрожжевой модели и в перспективе может позволить исследовать митохондриальную трансляцию человека с использованием возможностей дрожжевой генетики. Оба направления являются актуальными, бурно развивающимися направлениями молекулярной биологии митохондрий, что хорошо отражено в обзоре литературы, который содержит ссылки на современные работы, направленные на решение подобных задач для цитоплазматических рибосом, а также рибосом бактерий.

Для исследования разнообразия митохондриальных рибосом автор тагировал (за С-конец) несколько белковых компонент митохондриальной рибосомы, и с помощью иммунопреципитации, выделил митохондриальные рибосомы. Состав миторибосом анализировал методом масс-спектрометрии. В результате такого эксперимента, автор диссертации показал, что белковый состав рибосом значительно различается в зависимости от того за какой белок была “вытащена” рибосома. Этот результат предполагает, что рибосомы в клетках дрожжей в значительной степени неоднородны по составу. Кроме этого автору удалось наработать два белка человека, *MTRF1* и *MTRF1A*, в клетках дрожжей с делецией фактора терминации митохондриальной трансляции *MRF1*. Делеция гена *MRF1* приводит к потере возможности осуществлять окислительное фосфорилирование. Предполагалось, что гетерологичная экспрессия *MTRF1* и *MTRF1A* позволит вернуть эту функцию. Однако, оказалось, что клетки дрожжей с заменой *MRF1* на *MTRF1* или *MTRF1A* не восстановили способность к окислительному фосфорилированию. При этом эти штаммы были способны сохранять мтДНК, в отличие от штамма, где *MRF1* отсутствовал. Несмотря на то, что полученные результаты можно расценивать как отрицательные, они представляют собой большой интерес, их достоверность и новизна не вызывает сомнений. Положения, выносимые на защиту и научные выводы, сделанные автором, аккуратно сформулированы и логически следуют из проделанных экспериментов.

При прочтении работы у меня возникли следующие вопросы и замечания:

— даже генетически идентичные клетки дрожжей могут быть очень сильно различаться по фенотипу, например, за счет стохастичности в регуляции некоторых систем или разнице в репликативном возрасте. Есть ли способ различить, является ли предположительно обнаруженная гетерогенность митохондриальных рибосом следствием различий рибосом

в одной клетке или различиями в белковом составе рибосом между разными клетками?

— результаты масс-спектрометрического анализа не показывают стехиометрии между отдельными субъединицами, почему? Автор пишет, что для ряда белков (входящих в состав митохондриальной рибосомы) были выявлены значительные вариации или даже полное отсутствие в отдельных образцах. Наверняка ранее были проведены исследования о влиянии нокаута генов, кодирующих соответствующие (отсутствующие) белки, на способность дрожжей к окислительному фосфорилированию. Есть ли среди таких “варьирующих” белков, найденных в данном исследовании, необязательные для осуществления митохондриальной трансляции?

— не может ли быть обнаруженная вариации в составе рибосом, полученных с помощью разных тагов, объясняться тем, что в препарате рибосом присутствует большое количество интермедиатов сборки (неполных рибосом). Это бы, с одной стороны, объясняло вариацию в белковом составе, но при этом не предполагало бы наличия гетерогенности зрелых функциональных рибосом.

— известна ли из литературы информация о константах диссоциации отдельных белков с митохондриальной рибосомой дрожжей? Возможен ли вообще отдельными белками между разными рибосомами? Если такие данные есть, то как соотносятся данные о вариации отдельных белков митохондриальной рибосомы в пулл-даун эксперименте с прочностью связывания каждого отдельного белка?

— Как определялся порог детекции для каждого белка, представленного на рисунке 12? Возможно, целесообразно было бы нормировать полученные

данные на результаты масс-спектрометрии исходной белковой фракции (до проведения иммунопреципитации); или — если таких результатов нет — на литературные данные о содержании каждого белка. Такой подход позволил бы повысить достоверность интерпретации результатов.

— Для валидации воспроизводимости результатов иммунопреципитации, вероятно, имело бы смысл сделать попарные сравнения корреляции рангов каждого из детектируемых белков для всех повторов, для каждого мутантного штамма. Будут ли ранги значений сигнала от каждого белка SSU и LSU лучше скоррелированы друг с другом в пределах одного мутантного штамма, чем в среднем по всем экспериментам. Не было ли попыток сделать такие сравнения?

— В разделе “результаты” на странице 73 авторы пишут, что штамм MRP1-NA характеризовались существенно замедленным ростом на среде, в которой единственным источником углерода был глицерин, а и MRPL6-NA вовсе не был способен к росту на среде с глицерином. В процессе трансформации — сопряженной с тепловым и химическим стрессом, после которого клетки проводят через узкое генетическое “бутылочное горлышко”/отдельные колонии — штаммы иногда теряют мтДНК. Сколько независимых трансформантов проверяли таким образом? Не пробовали ли проводить трансформацию, сразу высаживая штаммы на селективную среду с глицерином вместо глюкозы?

— В таблице 7 приведена оценка копийности (количество копий на клетку) мтДНК для штамма дикого типа и мутантных штаммов. Однако копийность мтДНК в контроле заметно больше, чем любые литературные данные. С чем это может быть связано?

— Рисунок 24 – совпадает ли размер белков с ожидаемым? Можно ли что-то сказать о том, произошел ли процессинг и отрезание митохондриального адреса?

Кроме того в тексте диссертации имеют место небольшие неточности формулировок и оформления:

— Введение. Автор пишет “Гетерогенность может возникать за счёт вариаций в составе рибосомных РНК и белков...”. Если легко представить себе, что рибосома варьирует по составу рибосомальных белков (например за счет включения в состав рибосомы альтернативных паралогов), то как может варьироваться состав рРНК?

— Обзор литературы, страница 20 “и размер генома грибов колеблется от 30 до 90 тысяч пар оснований” — у некоторых видов грибов размер митогенома превышает 100 т.п.о. (например *Nakaseomyces bacillisporus*, см doi: 10.1093/femsyr/fov023)

— Таблица 2 и 3. Не указано, что за интенсивность сравнивается

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по

защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ханнанов Ринат Асхатович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной энергетики микроорганизмов НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Кнорре Дмитрий Алексеевич

Дата подписания 2.12.2025

Контактные данные:

тел.: +7 495 939 31 07, e-mail: knorre@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.04 – Биохимия

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40,

НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Тел.: +7 495 939 31 07; e-mail: knorre@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Д.А. Кнорре удостоверяю:

ПОДПИСЬ

