

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ханнанов Ринат Асхатович

**Тонкая регуляция митохондриальной трансляции в клетках
пекарских дрожжей**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

- Научный руководитель** – Каменский Петр Андреевич, доктор биологических наук
- Официальные оппоненты** – Замятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», и.о. декана, профессор факультета биоинженерии и биоинформатики
- Кушников Виталий Владимирович, доктор биологических наук, Федеральный исследовательский центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики
- Кнорре Дмитрий Алексеевич, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, ведущий научный сотрудник лаборатории фотохимии биомембран

Защита диссертации состоится «18» декабря 2025 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: msu.015.4.dissovet@org.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3635>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Синтез белка в митохондриях организован по классической схеме, включающей этапы инициации, элонгации, терминации и повторного использования рибосом. Однако митохондриальная трансляционная система в процессе эволюции приобрела ряд уникальных черт вследствие функциональной специализации, направленной на биосинтез гидрофобных мембранных полипептидов.

Недавний стремительный прогресс в развитии крио-электронной микроскопии высокого разрешения позволил определить структуру митохондриальных рибосом многих организмов. Сравнение этих структур показало, что, несмотря на эволюционное происхождение от бактериальных рибосом, митохондриальные рибосомы значительно дивергировали по составу, структуре и функциям. Митохондриальные рибосомы млекопитающих, дрожжей и растений существенно отличаются друг от друга, однако прослеживаются и общие тенденции. Все они приобрели многочисленные митохондриально-специфические белки, не имеющие гомологов у прокариот. Белковый компонент значительно увеличился по сравнению с РНК, что делает митохондриальные рибосомы преимущественно белковыми комплексами.

Функциональная специализация митохондриальных рибосом обусловлена синтезом высоко гидрофобных мембранных белков, входящих в состав цепи переноса электронов митохондрий. В результате эти рибосомы постоянно прикреплены к внутренней мембране с помощью специальных митохондриально-специфических белков, а система адресации растущего пептида в митохондриях отсутствует.

Ряд обстоятельств делает митохондрии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* особенно удобной моделью для изучения белково-специфической трансляции. Во-первых, митохондриальный геном дрожжей кодирует всего 8 полипептидов. Во-вторых, митохондрии дрожжей содержат уникальный набор ассоциированных с рибосомами белков — трансляционных активаторов, каждый из которых регулирует трансляцию одной определённой мРНК. Этот принцип сохраняется для всех белков-активаторов, несмотря на различия в их структуре и механизмах действия. Совокупность этих факторов позволяет предположить, что каждая мРНК в данной системе может транслироваться специализированной рибосомой. Однако в настоящее время экспериментальных данных, подтверждающих эту гипотезу, нет, и вопрос о существовании специализированных популяций рибосом в митохондриях остаётся открытым. В данной работе предпринята попытка ответить на этот вопрос.

Регуляция митохондриальной трансляции на стадии терминации у дрожжей остаётся недостаточно изученной, тогда как соответствующие механизмы у млекопитающих исследованы достаточно подробно. В частности, митохондриальный генетический код млекопитающих, помимо

канонических стоп-кодонах, включает альтернативные варианты (AGA и AGG), вследствие чего в их митохондриях функционируют два фактора терминации трансляции: MTRF1A и MTRF1. Это обеспечивает дополнительную модуляцию биосинтеза компонентов дыхательной цепи.

В отличие от млекопитающих, митохондрии дрожжей содержат только один фактор терминации трансляции, кодируемый геном *MRF1*, который распознаёт стандартные стоп-кодона (UAA, UAG) и обеспечивает высвобождение синтезированных полипептидов. Делеция гена *MRF1* приводит к потере дыхательной функции дрожжей и нестабильности митохондриального генома.

В данной работе произведена попытка гуманизации – замены дрожжевого гена *MRF1* на его человеческие гомологи, а также факторы спасения митоторибосомы человека, с целью расширения знаний о механизмах регуляции трансляции на стадии терминации.

Цель и задачи диссертационного исследования

Цель работы – работы является экспериментальная верификация гипотезы о существовании функционально специализированных субпопуляций митохондриальных рибосом различного белкового состава, ассоциированных с трансляцией специфических мРНК, а также установление возможности факторов терминации и спасения рибосомы из митохондрий человека функционировать в клетках дрожжей.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать протокол выделения популяции активно транслирующих митоторибосом из клеток пекарских дрожжей;
2. Разработать протокол выделения субпопуляций митоторибосом дрожжей, ассоциированных с трансляцией специфических мРНК и/или содержащих конкретные белки;
3. Провести панорамный протеомный анализ популяции активно транслирующих митоторибосом, а также их специализированных субпопуляций;
4. Оценить митохондриальную функцию у штаммов дрожжей, в которых эндогенный ген фактора терминации митотрансляции *MRF1* заменен на гены его человеческих гомологов или на гены факторов спасения митоторибосомы человека.

Научная новизна

В работе впервые были получены препараты митоторибосомных комплексов с высокой степенью обогащения с помощью ко-иммунопреципитации, а также специализированные субпопуляции митохондриальных рибосом, ассоциированных с трансляцией специфических мРНК и/или содержащих конкретные белки. Тем самым разработан и

оптимизирован универсальный высоковоспроизводимый метод исследования дрожжевых миторибосом.

Впервые проведен панорамный протеомный анализ полученных ко-иммуноприцепитатов. На основании полученных данных проведена количественная оценка присутствия рибосомных и вспомогательных белков в транслирующих миторибосомах, показано одновременное существование в митохондриях дрожжей рибосом различного белкового состава.

Впервые осуществлена гуманизация митохондриального фактора терминации трансляции Mrf1 у *Saccharomyces cerevisiae* и продемонстрирована частичная комплементарность его функций его человеческими гомологами MTRF1 и MTRF1A, а именно способность человеческих белков поддерживать стабильность митохондриального генома дрожжей.

Научная и практическая значимость

В ходе выполнения диссертации разработан не имеющий аналогов в мире метод количественного протеомного анализа белкового состава рибосом. Данный метод может стать удачным дополнением (а в некоторых случаях – альтернативой) для исследований митохондриальных рибосом с помощью криоэлектронной микроскопии, которая, как известно, позволяет получать лишь «усредненные» структуры биологических молекул и комплексов.

В работе показано существование в митохондриях дрожжей нескольких субпопуляций рибосом различного белкового состава. Настолько существенная химическая гетерогенность рибосом не наблюдалась ранее ни в одной из изучаемых систем биосинтеза белка. Полученные в работе результаты указывают на возможность существования аналогичных субпопуляций рибосом как минимум в митохондриях других организмов и, возможно, даже у прокариот и в цитозоле эукариот. Таким образом, работа значительно расширяет наши представления о процессах биосинтеза белка и о его специализации.

О том, что фактор терминации трансляции в митохондриях дрожжей Mrf1 необходим для поддержания стабильности митохондриального генома, было известно и ранее. Однако в данной работе была продемонстрирована высочайшая степень этой необходимости – клетки дрожжей, лишённые данного фактора лишь на короткое время, необратимо теряли митохондриальную ДНК. Данное наблюдение говорит о весьма вероятной тесной функциональной связи процессов трансляции и поддержания стабильности ДНК в митохондриях дрожжей; такая связь ранее не была продемонстрирована ни в одной из исследованных живых систем.

Полученные в ходе выполнения работ результаты представляют несомненную практическую важность – они могут быть использованы в будущем для разработки функциональных систем митохондриальной трансляции *in vitro*, которые, в свою очередь, необходимы для тестирования митохондриальной токсичности антибиотиков и других лекарственных препаратов, применяющихся в медицине.

Личный вклад автора

Автор провел работу с научной литературой по теме диссертации, разработал стратегию выполнения исследований и дизайн экспериментов, выполнил все включенные в работу эксперименты, провел анализ полученных результатов и их подготовку к публикации. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором или при его непосредственном участии. Имена всех соавторов указаны в опубликованных работах или отражены в тексте работы. Планирование стратегии выполнения исследований и дизайна экспериментов было выполнено совместно с д.б.н. П.А. Каменским, к.б.н. И.В. Чичериным. Геномное редактирование пекарских дрожжей выполнялось совместно с И.В. Чичериным. Панорамный протеомный анализ выполнялся на базе научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

Методология и методы исследования

Выбор методов исследования соответствовал критериям достоверности, воспроизводимости, точности результатов, а также доступности оборудования и реактивов. Наиболее оптимальным способом фракционирования таких макромолекулярных комплексов, как транслирующие миторибосомы, являлась иммунопреципитация за счет высокоспецифичных взаимодействий антиген-антитело. Иммунопреципитация обеспечивалась мечением по С-концу иммунологическими эпитопами миторибосомных белков и трансляционных активаторов. Панорамный протеомный анализ проводился посредством масс-спектрометрии, основанной на комбинации квадрупольного и орбитального резонатора (Orbitrap) для разделения и детектирования ионов. Данный метод является оптимальным для анализа интактных белков как в нативных, так и в денатурирующих условиях, обеспечивая высочайшее качество спектров. Для количественного анализа митохондриального транскриптома была выбрана обратная транскрипция, сопряженная с ПЦР в реальном времени. Редактирование генома с целью внесения изменений в кодирующие последовательности генов митохондриальных рибосомных белков и факторов трансляции, а также их делеции, осуществлялось с помощью метода гомологичной рекомбинации, являющегося наиболее простым и эффективным способом инженерии ядерного генома в клетках пекарских дрожжей.

Оптимальным способом полуколичественной оценки митохондриальной функции (дыхания) является так называемый «дроп-тест» – высев аликвот последовательных десятикратных разведений суспензий анализируемых культур на агаризованную питательную среду, содержащую несбраживаемые источники углерода.

Методологическая схема данной работы соответствует требованиям современных исследований в области молекулярной биологии и позволяет решить поставленные задачи с минимальной систематической ошибкой.

Положения, выносимые на защиту

1. Рибосомы в митохондриях пекарских дрожжей неоднородны по своему белковому составу, и эта неоднородность по крайней мере частично связана со способностью рибосом транслировать ту или иную мРНК.
2. Многие миторибосомные белки в митохондриях дрожжей представлены не в эквимоллярных друг другу количествах.
3. Трансляция мРНК *COX2* в митохондриях пекарских дрожжей сопряжена с трансляцией мРНК *COX1*.
4. В клетках пекарских дрожжей, лишенных эндогенного фактора терминации митотрансляции, человеческие гомологи этого фактора способны к поддержанию стабильности митохондриального генома, но не способны обеспечить эффективный биосинтез белка.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты были получены с использованием современных методов молекулярной биологии и протеомики. Ключевые эксперименты, включенные в работу, были проведены в трех биологических повторностях, каждая из которых была повторена трижды технически. При обработке результатов экспериментов использовались релевантные статистические методы.

По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index».

Результаты диссертационной работы были представлены на 4-м Российском микробиологическом конгрессе (Томск, 24-29 сентября 2023 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Москва, 20-22 февраля 2025).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 137 страницах и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Список использованной литературы, Дополнительные материалы. Рукопись включает 7 таблиц и 24 рисунка. Список литературы содержит 122 источника. Дополнительные материалы включают 4 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Экспериментальная система для иммунопреципитации митохондриальных рибосом пекарских дрожжей

Были получены рекомбинантные штаммы *S. cerevisiae*, несущие иммунологические метки в виде эпитопов НА – гемагглютинаина вируса гриппа на С-конце митохондриальных рибосомных белков. Белки для мечения (тегирования) выбирались на основании анализа структуры митохондриальной рибосомы дрожжей, полученной методом крио-ЭМ. Критерием отбора белков-кандидатов была доступность их С-концов для антитела. Все митохондриальные рибосомные белки, использованные в данной работе, кодируются ядерным геномом, синтезируются цитоплазматическими рибосомами и импортируются в органеллы. В рамках данного исследования были сконструированы мутантные штаммы *S. cerevisiae*, экспрессирующие белки Mrps17, Mrp20, Mrp1, Mrpl8, Mrpl6, Rsm10, а также активаторы трансляции: мРНК *COX2* — Pet111 и мРНК *COX1* – Mss51, содержащие по три tandemные копии НА-тега (3хНА) на С-концах. Введение тега осуществлялось посредством гомологичной рекомбинации с использованием ДНК-фрагмента, включающего последовательность 3хНА, стоп-кодон, терминатор транскрипции *ADH1* и кассету устойчивости к гигромицину В (Рисунок 1).

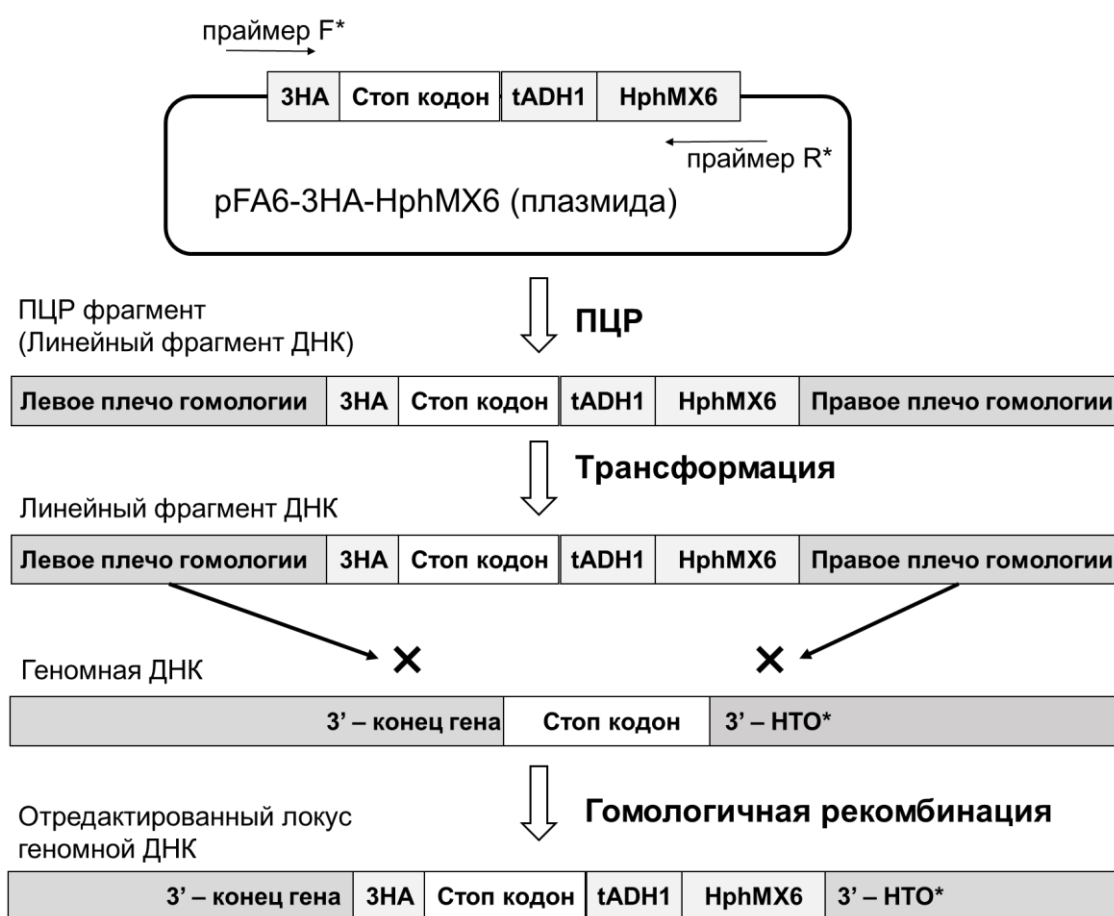


Рисунок 1. Схема получение линейного вектора для гомологичной рекомбинации и редактирование 3'-концевого региона гена белка-мишени посредством замены стоп-кодона

целевого гена на последовательность кодирующую эпитопную метку (три идущих подряд тега HA, 3HA) с кассетой устойчивости к гигромицину Б. * - Праймеры для получения линейного фрагмента ДНК представлены в Приложении 2. 3'-НТО – 3'-нетранслируемая область гена белка-мишени.

Для оценки функциональной сохранности меченых белков проводился анализ роста мутантных штаммов на среде с глицерином в качестве единственного источника углерода. Большинство полученных мутантов демонстрировали темпы роста, сопоставимые с диким типом, что свидетельствовало о сохранении функциональной активности меченых белков. Штаммы, показавшие неспособность к росту на среде с глицерином, в дальнейших экспериментах не использовались.

После завершения этапов конструирования и валидации мутантных штаммов был проведён эксперимент по апробации разработанного протокола иммунопреципитации. Для оценки эффективности выделения меченых митохондриальных рибосомных белков анализировали фракции лизата, финальной промывки, элюата, а также остатка на магнитных бусинах после элюции с использованием иммуноблоттинга с анти-HA антителами (Рисунок 2).

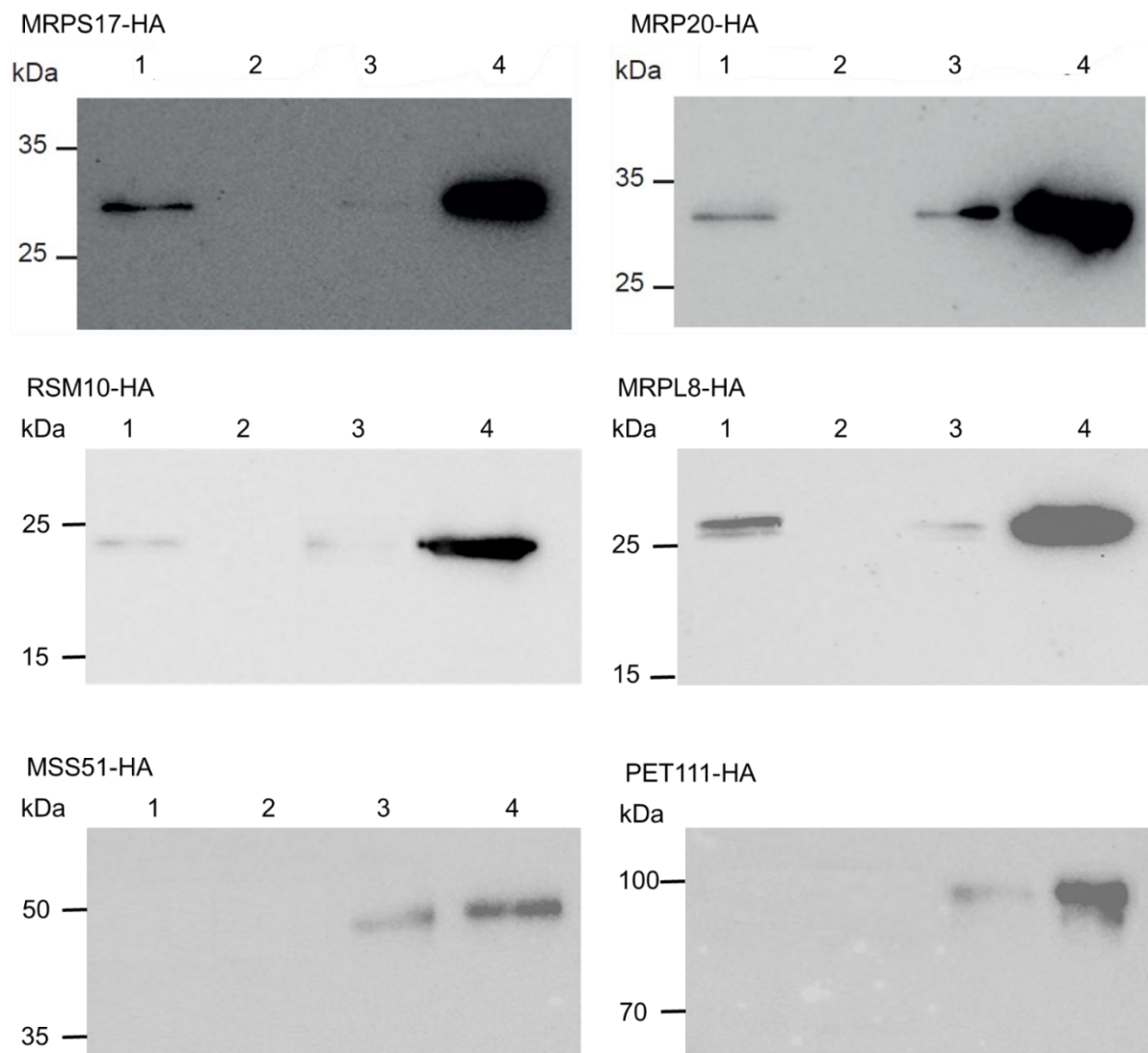


Рисунок 2. Вестерн блоттинг фракций ко-иммунопреципитации меченых белков из клеточных лизатов рекомбинантных штаммов пекарских дрожжей.

Фракции полученные от соответствующих штаммов, где 1 – тотальный клеточный лизат, 2 – промывка, 3 – магнитные бусинки с ковалентно пришитыми антителами к НА-эпиту, 4 – элюат.

Как показано на рисунке 2, НА-тегированные белки Mrps17 и Mrp20 эффективно детектируются в элюате, при этом на бусинах после промывки регистрируется лишь незначительный остаточный сигнал. Полученные результаты были расценены как удовлетворительные, что позволило перейти к последующей идентификации белков, со-осаждаемых вместе с целевыми тегированными компонентами.

2. Сравнительная протеомика коиммунопреципитатов, ассоциированных с митохондриальными рибосомами, в зависимости от положения аффинной метки.

Ко-иммунопреципитация была проведена для всех валидированных мутантных штаммов, а также для штамма дикого типа, использованного в качестве отрицательного контроля. Полученные белковые комплексы были подвергнуты анализу методом масс-спектрометрии.

На первоначальном этапе исследования целью являлась идентификация белков, осаждаемых из штамма дикого типа и рассматриваемых в качестве фоновых компонентов. Всего было идентифицировано 12 белков дрожжей и три недрожжевых белка: трипсин свиной, человеческие кератины типа I и типа II. Данные белки относятся к числу типичных загрязнителей, часто встречающихся в протеомных исследованиях. Дальнейший анализ протеомных данных, полученных из образцов мутантных штаммов, экспрессирующих белки с НА-метками, позволил во всех случаях идентифицировать большое количество белков (от 1500 до 2400 в зависимости от конкретного образца). Для систематизации полученных данных все выявленные белки были классифицированы по субклеточным компартментам. В таблице 1 представлены соотношения суммарной интенсивности белков, относящихся к различным субклеточным компартментам, к общей интенсивности каждого образца.

Таблица 1. Соотношения суммарной интенсивности белков, относящихся к различным клеточным компартментам.

Наименование коиммунопреципитата	Субклеточные компартменты					
	Цитоплазма	Митохондрия (за искл. МРБ*)	ЭПР	Аппарат Гольджи	Ядро	МРБ
MRP20-HA	42,7% **	7,9%	1,8%	0,8%	12,6%	38,6%
MRPL8-HA	25,7%	6,8%	1,2%	0,4%	10,5%	59,1%
MRPS17-HA	13,2%	11,0%	0,7%	0,1%	5,1%	71,4%
RSM10-HA	31,4%	9,7%	2,3%	1,0%	11,3%	45,6%
PET111-HA	56,5%	13,6%	5,1%	2,2%	18,6%	6,2%
MSS51-HA	63,2%	15,3%	4,2%	1%	14,8%	0,7%

* - Митохондриальные рибосомные белки.

** - Суммарная интенсивность превосходит 100% в силу неоднозначной аннотации (аннотированы в разных компартментах) ряда белков.

В образцах мутантных штаммов с НА-тегированными митохондриальными рибосомными белками наибольшую часть общего протеома составляли митохондриальные белки, в частности, компоненты митохондриальных рибосом. Неожиданным оказалось то, что иммунопреципитация из лизата штамма, экспрессирующего РЕТ111-НА, приводила преимущественно к выделению цитоплазматических белков. Мы предполагаем, что присутствие других митохондриальных и клеточных белков не является результатом контаминации, поскольку ранее было показано, что отрицательный контроль (штамма дикого типа) характеризуется крайне низким уровнем цитоплазматического загрязнения. Следовательно, данные белки, вероятно, взаимодействуют с тегированными мишенями, однако характер этих взаимодействий требует дальнейшего изучения. Вместе с этим, тот факт, что доля митохондриальных рибосомных белков в иммунопреципитированных образцах достигала 40–70% от общей интенсивности, свидетельствует о высокой специфичности разработанной экспериментальной системы.

Анализ образцов, полученных для другого активатора трансляции, Mss51, показал, что при используемых экспериментальных условиях данный белок практически не ассоциируется с миторибосомами. В соответствующем ко-иммунопреципитате Mss51 был представлен в наибольшем количестве, тогда как митохондриальные рибосомные белки составляли лишь незначительную долю, что свидетельствует о преимущественном выделении свободной формы Mss51.

Дальнейший анализ был посвящён исследованию количественного и качественного состава митохондриальных рибосомных белков, выявленных в экспериментальных образцах. Для оценки различий в составе рибосомных белков в различных образцах было проведено их попарное сравнение с использованием вулкан-плотов, отражающих два ключевых параметра: fold change (характеризующий степень различия между образцами) и p-value (определяющий статистическую значимость наблюдаемых изменений) (Рисунок 3).

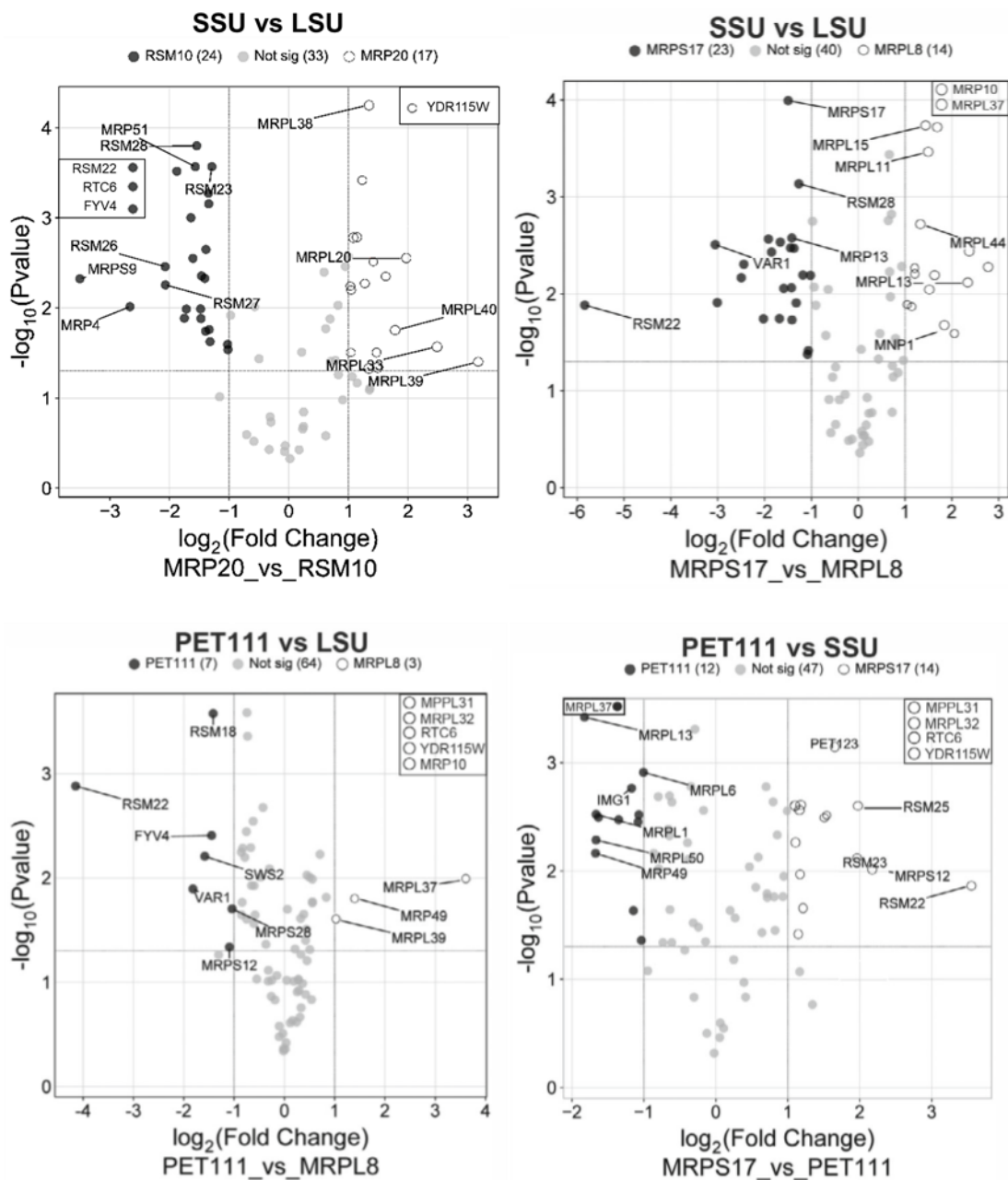


Рисунок 3. Диаграммы попарного сравнения интенсивности LFQ-сигналов митохондриальных рибосомных белков из различных ко-иммунопреципитатов. По оси абсцисс отложена \log_2 значения fold change, характеризующего степень различия между образцами, по оси ординат – величина p-value. Статистически значимыми считались различия, превышающие двукратный уровень fold change при p-значении $\leq 0,05$ или в логарифмическом выражении [$\log_2(\text{fold change}) = 1$ и $-\log_{10}(p) = 1.3$]; пограничные значения отображены пунктирными линиями. Белки, не соответствующие ни одному из указанных критериев, обозначены серым цветом. Белки, удовлетворяющие обоим критериям, обозначены чёрным и белым цветом. Те белки, которые обнаруживались исключительно в одном из сравниваемых образцов и отсутствовали в другом, выделены чёрной рамкой с соответствующей стороны графика. Построение вулкан-плотов осуществлялось на основании данных трёх независимых экспериментов ($n=3$) для каждого мутантного штамма.

Учитывая, что клетки дрожжей подвергались быстрой заморозке в жидком азоте перед лизисом (что позволяло зафиксировать все молекулярные

взаимодействия *in situ*), полученные результаты свидетельствуют о том, что митохондриальные рибосомные белки в клетках дрожжей быстро и эффективно включаются в состав рибосомных частиц, и свободный пул данных белков отсутствует. Кроме того, можно заключить, что используемые экспериментальные условия не приводят к дестабилизации рибосом, поскольку в противном случае наблюдалось бы значительное обогащение меченого белка, не связанного с рибосомами.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии ограниченного поднабора белков, которые последовательно не детектируются в «серой зоне» вулкан-плотов, где располагаются небогащённые и статистически незначимые белки. К данной категории относятся Mrp10 (mS37), Rtc6 (bL36m), Fyv4 (mS41), Mrp137 (mL54) и YDR115W (bL34m). Эти белки регулярно выявляются среди специфичных для образца компонентов или входят в число хитов, демонстрирующих статистически значимое и высокое обогащение. Отмечено, что Mrp131, Mrp132, Rtc6 и YDR115W, по-видимому, исключаются из состава комплекса с активатором трансляции Pet111, вне зависимости от того, проводится ли сравнение интерактома PET111-НА с интерактом белка малой (MRPS17-НА) или большой (MRPL8-НА) субъединицы рибосомы. Mrp137 демонстрирует положительную корреляцию с Mrp18 (эти белки часто ко-детектируются), а также отрицательную корреляцию с Mrps17. Данная закономерность соответствует принадлежности Mrp137 к белкам большой субъединицы рибосомы, однако корреляция с другими белками обеих субъединиц (такими, как Rsm10 и Mrp20) не прослеживается, что указывает на уникальные особенности распределения Mrp137 по сравнению с большинством других митохондриальных рибосомных белков.

Дополнительное внимание привлекают белки Var1 и Rsm22. Var1p является единственным миторибосомным белком, кодируемым митохондриальным геномом дрожжей, тогда как Rsm22 представляет собой белок с метилтрансферазным доменом, молекулярные мишени и функции которого неизвестны. Представленность обоих белков в интерактоме PET111-НА варьирует в зависимости от того, проводится ли сравнение с малой или большой субъединицей: оба белка обогащены в интерактоме PET111-НА по сравнению с MRPL8-НА, однако при сравнении с MRPS17-НА, напротив, склонны ассоциироваться с последним, а не с PET111-НА.

Далее были рассчитаны медианные значения интенсивности для митохондриальных рибосомных белков в каждом ко-иммунопреципитате, после чего для каждого отдельного белка определили отношение его интенсивности к медианному значению, что отражало степень обогащения относительно медианы. Учитывая, что все митохондриальные рибосомные белки представлены в рибосоме в одной копии, ожидалось, что значения этого показателя будут близки к 1. Однако полученные результаты продемонстрировали широкий диапазон значений — от 0 до 10 (Таблица 2 и 3).

Таблица 2. Наиболее представленные миторибосомные белки

Белки малой субъединицы								
Наименование белков	Наименование ко-иммунопреципитата						кол-во молекул на клетку	кол-во а.к. остатков
	MRP20- HA	MRPL8- HA	MRPS17- HA	RSM10- HA	PET111- HA	MSS51- HA		
MRPS35*	5,65	3,77	4,31	5,84	4,23	1,54	3460	345
RSM28	3,40	1,80	2,17	2,88	2,37	1,00	NA	361
NAM9	2,92	1,77	3,23	2,75	2,81	0,85	3270	486
RSM23	2,20	1,17	2,71	2,22	1,39	0,39	1300	450
Белки большой субъединицы								
Наименование белков	Наименование ко-иммунопреципитата						кол-во молекул на клетку	кол-во а.к. остатков
	MRP20- HA	MRPL8- HA	MRPS17- HA	RSM10- HA	PET111- HA	MSS51- HA		
MNP1	6,60	9,73	5,28	6,39	5,93	3,22	6900	194
MRPL3	3,36	2,24	4,12	3,18	2,19	1,39	300	390
YML6	2,38	2,70	3,96	2,06	2,82	3,77	1200	286
MRPL35	2,27	2,75	3,54	5,77	3,52	2,33	7700	367
MRPL4	1,86	1,64	1,61	4,34	1,46	1,64	7700	319
MRPL22	1,83	1,72	3,40	3,21	2,24	1,90	1800	309
RML2	1,82	1,73	1,95	2,33	2,21	1,00	1600	393
IMG1	1,75	4,72	3,01	1,86	4,33	0,96	4150	169
MRPL7	1,54	3,78	4,77	5,95	4,43	1,38	NA	292
MRP7	2,68	1,61	3,07	1,38	1,85	0,64	2300	371

* - Количества идентифицированных МРБ во всех образцах ко-ИП. Указаны соответствующие названия генов. Значения для каждого отдельного белка были нормализованы на медианные значения, рассчитанные для всех белков в образце. Эти значения показывают отношение каждого МРБ к «медианному» МРБ.

Анализируя распределение белков по степени обогащения в ко-иммунопреципитатах после протеомного анализа, мы выделили три группы: обогащённые (отношение к медиане более 1,5), близкие к медиане (0,75–1,5) и обеднённые (меньше 0,75). Примечательно, что полученные результаты были воспроизводимы между различными экспериментальными препаратами, а состав выделенных групп не зависел от белка-приманки с аффинным тегом. Исключение составил препарат MSS51-HA, для которого были идентифицированы исключительно переобогащённые белки, тогда как остальные не превышали пороговых значений.

Для интерпретации этих данных можно представить, что отношение, равное 1, указывает на присутствие одной молекулы данного белка в каждой миторибосоме, что свидетельствует о его структурной функции и наличии в каждой рибосоме в одной копии. Значение 0,01 свидетельствует о присутствии белка лишь в 1% рибосом, что может указывать на его неструктурную роль или слабую ассоциацию с рибосомным комплексом. Значения, превышающие 1, могут отражать либо наличие нескольких копий белка в рибосоме, либо дополнительные взаимодействия с компонентами ко-иммунопреципитата вне

рибосомных комплексов, либо более высокую эффективность детекции в масс-спектрометрии.

Таблица 3. Наименее представленные миторибосомные белки

Белки малой субъединицы								
Наименование белков	Наименование ко-иммунопреципитата						кол-во молекул на клетку	кол-во а.к. остатков
	MRP20-HA	MRPL8-HA	MRPS17-HA	RSM10-HA	PET111-HA	MSS51-HA		
RSM22*	0,00	0,01	0,32	0,38	0,06	0	1900	628
FYV4	0,00	0,41	0,18	0,53	1,03	0	2630	130
MRP10	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0	259	95
SWS2	0,08	0,16	0,09	0,12	0,46	0	259	143
RSM18	0,26	0,62	0,55	0,59	0,96	0	1210	138

Белки большой субъединицы								
Наименование белков	Наименование ко-иммунопреципитата						кол-во молекул на клетку	кол-во а.к. остатков
	MRP20-HA	MRPL8-HA	MRPS17-HA	RSM10-HA	PET111-HA	MSS51-HA		
RTC6	0,00	0,13	0,30	0,21	0,00	0	500	93
MRPL32	0,08	0,18	0,39	0,31	0,00	0	1700	183
MRPL44	0,15	0,29	0,23	0,20	0,30	0	1550	98
MRPL27	0,23	0,58	0,57	0,33	0,45	0	2250	146
MRPL51	0,32	0,47	0,41	0,19	0,36	0	3400	140
MRPL31	0,39	0,18	0,52	0,49	0,00	0	2100	131
YDR115W	0,46	0,20	0,66	0,00	0,00	0	200	105
MRPL28	0,46	0,63	0,64	0,59	0,53	0	6300	147

* - Количества идентифицированных МРБ во всех образцах ко-ИП. Указаны соответствующие названия генов. Значения для каждого отдельного белка были нормализованы на медианные значения, рассчитанные для всех белков в образце. Эти значения показывают отношение каждого МРБ к «медианному» МРБ.

3. Количественный анализ ко-осаждаемых РНК в составе комплекса с рибосомными белками и активаторами трансляции

Для анализа рРНК и мРНК, осаждённых в комплексе с мечеными белками на магнитных бусинах с конъюгированными специфическими антителами, был применён метод обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР (ОТ-кПЦР). В первую очередь был поставлен отрицательный контрольный опыт с использованием штамма дикого типа, что позволило определить фоновый уровень сигнала. В большинстве случаев амплификация отсутствовала, а при её возникновении значения совпадали с контролем без матрицы и не превышали порогового уровня, что свидетельствует об отсутствии преципитации митохондриальных рРНК или мРНК из клеток дикого типа.

Дальнейший анализ был проведён для элюатов, полученных из ко-иммунопреципитатов мутантных штаммов с введёнными аффинными метками (Рисунок 4).

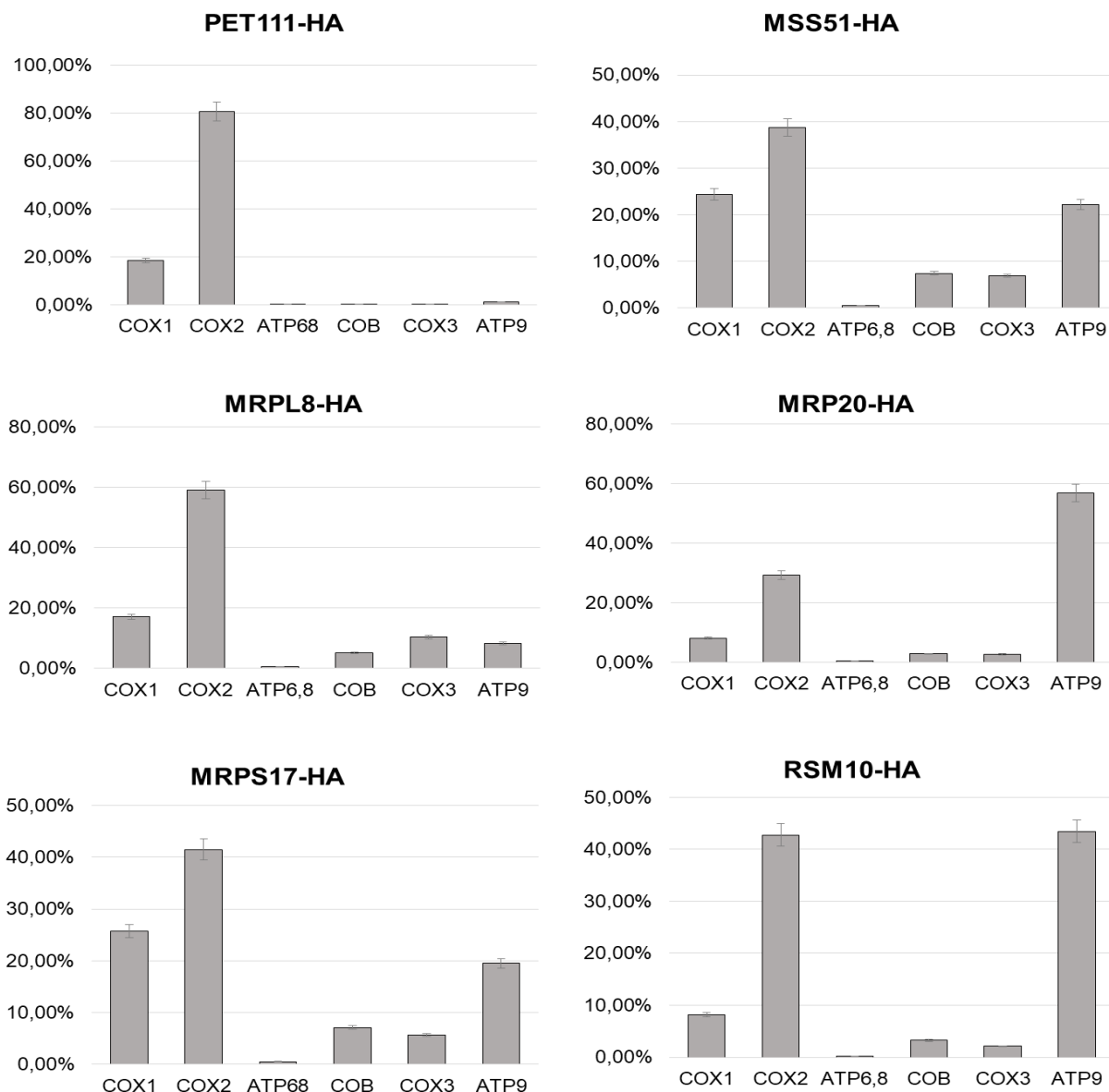


Рисунок 4. Диаграммы соотношения митохондриальных мРНК в различных ко-иммунопреципитатах. Количество РНК в образцах, полученных методом ко-иммунопреципитации, определялось по абсолютным значениям на основании индивидуальных калибровочных кривых, построенных для каждой пары праймеров. Погрешности оценки (error bars) рассчитывались по данным трёх независимых экспериментов по иммунопреципитации, каждый из которых анализировался в трёх технических повторях.

В материале ко-иммунопреципитатов с мечеными Mrpl8, Mrp20, Mrps17 и Rsm10, были достоверно детектированы все митохондриальные рРНК и мРНК. Наиболее интенсивные сигналы в образцах Mrp20 приходились на митохондриальные рРНК, а также на мРНК *COX2* и *ATP9*. Схожие результаты были получены для MRPS17-HA, за исключением мРНК *ATP9*,

которая в данном случае не выявлялась. Примечательно, что в штамме, содержащем MRPS17-НА, преимущественно со-осаждаются рРНК малой субъединицы (15S), тогда как в образцах MRPL8-НА рРНК обеих субъединиц — 15S и 21S — присутствуют в сопоставимых количествах.

Иммунопреципитация с использованием PET111-НА выявила иную картину: в соответствующих образцах были обнаружены только две мРНК — *COX1* и *COX2*, причём последняя преобладала по количеству. Известно, что Pet111 является специфическим активатором трансляции мРНК *COX2* и не регулирует экспрессию мРНК *COX1*. Однако нельзя исключать, что обе популяции миторибосом, осуществляющих трансляцию указанных мРНК, могут быть ко-иммунопреципитированы с меченым Pet111, поскольку они могут быть физически связаны в составе комплекса MIOREX или сближаться в ходе сборки цитохром-с-оксидазы.

4. Гуманизация дрожжевого митохондриального фактора терминации трансляции, выбор оптимального способа замены дрожжевого гена на человеческие.

Мы начали исследование с того, что получили штамм с делецией гена *MRP1* (штамм KRA1). Как и сообщалось в предыдущих работах, штамм-мутант имел отрицательный респираторный фенотип, то есть не был способен к росту на среде с глицерином. Тогда мы попытались вернуть нормальный респираторный фенотип, внося в мутантный штамм отсутствующую копию гена *MRP1* в составе плазмидного челночного вектора pRS416, в котором копия гена помещалась между его собственными промотором и терминатором (штамм KRA2), имитируя его положение в геномной ДНК. Кроме нативного *MRP1*, мы попробовали внести вместо него факторы терминации трансляции из митохондрий человека, чтобы понять, могут ли они комплементировать делецию гена *MRP1*, полностью или частично восстанавливая дыхательную функцию митохондрий. С этой целью мы произвели трансформацию штамма KRA1 набором векторов на основе pRS416, каждый из которых содержал один из генов, кодирующих фактор терминации трансляции митохондрий человека или человеческий факторы спасения миторибосомы. Однако ни у одного из гуманизированных штаммов не вернулась способность к дыханию, и их фенотип никак не отличался от штамма KRA1 с делецией гена *MRP1*. Вопреки ожиданию, даже внесение «родного» гена *MRP1* в его геномном окружении в составе плазмидного вектора не привело к восстановлению дыхания. Таким образом, мы оказались в ситуации, когда эксперимент не получил необходимого положительного контроля (им должен был быть штамм KRA2), и на данном этапе сделать вывод о способности человеческих генов *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, и *MRPL58* комплементировать делецию дрожжевого *MRP1* не удалось.

Было выдвинуто предположение, что дрожжевые штаммы с делецией гена *MRP1* характеризуются фенотипом ρ^0 , вследствие чего введение плазмидного челночного вектора с целевыми генами не приводит к восстановлению респираторной функции. Для проверки данной гипотезы

было произведено количественное сравнение митохондриальной ДНК относительно ядерной ДНК (Таблица 4) у штаммов DAU2, KRA1 и KRA2 с использованием метода количественной ПЦР.

Таблица 4. Соотношение мтДНК к яДНК в штамме Дикого типа (DAU2), штамме-мутанте с делецией *MRF1* (KRA1) и штамме-мутанте с делецией *MRF1* с плазмидой p*MRF1* (KRA2).

№	Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Среднее значение Cq	Станд. откл. Cq	мтДНК / яДНК
1	DAU2	<i>Дикий тип</i>	мтДНК	17,37	6.11%	148,05
			яДНК	24,58	4.71%	
2	KRA1	<i>MRF1Δ</i>	мтДНК	30,42	5.37%	0,03
			яДНК	25,17	7.41%	
3	KRA2	<i>MRF1Δ</i> +p <i>MRF1</i>	мтДНК	29,11	8.09%	0,02
			яДНК	23,46	4.33%	

* Представлены сокращенные генотипы штаммов содержащие только необходимую информацию. p*MRF1* – плазида pRS416_pro_ter_ *MRF1*. Целевой участок ДНК — участок генома, на который отжигались праймеры в количественной ПЦР. Отношение рассчитывали по формуле $2^{\Delta Cq}$. Эксперимент проводился три раза ($N = 3$) в трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Из данных, представленных в таблице 4, очевидно следует, что удаление гена *MRF1* приводит к деплеции митохондриальной ДНК относительно ядерной ДНК, и доставка копии гена в составе плазмидного вектора не помогает восстановить исходное соотношение. В норме митохондриальная ДНК присутствует в клетках в большом количестве копий, в то время как ядерная ДНК — всего в 1 копии (в случае гаплоидных штаммов, которые и использовались в данной работе). Если сравнивать данные из таблицы 4 для мутанта и дикого типа, можно заключить, что при удалении *MRF1* количество мтДНК падает в 5000 — 7000 раз.

Таким образом, при продолжительном культивировании клеток без гена *MRF1* происходит утрата митохондриальной ДНК и необратимая деградация митохондрий.

В качестве альтернативного подхода была предложена интеграция гена-интереса непосредственно в геном по локусу *mrfl*, что подразумевало бы замену его кодирующей последовательности на гомологичный ген или другой исследуемый ген (например, человеческие *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, *MRPL58*). Таким образом, этап создания штамма-делетанта исключается, и анализ функционального эффекта осуществлялся непосредственно после замещения целевого гена. В рамках данного подхода в качестве положительного контроля был выбран штамм, в котором конструкция с геном *MRF1* интегрирована в соответствующий геномный локус, как показано на рисунке 5, а. Сохранение респираторной функции при таком редактировании

генома обеспечивает возможность достоверной оценки способности человеческих гомологов и факторов спасения митохондрии компенсировать утрату гена *MRF1*.

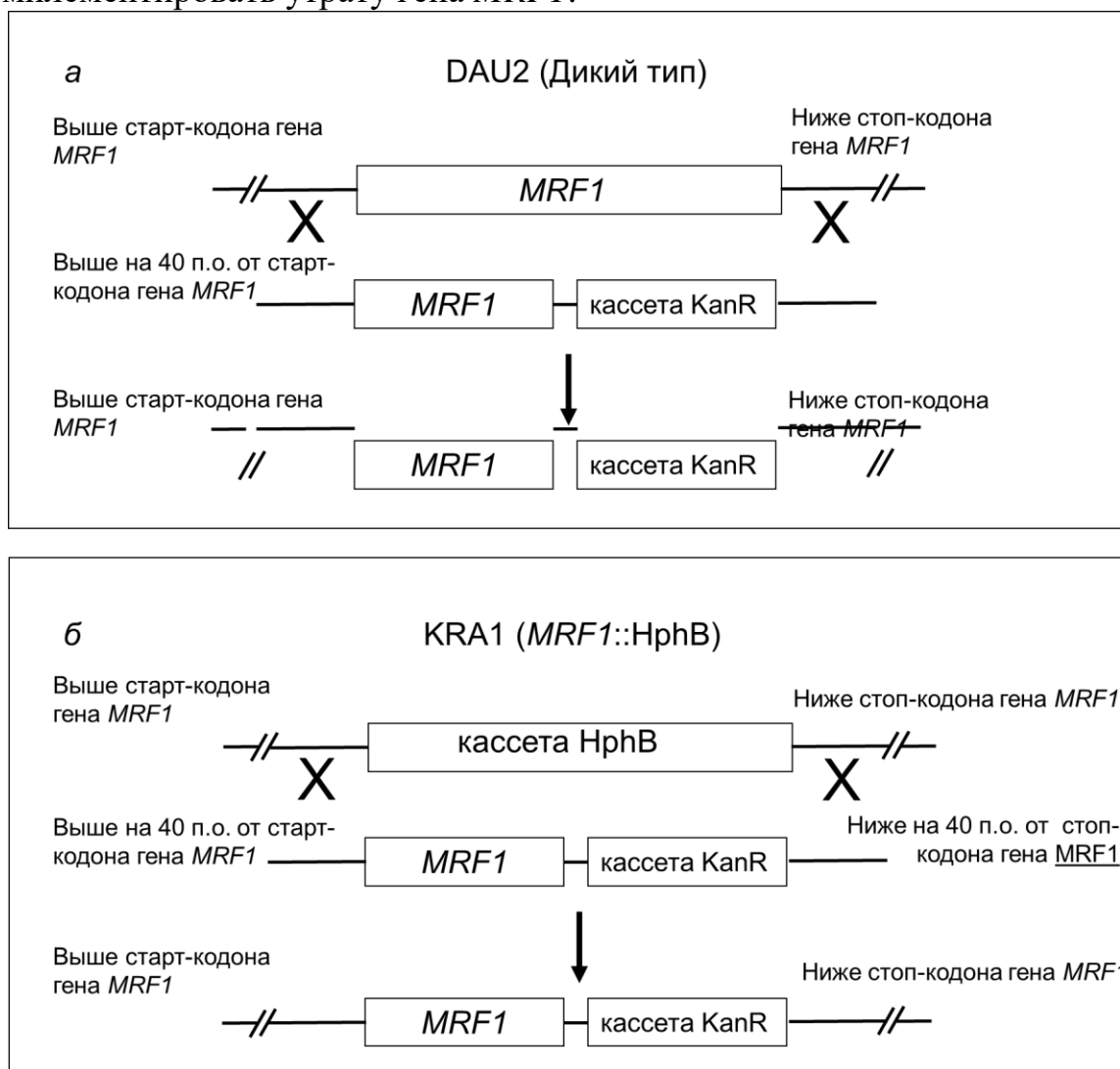


Рисунок 5. Схема гомологичной рекомбинации в штамме дикого типа и в штамме с делецией гена *MRF1* после трансформации линейным фрагментом ДНК, несущим кодирующую последовательность гена *MRF1* и кассету устойчивости к G418. а – схема получения штамма KRA11; б – схема получения штамма KRA12.

В результате трансформации были получены штаммы KRA11 и KRA12, имеющие идентичную последовательность в интересующем нас локусе *mrf1* (Рисунок 5). Мы проанализировали респираторный фенотип штаммов KRA11 и KRA12 и обнаружили, что в этих двух штаммах он различен. В штамме KRA11, полученном из дикого типа, функция митохондрий не нарушена, в то время как в штамме KRA12, полученном из штамма с делецией *MRF1*, функция митохондрий необратимо утрачена. При этом штаммы KRA11 и KRA12 изогенны в локусе *mrf1*. Значения отношения мтДНК к яДНК в штаммах было также различно: в штамме KRA11 оно было близко к штамму дикого типа, а в штамме KRA12 – к мутанту с делецией *MRF1* (Таблица 5).

Таблица 5. Соотношение мтДНК к яДНК в штаммах-мутантах и штамме дикого типа.

№	Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Среднее значение Cq	Станд. Откл. Cq	мтДНК / яДНК
1	DAU2	<i>Дикий тип</i>	мтДНК	16,07	3.93%	144,32
			яДНК	23,24	4.87%	
2	KRA1	<i>MRP1::HphB</i>	мтДНК	28,15	2.36%	0,02
			яДНК	22,75	4.88%	
3	KRA11	<i>MRP1</i> → <i>MRP1-KanR</i>	мтДНК	16,20	5,56%	146,91
			яДНК	23,40	4.07%	
4	KRA12	<i>MRP1::HphB</i> → <i>MRP1-KanR</i>	мтДНК	26,38	6.91%	0,02
			яДНК	20,86	6.75%	

* Представлены сокращенные генотипы штаммов содержащие только необходимую информацию. Целевой участок ДНК — участок генома, на который отжигались праймеры в количественной ПЦР. Отношение рассчитывали по формуле $2^{\Delta Cq}$. Эксперимент проводился три раза ($N = 3$) в трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Таким образом, мы показали, что независимо от того, какой способ восстановления фенотипа мы используем, доставку копии гена на плазмидном векторе или с помощью интеграции в геномную ДНК в составе линейного фрагмента ДНК, восстановления дыхательного фенотипа не происходит, если клетки мутантного штамма какое-то время существовали без гена *MRP1*, и что причиной этому служит необратимая деградация мтДНК.

5. Получение гуманизированных штаммов пекарских дрожжей и анализ функциональности их митохондрий.

Редактирование генома посредством гомологичной рекомбинации линейным фрагментом ДНК, содержащим целевой ген и селективный маркер, оказалось надёжным способом замены кодирующей последовательности гена *MRP1* на любую другую последовательность, минуя стадию делеции *MRP1*, на которой и происходила необратимая потеря дыхательной функции. Эта технология позволяет исследовать функциональную комплементацию делеции *MRP1*, просто заменяя кодирующую последовательность *MRP1* в матрице на любой другой интересующий нас ген, например, на гены факторов терминации трансляции или спасения митохондрием человека: *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, *MRPL58* (Рисунок 6).

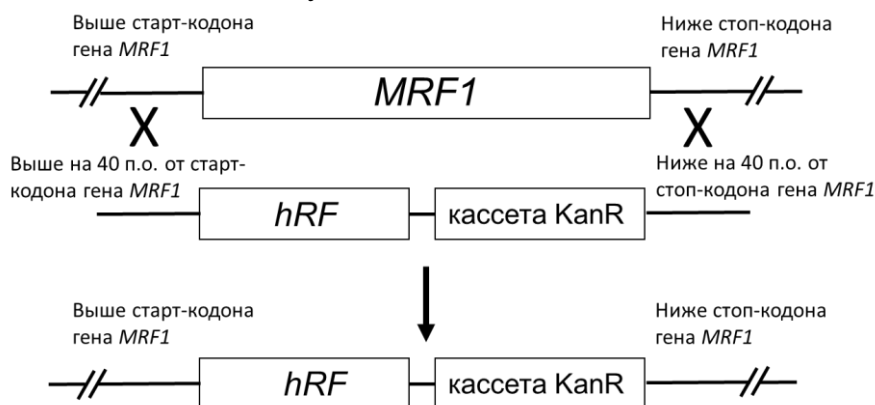


Рисунок 6. Схема редактирования генома *Saccharomyces cerevisiae* посредством замены кодирующей последовательности гена *MRP1* линейным фрагментом ДНК, содержащим

кассету устойчивости (KanR) и кодирующих участок человеческих генов *hRF* (человеческие гомологи *MRF1* и факторы спасения миторибосомы).

Используя данный подход, мы получили следующие штаммы-мутанты: KRA7, KRA8, KRA9, KRA10 (Таблица 6). Мы выделили РНК из этих штаммов и проверили экспрессию человеческих транс-генов *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, *MRPL58* в них методом обратной транскрипции и количественной ПЦР (Таблица 6). Сравнительный анализ экспрессии демонстрирует, что все гены, кодирующие человеческие митохондриальные факторы терминации трансляции, транскрибируются и присутствуют в клетке на уровне матричной РНК.

Таблица 6. Анализ экспрессии генов факторов терминации митохондрий в штаммах-мутантах с помощью обратной транскрипции и количественной ПЦР.

Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Тип матрицы	Среднее значение Cq	Станд. Откл. Cq	«RT+» / «RT —»
KRA8	<i>MRF1::MTRF1a-KanMX6</i>	<i>MTRF1a</i>	RT +	28,41	8.32%	80,38
			RT —	34,74	11.54%	
KRA7	<i>MRF1::MTRF1-KanMX6</i>	<i>MTRF1</i>	RT +	26,34	7.88%	215,15
			RT —	34,09	10.95%	
KRA9	<i>MRF1::MTRFR-KanMX6</i>	<i>MTRFR</i>	RT +	23,99	5.21%	537,37
			RT —	33,06	8.67%	
KRA10	<i>MRF1::MRPL58-KanMX6</i>	<i>MRPL58</i>	RT +	28,31	6.02%	26,90
			RT —	33,06	9.07%	
DAU2	Дикий тип	<i>MRF1</i>	RT +	25,86	8.96%	500,30
			RT —	34,82	10.30%	

* Представлены сокращенные генотипы штаммов содержащие только необходимую информацию. Целевой участок ДНК — фрагмент ДНК, на который отжигались праймеры в количественной ПЦР. Тип матрицы: «RT +» означает, что обратная транскриптаза была добавлена, и это эксперимент; «RT —» означает, что обратная транскриптаза не была добавлена, и это отрицательный контроль, который показывает значение сигнала от остаточных количеств геномной ДНК в образцах РНК. Вывод об экспрессии генов на уровне мРНК делается из сравнения эксперимента «RT +» с отрицательным контролем «RT —»: если значения Cq в эксперименте ниже, чем в контроле, то ген экспрессируется; если разницы между «RT +» и «RT —» нет, то ген не экспрессируется на уровне мРНК. Соотношение рассчитывали по формуле $2^{\Delta Cq}$. Эксперимент проводился три раза ($N = 3$) в трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Анализ соотношения мтДНК к яДНК в штаммах-мутантах с заменой *MRF1* на человеческие гомологи и факторы спасения миторибосомы показал, что у таких мутантов данное соотношение существенно выше, чем у штамма с делецией *MRF1*, однако, не достигает значений, характерных для штамма дикого типа (Таблица 7). Респираторная функция у штаммов KRA7 — KRA10 отсутствует.

Таблица 7. Соотношение количества мтДНК к геномной ДНК

№	Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Среднее значение Cq	Станд. Откл. Cq	мтДНК / яДНК
1	DAU2	<i>Дикий тип</i>	мтДНК	16,07	3.93%	144,32
			яДНК	23,24	4.87%	
2	KRA8	<i>MRF1::MTRF1a-KanR</i>	мтДНК	20,60	2.67%	2,31
			яДНК	21,81	5.45%	
3	KRA7	<i>MRF1::MTRF1-KanR</i>	мтДНК	18,72	3.89%	18,00
			яДНК	22,89	4.71%	
4	KRA9	<i>MRF1::MTRFR-KanR</i>	мтДНК	19,40	1.34%	9,53
			яДНК	22,65	3.49%	
5	KRA10	<i>MRF1::MRPL58-KanR</i>	мтДНК	19,94	6.31%	7,01
			яДНК	22,75	4.77%	
6	KRA1	<i>MRF1::HphB</i>	мтДНК	28,15	2.36%	0,02
			яДНК	22,75	4.88%	

* Представлены сокращенные генотипы штаммов содержащие только необходимую информацию. Целевой участок ДНК — фрагмент ДНК, на который отжигались праймеры в количественной ПЦР. Отношение мт-ДНК к яДНК рассчитывали по формуле $2^{\Delta Cq}$. Эксперимент проводился в трёх биологических ($N = 3$) и трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Таким образом, из данных, полученных в результате оценки отношения мтДНК к яДНК в штаммах KRA5 - KRA8 (таблица 7), следует, что при замене гена *MRF1* на его человеческие гомологи, дрожжи не теряют мтДНК в настолько существенной степени, как штамм с делецией *MRF1*.

Однако, несмотря на экспрессию человеческих гомологов в клетках дрожжей, дыхательный фенотип, характеризующий функцию митохондрий, всё равно не восстанавливался.

Аналитическое скрещивание ранее гуманизированных штаммов дрожжей с контрольным штаммом DAU 0 (генотип: [*MAT α* , *rho*⁰]) показало, что штаммы KRA7 (*MTRF1*) и KRA8 (*MTRF1A*) полностью не утратили митохондриальную функцию. В частности, полученные гибридные диплоидные штаммы оказались способны расти на средах с несбраживаемыми источниками углерода, тогда как у гибридов, полученных от штаммов KRA9 (*MTRFR*) и KRA10 (*MRPL58*), митохондриальная функция не восстановилась. Таким образом, контрольное скрещивание показало, что штаммы пекарских дрожжей с генами *MTRF1A* и *MTRF1* не утратили полностью митохондрии как в случае штамма-делетанта или штаммов с человеческими факторами спасения рибосомы. Тем самым, можно сделать вывод, что человеческие гомологи *MTRF1* и *MTRF1A* способны участвовать в поддержании стабильности мтДНК в клетках пекарских дрожжей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование мРНК-специфичной трансляции в митохондриях представляет собой чрезвычайно интересное направление молекулярной биологии, способное существенно изменить современные представления о регуляции экспрессии генов. Тем не менее, в настоящее время сведения о данном явлении крайне ограничены. В настоящей работе представлен экспериментальный подход, способствующий развитию этого направления исследований как минимум в митохондриальных системах. Методология основана на использовании мутантных штаммов дрожжей, экспрессирующих аффинно-меченые митохондриальные рибосомные белки (МРБ), с последующей изоляцией миторибосомных комплексов из этих штаммов посредством иммунопреципитации и с дальнейшим анализом белковых и РНК-профилей с помощью протеомики и ОТ-кПЦР соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности предлагаемого подхода, поскольку анализируемые образцы были существенно обогащены как миторибосомными белками, так и рРНК митохондриальных рибосом. Парные сравнения протеомных профилей показали, что, несмотря на сходство количественного представительства большинства МРБ, для ряда белков были выявлены значительные вариации или даже полное отсутствие в отдельных образцах. Интерактом меченого активатора трансляции Pet111 существенно отличался от интерактонов меченых МРБ и преимущественно содержал цитозольные белки. Мы полагаем, что эти белки не являются фоновыми загрязнителями, поскольку в отрицательном контроле (штамм дикого типа) после иммунопреципитации определялось лишь незначительное количество белков.

Белки других клеточных компартментов выявлялись во всех образцах, что, вероятно, связано с тем, что все они синтезируются в цитоплазме и на определённых этапах жизненного цикла взаимодействуют с цитозольными мРНК, рибосомами и ассоциированными белками. Анализ РНК-профиля показал, что наиболее представленными РНК в образцах были митохондриальные рРНК и мРНК *COX1*. При размещении аффинного тега на рибосомных белках в комплексах с ними соочищались практически все митохондриальные мРНК. В противоположность этому, с меченым Pet111 сосаждались только две мРНК – *COX1* и *COX2*. Учитывая, что Pet111 является специфическим активатором трансляции мРНК *COX2*, обнаружение сигнала от мРНК *COX1* было неожиданным. Мы объясняем это возможной пространственной ассоциацией рибосом, осуществляющих трансляцию обеих мРНК, вблизи участков сборки комплекса цитохром с - оксидазы.

Таким образом, представленный нами экспериментальный подход является эффективным инструментом для изучения мРНК-специфичной трансляции и исследования субпопуляций рибосом с различным структурным составом к определённым мРНК.

Следует отметить, что данная работа имеет ряд ограничений, которые могут быть преодолены в последующих исследованиях. Перспективы

дальнейшего развития включают тегирование других рибосомных белков и активаторов трансляции различных мРНК, анализ РНК-состава с использованием RNA-seq вместо ОТ-кПЦР, а также проведение крио-ЭМ митохондриальных рибосом, связанных с активаторами трансляции, с последующей детекцией всех белков, входящих в состав таких рибосом, по результатам анализа структурных данных.

Вторая часть работы была посвящена расширению представлений о механизмах регуляции митохондриальной трансляции на этапе терминации и сопряженных иных процессов в митохондриях посредством гуманизации митохондриальных белков в клетках *Saccharomyces cerevisiae*. В частности, в работе были впервые получены клеточные линии пекарских дрожжей с человеческими гомологами дрожжевого гена *MRF1* (*MTRF1A*, *MTRF1*), а также факторами спасения миторибосомы (*MRPL58*, *MTRFR*).

Несмотря на неполную функциональную компенсацию утраты эндогенного митохондриального фактора терминации трансляции, человеческие гомологи продемонстрировали участие в поддержании целостности митохондриального генома, доказательством чего служит факт восстановления респираторного фенотипа у диплоидных гибридов, полученных скрещиванием штаммов с человеческими гомологами (*MTRF1* и *MTRF1A*) со штаммом дикого типа с фенотипом *rho*⁰. Вместе с тем, диплоидные гибриды, полученные от клеточных линий дрожжей, в которых эндогенный фактор *MRF1* был заменен на человеческие факторы спасения миторибосом (*MRPL58* и *MTRFR*) имели отрицательный респираторный фенотип. Данный факт может быть объяснен их структурой. В частности, факторы спасения утратили домены распознавания кодонов, приобретая роль «аварийных» факторов для контроля качества трансляции. Поэтому, возможно, домены I и II играют, помимо участия в связывании с рибосомой и распознавания стоп-кодонов, важную роль в поддержании митохондриального генома.

Таким образом, наблюдаемая фенотипическая реверсия у гибридных диплоидов свидетельствует о субфункциональной активности человеческих ортологов.

ВЫВОДЫ

1. В митохондриях дрожжей существуют субпопуляции рибосом различного белкового состава.
2. Некоторые белки, а именно MNP1, MRPL35, MRPL4, MRPS35, NAM9, RSM23, могут быть представлены в митохондриальных рибосомах дрожжей не в эквимоллярных друг другу количествах.
3. В митохондриях дрожжей трансляция мРНК *COX2* функционально сопряжена с трансляцией мРНК *COX1*.

4. Человеческие факторы терминации митохондриальной трансляции MTRF1 и MTRF1A способны поддерживать стабильность митохондриальной ДНК в штамме дрожжей с делецией гена эндогенного фактора терминации митохондриальной трансляции *MRF1*, но не способны полностью обеспечить нормальную работу дрожжевых митохондрий.
5. Человеческие факторы спасения митохондриальной рибосомы MRPL58 и MTRFR не способны поддерживать стабильность митохондриальной ДНК в штамме дрожжей с делецией гена эндогенного фактора терминации митохондриальной трансляции.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. Chicherin I.V., Dukhalin S.V., **Khannanov R.A.**, Baleva M.V., Levitskii S.A., Patrushev M.V., Sergiev P.V., Kamenski P. Functional Diversity of Mitochondrial Peptidyl-tRNA Hydrolase ICT1 in Human Cells // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – Vol.16, no.8. – P.716885. DOI: 10.3389/fmolb.2021.716885. Импакт-фактор 4,0 (JIF). Доля участия 40%. 0,44 п.л.

2. **Ханнанов Р.А.**, Чичерин И.В., Балева М.В., Левицкий С.А., Васильев Р.А., Пиунова У.Е., Каменский П.А. Рибосомы в митохондриях пекарских дрожжей неоднородны по белковому составу // *Биохимия* – 2025. — Т. 90, № 8. – С. 1201 – 1218. EDN VCIEXX. Импакт-фактор 2.908 (РИНЦ). Доля участия 70%. 1,13 п.л.

[**Khannanov R.A.**, Chicherin I.V., Baleva M.V., Levitskii S.A., Vasilev R.A., Piunova U.E., Kamenski P.A. Ribosome in Baker's Yeast Mitochondria are Heterogeneous // *Biochemistry (Moscow)* – 2025. – V.90, no.8. – P.1099-1115. DOI: 10.1134/S0006297925602047. Импакт-фактор 2,2 (JIF). Доля участия 70%. 1,10 п.л.]

3. **Ханнанов Р.А.**, Чичерин И.В., Балева М.В., Левицкий С.А., Васильев Р.А., Пиунова У.Е., Каменский П.А. Опыт гуманизации митохондриальных белков у *Saccharomyces cerevisiae* на примере замены дрожжевого митохондриального фактора терминации трансляции MRF1 человеческими гомологами // *Биохимия* – 2025. — Т. 90, № 9. – С. 1325 – 1337. DOI: 10.31857/S0320972525090057. Импакт-фактор 2.908 (РИНЦ). Доля участия 70%. 0,81 п.л.

[**Khannanov R.A.**, Chicherin I.V., Baleva M.V., Levitskii S.A., Vasilev R.A., Piunova U.E., Kamenski P. Approaches to Humanization of Mitochondrial Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* on the example of replacing the Yeast Mitochondrial Translation Termination Factor MRF1 with its human homologues // *Biochemistry (Moscow)* – 2025. – V.90, no.9. – P. 1240-1251. DOI:10.1134/s0006297925601418. Импакт-фактор 2,2 (JIF). Доля участия 70%. 0,75 п.л.]