

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ханнанов Ринат Асхатович

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

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Каменский П.А.

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Митохондрия	17
1.1.1 История открытия митохондрий	17
1.1.2 Происхождение митохондрий	18
1.1.3 Общая молекулярная биология митохондрий.....	19
1.2 Трансляция в митохондриях	22
1.2.1 Инициация митохондриальной трансляции	24
1.2.2 Элонгация митохондриальной трансляции	27
1.2.3 Терминация митохондриальной трансляции и рециклинг миторибосом	31
1.2.4 Заключительные замечания о трансляции в митохондриях	37
1.3 Активаторы трансляции в митохондриях дрожжей	38
1.3.1 Активаторы мРНК <i>COX1</i> (Pet309, MSS51, Mam33).....	39
1.3.2 Активатор мРНК <i>COX2</i> (Pet111).....	41
1.3.3 Активаторы мРНК <i>COX3</i> (Pet54, Pet122, Pet494)	42
1.3.4 Активаторы мРНК <i>COB</i> (Cbs1, Cbs2, Cbp1, Cbp3, Cbp6)	43
1.3.5 Активаторы мРНК генов АТФ-синтазы (<i>ATP8/ATP6, ATP9</i>)	45
1.3.6 Активатор мРНК <i>VAR1</i> (Sov1)	46
1.3.7 Универсальный постинициаторный фактор Dpc29.....	46
1.3.8 Человеческие аналоги дрожжевых активаторов митохондриальной трансляции	47
1.4 Митохондриальные рибосомы пекарских дрожжей.....	48
1.4.2 Биогенез и сборка миторибосомы пекарских дрожжей	49

1.4.3 Особенности функционирования миторибосом дрожжей в ходе трансляции	50
1.4.4 Эволюционные отличия миторибосом у дрожжей и млекопитающих ..	51
1.5 Гуманизация пекарских дрожжей	54
1.5.1 Общие сведения о гуманизации дрожжей	54
1.5.2 Гуманизация митохондриальных белков.....	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	57
2.1.1 Выбор штамма и способ их культивирования.	57
2.1.2 Анализ респираторного фенотипа и функциональности митохондрий дрожжей.....	57
2.1.3 Получения штаммов дрожжей с фенотипом <i>rho⁰</i> из клеток дрожжей дикого типа.	57
2.1.4 Скрещивание гаплоидных штаммов пекарских дрожжей.	58
2.1.5 Редактирование генома дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	58
2.1.6 Мечение С-концов митохондриальных рибосомных белков	59
2.1.7 Иммунопреципитация митохондриальных рибосомных комплексов....	60
2.1.8 Сравнительная протеомика ко-иммунопреципитатов.....	61
2.1.9 Масс-спектрометрический анализ.....	62
2.1.9 Выделение и очистка митохондрий из клеток пекарских дрожжей.....	63
2.1.10 Выделение белков и Вестерн-блоттинг.	64
2.1.11 Анализ РНК методом обратной транскрипции и количественной ПЦР (ОТ-кПЦР).....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1 Гетерологичный белковый состав транслируемых миторибосом	67
3.1.1 Экспериментальная система для иммунопреципитации митохондриальных рибосом пекарских дрожжей	67
3.1.2 Сравнительная протеомика ко-иммунопреципитатов.....	76

3.1.3 Количественный анализ ко-осаждаемых РНК в составе комплекса с рибосомными белками и активаторами трансляции	90
3.2 Гуманизация дрожжевого митохондриального фактора терминации трансляции	94
3.2.1 Гуманизация посредством внесения через шаттл-вектор генов человеческих гомологов Mrf1 (MTRF1 и MTRF1A) и человеческих факторов спасения миторибосомы (MRPL58 и MTRFR), феномен необратимой утраты респираторного фенотипа	94
3.2.2 Поиск оптимального способа редактирования генома дрожжей.....	96
3.2.3 Редактирование генома <i>S. cerevisiae</i> посредством гомологичной рекомбинации человеческих генов <i>MTRF1</i> , <i>MTRF1A</i> , <i>MRPL58</i> , <i>MTRFR</i> , анализ полученных гуманизированных линий пекарских дрожжей.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113
ПРИЛОЖЕНИЯ	127
БЛАГОДАРНОСТИ	137

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – Аппарат Гольджи
- АТФ – Аденозинтрифосфат
- ГДФ – Гуанозиндифосфат
- ГТФ – Гуанозинтрифосфат
- ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
- кДНК – Комплементарная ДНК
- мтДНК – Митохондриальная ДНК
- крио-ЭМ – Криоэлектронная микроскопия
- ПЦР – Полимеразная цепная реакция
- кПЦР – количественная ПЦР, ПЦР в реальном времени
- ОТ-кПЦР – кПЦР, с наличием этапа в виде обратной транскрипции
- РНК – Рибонуклеиновая кислота
- ТА – Трансляционные активаторы
- ЭПР – Эндоплазматический ретикулум
- мРНК – Матричная РНК
- рРНК – Рибосомная РНК
- тРНК – Транспортная РНК
- GGQ - Консервативный каталитический мотив Глицин-Глицин-Глутамин
- НА – Эпитоп гемагглютинина вируса гриппа
- HRP – Конъюгированная пероксидаза хрена
- ИММ – Внутренняя мембрана митохондрий
- LFQ – Количественная оценка без маркировки
- LSU – Большая субъединица рибосомы
- МОРЕХ – Митохондриальная организация экспрессии генов
- MRP – Митохондриальный рибосомный белок
- OD – Оптическая плотность
- ОРФ – Открытая рамка считывания
- OXPHOS – Окислительное фосфорилирование
- PIC1 – Митохондриальный преинициаторный комплекс 1

PPR – Пентатрико-пептидный повтор

PTH – Пептидил-тРНК гидролаза

PTC – Пептидил-трансферазный центр

RQC – Рибосомо-ассоциированный контроль качества

RF – Release factor, фактор терминации

SSU – Малая субъединица рибосомы

UTR – Нетранслируемый регион мРНК

WT – Дикий тип

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Синтез белка в митохондриях организован в целом по бактериальному типу и включает в себя этапы инициации, элонгации, терминации и рециклирования (повторного использования) рибосом [1]. Каждый этап реализуется посредством серии молекулярных взаимодействий между митохондриальными рибосомами, мРНК, аминоацил-тРНК и регулируется набором факторов трансляции. Однако митохондриальная трансляционная система в процессе эволюции приобрела ряд уникальных черт вследствие своей высокой специализации, направленной на биосинтез гидрофобных мембранных полипептидов [2].

Ещё в начале 2010-х годов митохондриальные рибосомы оставались «*terra incognita*» для исследователей. Было известно, что они следуют универсальному архитектурному плану и состоят из двух субъединиц: малая ответственна за связывание тРНК и декодирование триплетов мРНК, а большая катализирует образование пептидной связи и содержит канал выхода растущего полипептида [3]. Однако недавний стремительный прогресс в развитии электронной крио-электронной микроскопии высокого разрешения пролил свет на структуру (и, как следствие, частично на функции) митохондриальных рибосом многих организмов [4]. Анализ этих структур показал, что, несмотря на эволюционное происхождение от бактериальных рибосом, митохондриальные рибосомы значительно отличаются от них по составу, структуре и функциям [5]. Митохондриальные рибосомы млекопитающих, дрожжей и растений также существенно отличаются друг от друга, однако в их строении прослеживаются и общие тенденции. Все они содержат многочисленные специфические митохондриальные рибосомные белки, не имеющие гомологов у прокариот. Молярное соотношение белков и РНК у всех миторибосом существенно смещено в сторону белков, что делает митохондриальные рибосомы преимущественно белковыми комплексами. Хотя

функциональное ядро сохраняется, рибосомные РНК демонстрируют значительную пластичность: у млекопитающих многие спирали РНК редуцированы и заменены белками, тогда как у дрожжей и растений появились дополнительные сегменты митохондриальной рРНК [6]. Функциональная специализация митохондриальных рибосом обусловлена синтезом высокогидрофобных мембранных белков, входящих в состав цепи переноса электронов митохондрий. По всей видимости, именно вследствие этого миторибосомы постоянно прикреплены к внутренней мемbrane с помощью специальных специфических митохондриальных белков, а система адресации растущего пептида в митохондриях отсутствует [7].

Криоэлектронная микроскопия – основной на сегодняшний день инструмент получения сведений о структуре митохондриальных рибосом. Для установления связи между структурой и биологической функцией необходимо получать структуры комплексов с лигандами (мРНК, тРНК, антибиотики, растущий пептид) и соответствующими белковыми факторами. Митохондриальная трансляция у млекопитающих была подробно изучена этим методом, поскольку доступны структуры комплексов инициации [8], элонгации [9], терминации и рециклирования [2]. Биогенез рибосом также исследовался с помощью построения структурных моделей рибосомных комплексов, связанных с факторами сборки или выделенных из клеток с мутациями в соответствующих генах [10, 11]. В настоящее время такая связь между структурой и функцией установлена только для митохондриальных рибосом млекопитающих, а для других организмов, таких как дрожжи и растения, доступны только структуры целых рибосом и отдельных их субъединиц [10, 11].

Рибосомы часто воспринимаются как типовые молекулярные машины, собранные «по стандартным спецификациям». Однако новые данные свидетельствуют о том, что рибосомы могут быть более гетерогенными, чем считалось ранее. Вероятно, такая гетерогенность рибосом представляет собой

дополнительный уровень регуляции экспрессии генов [12]. Гетерогенность может возникать за счёт вариаций в составе рибосомных РНК и белков, а также в их химических модификациях [13]. До некоторой степени к факторам гетерогенности рибосом можно отнести и ассоциированные с рибосомами белки. Эти вариации могут влиять на различные аспекты рибосомного цикла, такие как предпочтение определённых мРНК, точность использования альтернативных старт- и стоп-кодонов, скорость трансляции и т.п. [12].

Структура митохондриальной рибосомы пекарских дрожжей была определена в 2017 году [14]. Она содержит две рРНК (15S и 21S), 34 белка в малой субъединице и 39 белков в большой. Обе субъединицы включают множество специфических митохондриальных белков, которые практически полностью покрывают рибосомную РНК, придавая рибосоме уникальную морфологию. Функции большинства этих белков неизвестны, однако некоторые из них имеют сходство с ферментами, такими как супероксиддисмутаза (mS42, mS43), ДНК-связывающие белки (mL58, mL60), белки, связывающие нуклеотиды (mL38, mL46), метилтрансферазы (Rsm22) и др. [14]. Во всех случаях их исходная каталитическая активность утрачена, и предполагается, что в рибосоме они выполняют новые функции.

На данный момент в распоряжении исследователей нет инструмента, при помощи которого можно было бы однозначно отличить коровые структурные компоненты миторибосомы от временно связанных (ассоциированных с рибосомами) белков, которые могут быть частью регуляторных механизмов. Создание системы митохондриальной трансляции *in vitro* могло бы решить эту проблему, однако такую систему пока разработать не удалось. Существенное увеличение доли белков в составе миторибосом дрожжей создаёт предпосылки для структурной гетерогенности последних, однако подобное явление пока не было описано.

Ряд обстоятельств делает митохондрии пекарских дрожжей потенциально пригодными для функционирования в них гетерогенных рибосом. Во-первых,

митохондриальный геном дрожжей кодирует лишь 7 полипептидов. Во-вторых, экспрессия генов в этих органеллах компартментализована во внутренней мемbrane и РНК-гранулах [15]. Кроме того, митохондрии дрожжей содержат уникальный набор ассоциированных с рибосомами белков — трансляционных активаторов [16], каждый из которых регулирует трансляцию одной определённой мРНК. Например, Pet111p функционирует как «персональный трансляционный фактор» для мРНК *COX2* [17]. Этот принцип сохраняется и для других активаторов, несмотря на различия в структуре и механизмах их действия. Совокупность этих факторов позволяет предположить, что каждая мРНК в данной системе может транслироваться специализированной рибосомой, то есть рибосомой, обладающей уникальным белковым составом. 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.

Также остается малоизученной регуляция митохондриальной трансляции на стадии терминации у дрожжей. В настоящее время достаточно хорошо изучена регуляция терминации в митохондриях млекопитающих, где функционируют два фактора терминации трансляции MTRF1A и MTRF1. Дефицит или отсутствие факторов терминации (например, отсутствие MTRF1) ведёт к «застrevанию» рибосомы на определённых мРНК (например, *COXI*), что активирует ассоциированную с рибосомой систему контроля качества (mtRQC). Эти механизмы способствуют деградации «дефектных» мРНК и поддержанию гомеостаза митохондриального синтеза белка, предотвращая накопление abortивных продуктов и защищая функцию дыхательной цепи [18, 19]. За счет метилирования аминокислот, входящих в состав консервативных мотивов факторов высвобождения рибосом (ribosome release factors), в частности мотива GGQ, может дополнительно настраиваться эффективность и

точность высвобождения пептида, являя, тем самым, еще один уровень регуляции биосинтеза белка [20].

Немаловажную роль играют факторы спасения митохондриальных рибосом млекопитающих (mitoribosome resue factors). Данные факторы, такие как ICT1, гидролизуют пептидил-тРНК при «застrevании» рибосомы на укороченных матрицах. Это позволяет либо возобновить трансляцию, либо корректно завершить процесс, что поддерживает функцию митохондрий [21].

Митохондрии дрожжей, в отличие от млекопитающих, содержат только один фактор терминации трансляции, кодируемый геном *MRF1*, который отвечает за распознавание стандартных стоп-кодонов (UAA, UAG) и высвобождение синтезированных полипептидов. Делеция гена *MRF1* приводит к потере дыхательной функции дрожжей и нестабильности генома митохондрий. В данной работе предпринята попытка посредством гуманизации – замены дрожжевого гена на человеческие гомологи, а также на гены человеческих факторов спасения миторибосомы – расширить понимание механизмов регуляции митотрансляции у дрожжей на стадии ее терминации.

Цель работы

Целью данной 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.

Задачи работы

1. Разработать протокол выделения популяции активно транслирующих миторибосом из клеток пекарских дрожжей;

2. Разработать протокол выделения субпопуляций миторибосом дрожжей, ассоциированных с трансляцией специфических мРНК и/или содержащих конкретные белки;

3. Провести панорамный протеомный анализ популяции активно транслирующих миторибосом, 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 миторибосомы человека.

Научная новизна

В работе впервые были получены препараты миторибосомных 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-иммунопрепаратов. На основании полученных данных проведена количественная оценка присутствия рибосомных и ассоциированных с рибосомами белков в транслирующих миторибосомах, показано одновременное существование в митохондриях дрожжей рибосом различного белкового состава.

Впервые осуществлена гуманизация митохондриального фактора терминации трансляции Mrf1p у *Saccharomyces cerevisiae* и продемонстрирована частичная комплементарность его функций функциям человеческих гомологов MTRF1 и MTRF1A (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) исследованиям 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 Mrf1p необходим для поддержания стабильности митохондриального генома, было известно и ранее. Однако в данной работе была продемонстрирована высочайшая степень этой необходимости – клетки дрожжей, лишенные данного фактора лишь на короткое время, необратимо теряли митохондриальную ДНК. Данное наблюдение говорит о весьма вероятной тесной функциональной сцепке процессов трансляции и поддержания стабильности ДНК в митохондриях дрожжей; такая сцепка 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 лаборатории 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 реагентов. Наиболее оптимальным способом фракционирования таких макромолекулярных комплексов, как транслирующие миторибосомы, являлась иммунопреципитация за счет высокоспецифичных взаимодействий антиген-антитело. Иммунопреципитация была возможна за счет меченых 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 генетической 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 в качестве источника углерода, как сбраживаемые (глюкозы), так и несбраживаемые (глицерин) источники.

Методологическая схема данной работы соответствует требованиям современных исследований в области молекулярной биологии митохондрий 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 эквимолярных 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.

Работа рекомендована к защите для соискания ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология на заседании кафедры молекулярной биологии 22 августа 2025 года.

По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Митохондрия

1.1.1 История открытия митохондрий

Первые наблюдения внутриклеточных структур, которые, вероятно, представляли митохондрии, были опубликованы в 1840-х годах. Рихард Альтман в 1890 году определил их как клеточные органеллы и назвал «биобластами». В 1898 году Карл Бенда ввел термин «митохондрии» от греческого *μίτος*, mitos, «нить», и *χονδρίον*, хондрион, «гранула». Бенджамин Ф. Кингсбери в 1912 году впервые связал их с клеточным дыханием, но почти исключительно на основании морфологических наблюдений. В 1913 году Отто Генрих Варбург нашел взаимосвязь между клеточным дыханием и частицами из экстрактов печени морской свинки, которое он назвал «grana» [22].

К концу 30-х началу 40-х годов XX века стала формироваться теория о колосальной роли трифосфатов нуклеотидов в качестве своеобразной энергетической валюты в живых клетках. В частности, в 1939 году эксперименты с использованием измельченных мышечных клеток продемонстрировали, что клеточное дыхание с использованием одного атома кислорода может образовывать две молекулы аденоциантрифосфата (АТФ), а в 1941 году Фрицем Альбертом Липманном была разработана концепция фосфатных связей в молекуле АТФ как формы энергии в клеточном метаболизме. В последующие годы исследования механизма клеточного дыхания получили дальнейшее развитие, хотя его связь с митохондриями не была известна. Внедренный Альбертом Клодом метод фракционирования тканей позволил изолировать митохондрии от других клеточных фракций и провести их биохимический анализ. По результатам данных работ Клод в 1946 году пришел к выводу что цитохромоксидаза и другие ферменты, ответственные за дыхательную цепь, имеют митохондриальное происхождение. В 1948 году Юджин Кеннеди и Альберт Лениндже обнаружили, что митохондрии являются компартментом окислительного фосфорилирования у

эукариот. Дальнейшее совершенствование метода ультрафракционирования позволило улучшить качество препаратов митохондрий, что привело к обнаружению других элементов клеточного дыхания [22].

С появлением в арсенале ученых в 40-х годах XX века сканирующей электронной микроскопии и развитием техники тонкослойной препаратации стало возможным получение электронных микрофотографий митохондрий с высоким разрешением. Этот способ визуального изучения органелл вытеснил ранее применяемый в микробиологии способ окрашивания Янусом зеленым. В итоге, полученные изображения митохондрий стали более детальными. В 1952 году Георг Палад, анализируя полученные микрофотографии митохондрий, показал, что эти органеллы имеют две мембранные, внешнюю и внутреннюю, причем последняя образует во внутреннем пространстве митохондрии ярко выраженные складки. Также было обнаружено, что размер и форма митохондрий варьируется от клетки к клетке [23].

Дальнейшие исследования показали, что митохондрии имеют собственный аппарат биосинтеза белков. В 1967 Кларк-Уокер и Линнейн доказали, что биосинтез белка в митохондриях возможен [24]. В 1968 г. были разработаны методы картирования митохондриальных генов, а описание генетической и физической карты митохондриальной ДНК дрожжей была завершена в 1976 г [22].

1.1.2 Происхождение митохондрий

Митохондрии - это внутриклеточные органеллы, имеющие двойную мембрану, способные к саморепликации собственного генетического материала, а также обладающие своим аппаратом биосинтеза белков, закодированных в их геноме.

Митохондрии являются одними из ключевых органелл эукариотических клеток. Основной их функцией является синтез АТФ. Помимо энергетической функции, митохондрии вовлечены во множество регуляторных путей, в частности участвуют в гомеостазе кальция и железа, в выработке гормонов, играют важную роль в процессах старения. Митохондрии способны к

«молекулярной коммуникации», посредством которой они взаимодействуют с другими органеллами, ядром и внешней средой [25].

В конце 60-х годов XX века была выдвинута гипотеза о прокариотическом происхождении митохондрий, в частности Линн Саган высказала предположение, что митохондрии и хлоропласти являются эндосимбиотическими потомками прокариот, утративших самостоятельность и ставших органеллами эукариотических клеток [26]. Последующие исследования, основанные на применении молекулярно-биологических методов, в частности высокопроизводительное полногеномное секвенирование ДНК, а также сравнительный анализ протеома митохондрий различных организмов (от человека до растений), показали, что, вероятно, общим древним предком митохондрий является некая альфа-протеобактерия. В свою очередь, по результатам обширных метагеномных исследований по поиску общего предка эукариот среди прокариотических организмов было установлено, что наибольшее количество общих черт с эукариотическими клетками было выявлено у недавно открытой некультивируемой археи рода *Lokiarchaeota* входящим в суперфилум «Аsgard» [27].

В ходе эволюции (то есть превращения гипотетической эндосимбиотической альфа-протеобактерии в полноценную клеточную органеллу) в митохондриях произошла существенная редукция генома и протеома. Подавляющее большинство генов альфа-протеобактерии были либо потеряны, либо перемещены в геном клетки хозяина по неописанному к настоящему моменту механизму[28].

1.1.3 Общая молекулярная биология митохондрий

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что митохондрии разных групп эукариот существенно отличаются друг от друга как морфологически, так и на молекулярной уровне. Если провести попытку классификации митохондрий, в качестве основных их типов можно грубо выделить митохондрии млекопитающих, дрожжей, растений и простейших. Митохондрии организмов разных таксонов обладают своими уникальными

молекулярно-генетическими чертами, выраженными в основном в особенностях организации генома и регуляции транскрипции и трансляции. Так, например, количество генов в геноме митохондрий простейшего *Plasmodium falciparum* составляет всего 5, тогда как митохондриальный геном другого простейшего, *Reclinomonas americana*, содержит 97 генов. Размеры митохондриальных геномов также существенно отличаются у организмов различной таксономической принадлежности. Самый большой геном зарегистрирован у митохондрий высших растений *Silene conica* и составляет более 10 миллионов пар оснований. В среднем у высших растений величина митохондриального генома варьируется от 200 до 300 тысяч пар оснований, у млекопитающих не более 20 тысяч, и размер генома грибов колеблется от 30 до 90 тысяч пар оснований. Что касается организации генома митохондрий, то обычно он представляет собой кольцевую молекулу (в случае простейших – набор нескольких различных таких молекул) однако у некоторых простейших, водорослей и грибов были описаны линейные варианты организации генома [29].

Митохондриальный геном пекарских дрожжей состоит из 34 генов, 8 из которых кодируют белки, 24 - тРНК для митохондриальной трансляции и 2 - рибосомные РНК (21S и 15S). В митохондриальной ДНК пекарских дрожжей содержатся гены субъединиц дыхательного комплекса III – ген *C0B*, дыхательного комплекса IV – гены *COX1*, *COX2*, *COX3*, субъединицы АТФ-синтазы – гены *ATP6*, *ATP8*, *ATP9*, а также ген белка малой субъединицы миторибосомы *VAR1* (Рисунок 1). Как было сказано выше, геном митохондрий пекарских дрожжей содержит гены 24 тРНК, представляющих собой почти полный набор транспортных РНК для митохондриальной трансляции. Сам митохондриальный геном у пекарских дрожжей организован в виде кольцевой молекулы, но также детектируются и линейные фрагменты ДНК длиной от 75 до 150 тысяч пар оснований, которые рассматриваются как конкатемеры, состоящие из кратного количества копий генома. Их образование

предположительно является результатом амплификации по механизму катящегося кольца [30].

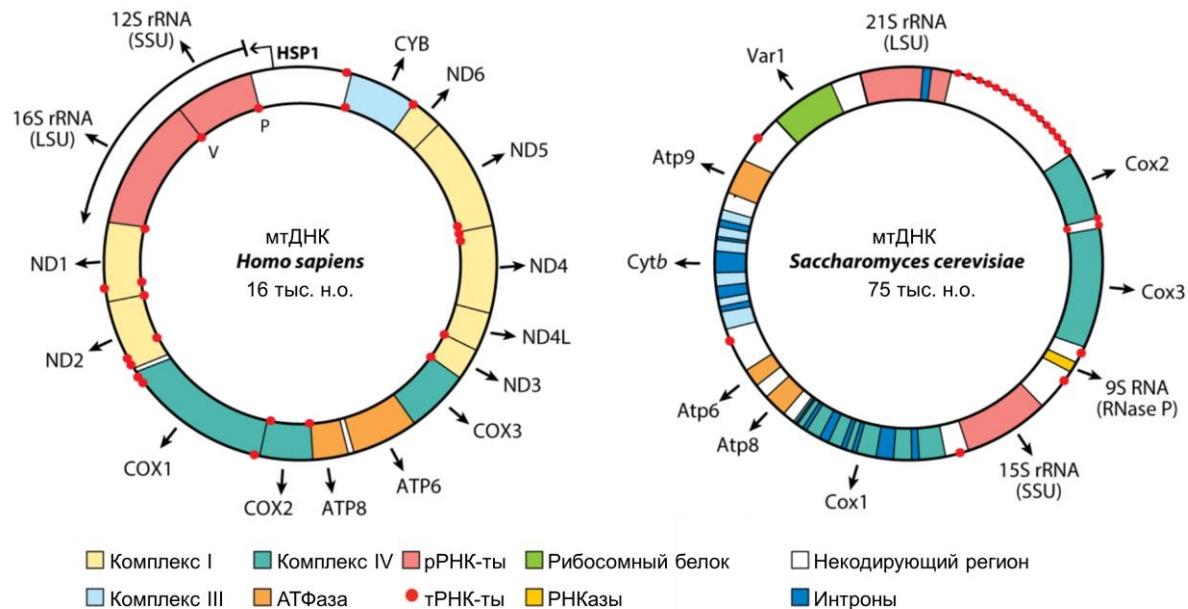


Рисунок 1 – Организация митохондриальных геномов человека и дрожжей.

Митохондриальный геном человека кодирует 2 рРНК, 22 тРНК и 11 мРНК. мРНК генов ND4/ND4L и ATP6/ATP8 являются бицистронными. Митохондриальный геном дрожжей кодирует 2 рРНК, 24 тРНК, 7 мРНК и 9S-компонент РНКазы Р. Несмотря на меньшее количество кодируемых белков, митохондриальный геном дрожжей почти в пять раз превышает по длине митохондриальный геном человека за счёт длинных некодирующих участков и наличия инtronов в трёх генах. Где: LSU – большая субъединица; рРНК – рибосомная РНК; SSU – малая субъединица; тРНК – митохондриальная транспортная РНК. Изображение взято из обзора Martin Ott et al [1].

Согласно последним данным, протеом митохондрий включает в себя около 1000 различных белков, точное количество которых варьирует от вида к виду. В частности, на сегодняшний день аннотировано 1205 белков, входящих в состав митохондриального протеома пекарских дрожжей, 14% из которых связывают с энергетическим метаболизмом, четверть белков - с поддержанием,

репликацией и экспрессией митохондриальной ДНК, 7% - с процессами, связанных с белковым импортом, процессингом и фолдингом [31].

Таким образом, митохондрии являются одними из ключевых, сложно организованных органелл эукариотических клеток и обладают высокой автономностью: содержат собственный геном и обладают собственными транскрипционным и трансляционным аппаратами.

1.2 Трансляция в митохондриях

Митохондрии играют ключевую роль в энергетическом метаболизме эукариотических клеток, обеспечивая синтез АТФ путем окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Для поддержания этой функции митохондрии сохранили собственную систему экспрессии генов, включая аппарат трансляции. Несмотря на значительное уменьшение числа генов в митохондриальным геноме в сравнении с бактерией-предшественником, некоторые белки, преимущественно субъединицы комплексов дыхательной цепи, продолжают синтезироваться внутри митохондрии, а не импортироваться из цитозоля. Этот феномен объясняется высокой гидрофобностью синтезируемых митохондриями субъединиц дыхательной цепи и необходимостью их котрансляционной интеграции в состав целевых комплексов. Важно отметить, что в митохондриях синтезируется всего около десятка белков (точное количество зависит от конкретного вида эукариот). Даный факт, возможно, влияет на характер организации трансляции и вносит в этот процесс специфические черты, присущие только митохондриям. К числу основных таких черт можно отнести (1) отличие структуры митохондриальных рибосом от структур бактериальных и цитозольных рибосом, (2) специфический для органелл состав белковых факторов трансляции, (3) наличие специальных белков – интеграз, способствующих котрансляционному встраиванию новосинтезируемых полипептидов, (4) наличие как минимум в некоторых митохондриальных системах мРНК-специфических белков-активаторов трансляции, (5) различия в организации матричных РНК в сравнении с бактериями и эукариотами. Фактически митохондриальная

трансляция нацелена исключительно на поддержание работоспособности дыхательной цепи, и биосинтез закодированных в митохондриях субъединиц дыхательных комплексов строго контролируется как в пространственном, так и во временном аспектах. Детально каждый аспект митохондриальной трансляции будет далее описан отдельно в настоящем обзоре. В данной главе особенности митохондриальной трансляции будут обсуждаться на примере этапов цикла трансляции в митохондриях различных организмов.

Трансляционный цикл в митохондриях включает в себя те же стадии, которые выделяют у бактерий и в цитоплазматической трансляции, а именно инициацию, элонгацию, терминацию и рециклинг (Рисунок 2).

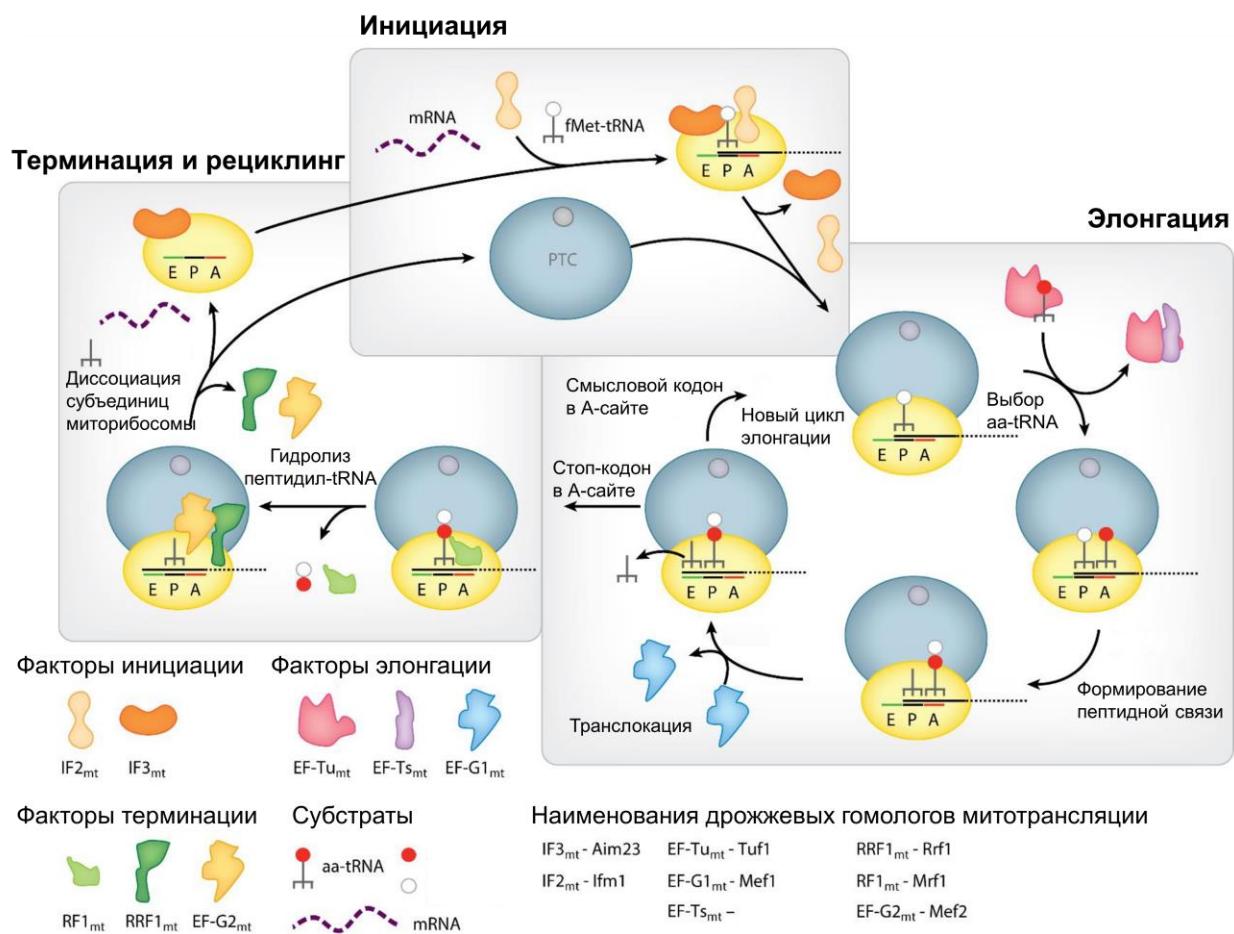


Рисунок 2 – Цикл трансляции в митохондриях млекопитающих.

Трансляция в митохондриях млекопитающих и дрожжей осуществляется в три универсальных этапа: инициация, элонгация и терминация. Каждый этап опосредован факторами трансляции, адаптированными для митохондрий.

Факторы инициации обеспечивают распознавание стартового кодона, расположенного в Р-сайте малой субъединицы рибосомы, с помощью инициаторной тРНК с формилированным метионином (белый кружок). После выбора стартового кодона к рибосоме присоединяется большая субъединица, а факторы инициации отделяются. Факторы элонгации доставляют тРНК, заряженные аминокислотой (красный кружок), в А-сайт рибосомы, где аминокислота присоединяется к растущей полипептидной цепи в пептидилтрансферазном центре (РТС), и происходит транслокация — скоординированное движение комплекса мРНК–тРНК через рибосому. Удлинение продолжается до тех пор, пока в А-сайт не поступает стоп-кодон. Стоп-кодоны распознаются факторами терминации, которые совместно с факторами рециркуляции гидролизуют связь между растущей цепью и тРНК в Р-сайте и разделяют рибосому на субъединицы для следующего цикла трансляции. Где: aa-тРНК – аминоацил-тРНК; сайт А – сайт входа для aa-тРНК; Е, Р, А – три сайта связывания тРНК; fMet-тРНК – формилированная инициаторная тРНК; мРНК – матричная РНК; РТС – пептидилтрансферазный центр; тРНК – транспортная РНК. Изображение взято из обзора Martin Ott et al [1].

Вместе с этим, митохондриальная трансляция обладает специфическими чертами, как для всех исследованных митохондрий в целом, так и на межтаксономическом уровне (между митохондриями различных эукариотических организмов). В частности, организация трансляции у млекопитающих и дрожжей имеют свои специфические особенности.

1.2.1 Инициация митохондриальной трансляции

Инициация митохондриальной трансляции у млекопитающих.

Инициация митохондриальной трансляции, так же, как и у бактерий, опосредуется специальными белковыми факторами. При этом в митохондриях млекопитающих не идентифицированы ортологи бактериального первого фактора инициации IF1. Однако второй фактор инициации mtIFMTIF2 обладает

дополнительным 37-аминокислотным доменом, который компенсирует отсутствие в митохондриях IF1, связываясь с местом на малой субъединице, где обычно действует IF1 [32]. Инициация трансляции возможна только с малой субъединицей рибосомы. Поэтому на стадии рециклинга, предшествующей инициации, третий фактор инициации mtIFMTIF3 связывается с малой субъединицей миторибосомы, предотвращая преждевременную ассоциацию с большой субъединицей. В результате формируется так называемый mtPIC-1 (митохондриальный преинициаторный комплекс 1) [33]. Затем mtIFMTIF2 присоединяется к комплексу mtPIC1, способствуя связыванию инициаторной тРНК (fMet-тРНК) с P-сайтом рибосомы (см. ниже) [34]. Интересно, что митохондриальная трансляция млекопитающих может иницироваться на трех различных стартовых кодонах: AUG, AUU и AUA [35]. Немаловажным аспектом трансляции в митохондриях млекопитающих является факт полного отсутствия 5'-нетранслируемых участков (5'-UTR) у мРНК. Поэтому возникает вопрос о точности размещения стартового кодона мРНК и в рибосоме в процессе инициации. Одним из возможных решений у млекопитающих является специальный белок пентатрикопептидного повтора (PPR), mS39, расположенный возле входа в канал мРНК, который, по всей вероятности, обеспечивает корректную установку 5'-концов мРНК в миторибосоме [36].

После ассоциации mtIFMTIF2 с комплексом PIC1 MTIF3 диссоциирует. В отличие от бактериального IF3, mtIFMTIF3 должен диссоциировать до связывания fMet-тРНК и мРНК для формирования полного инициаторного комплекса [32]. В митохондриях млекопитающих используется только один тип тРНК Met, которая формилируется для участия в инициации (fMet-тРНК Met), а в неформилированной форме способствует встраиванию остатков метионина в растущие полипептиды [35]. Присоединение мРНК и инициаторной fMet-тРНК знаменует формирование полного инициаторного комплекса и перехода к фазе элонгации.

Инициация митохондриальной трансляции у дрожжей.

Инициация митохондриальной трансляции у *S.cerevisiae*, как и митотрансляция в целом, схожа с трансляцией в митохондриях млекопитающих. В частности, также отсутствует гомолог первого фактора инициации, а его функция также делегирована второму фактору, вернее дополнительной вставке из 37 аминокислотных остатков. В качестве второго фактора инициации в митохондриях дрожжей функционирует белок Ifm1p – ГТФаза, способствующий связыванию инициаторной тРНК с малой субъединицей рибосомы [37]. Белок Aim23p, как было показано ранее в нашей лаборатории, является митохондриальным гомологом бактериального IF3, фактора, участвующего в диссоциации рибосомных субъединиц и распознавании стартового кодона [38]. При этом отсутствие Aim23p в дрожжевых митохондриях, как ни удивительно, приводит не к остановке митотрансляции, а всего лишь к ее разбалансировке.

Вместе с этим, трансляция в митохондриях дрожжей обладает специфическими чертами, не встречающимися у млекопитающих. В митохондриях дрожжей используется специализированная инициаторная тРНК (fMet-тРНК Met), которая формилируется для участия в инициации трансляции [37]. Это отличает дрожжевую систему от митохондрий млекопитающих, где используется единственная тРНК Met как для инициации, так и для элонгации [35]. Однако, главным отличием инициации трансляции у дрожжей в сравнении с млекопитающими является наличие протяженных 5'-нетранслируемых областей мРНК и большого набора белков, специфически активирующих трансляцию каждой конкретной мРНК.

Процесс инициации трансляции в митохондриях пекарских дрожжей можно разделить на несколько этапов:

1. Диссоциация миторибосомных субъединиц под действием Aim23p;
2. Связывание мРНК с малой субъединицей миторибосомы. Этот процесс часто опосредуется специфическими активаторами трансляции;
3. Сканирование 5'-UTR мРНК до обнаружения стартового кодона;

4. Связывание инициаторной fMet-tРНК Met в Р-сайте малой субъединицы при участии Ifm1p;

5. Присоединение большой субъединицы рибосомы и начало элонгации.

Важно отметить, что этот процесс существенно отличается от бактериальной системы, где инициация опосредуется взаимодействием последовательности Шайна-Дальгарно на мРНК с комплементарной последовательностью 16S рРНК [39].

В ходе недавних исследований митохондриального протеома дрожжей был найден и идентифицирован новый фактор инициации трансляции в митохондриях – Dpc29, согласно биоинформационическим данным являющийся ортологом человеческого белка TACO1 [39].

Исследования показали, что Dpc29p является общим фактором митохондриальной трансляции, а не специфическим активатором COX1, как это происходит в случае человеческого белка TACO1. Делеция гена *dpc29* влияет на экспрессию всех митохондриально-кодируемых генов OXPHOS. В клеточных линиях *dpc29Δ* наблюдалось увеличение количества рибосом на 3'-концах мРНК, что предполагает нарушения процессов элонгации и терминации трансляции. Вместе с этим, замена Dpc29p человеческим гомологом TACO1 способна компенсировать отсутствие оригинального белка, что свидетельствует о высокой консервативности функций этих белков.

1.2.2 Элонгация митохондриальной трансляции

Элонгация митохондриальной трансляции у млекопитающих

Процесс элонгации является ключевым этапом синтеза белка, во время которого растущая полипептидная цепь удлиняется на одну аминокислоту за один цикл элонгации. Этот процесс катализируется рибосомой, а также требует участия специализированных факторов элонгации. В митохондриях млекопитающих идентифицированы три основных фактора элонгации: mtEF-Tu, mtEF-Ts и mtEF-G1. mtEF-Tu играет ключевую роль в доставке аминоацил-тРНК в А-сайт миторибосомы. После образования тройственного комплекса

mtEF-Tu- ГТФ-аа-тРНК и доставки аминоацил-тРНК в А-сайт миторибосомы происходит гидролиз ГТФ и высвобождение комплекса ГДФ - mtEF-Tu.

mtEF-Tu характеризуется около 60% идентичностью аминокислотной последовательности с бактериальным EF-Tu, что отражает эволюционное происхождение митохондрий от бактерий [34]. Вместе с этим, по литературным данным mtEF-Tu млекопитающих не может эффективно взаимодействовать с бактериальными тРНК, и наоборот, бактериальный EF-Tu не способен поддерживать элонгацию в системе митохондриальной трансляции, что говорит о специфической адаптации митохондриального фактора к митохондриальным тРНК, обладающим уникальными структурными особенностями в сравнении с бактериальными [40].

Замена ГДФ на ГТФ в комплексе с mtEF-Tu опосредуется фактором элонгации mtEF-Ts. В результате комплекс ГДФ- mtEF-Tu вновь становится тройственным комплексом mtEF-Tu-ГТФ-аа-тРНК. В отличие от бактериальной системы, где EF-Tu и EF-Ts существуют как отдельные белки, в митохондриях млекопитающих mtEF-Tu и mtEF-Ts образуют стабильный долгоживущий гетеродимерный комплекс. Этот комплекс диссоциирует только в присутствии ГТФ и аминоацил-тРНК [40]. Такая организация может способствовать более эффективному циклу регенерации mtEF-Tu в условиях ограниченного пространства митохондриального матрикса.

После аккомодации аминоацил-тРНК в А-сайте пептидилтрансферазный центр миторибосомы катализирует образование пептидной связи между растущей полипептидной цепью, находящейся на пептидил-тРНК в Р-сайте, и аминокислотой на аминоацил-тРНК в А-сайте. Этот процесс приводит к удлинению полипептидной цепи на один аминокислотный остаток и переносу всей цепи на тРНК в А-сайте. Считается, что данная стадия элонгации (транспептидация) в митохондриях происходит практически точно так же, как и бактерий. Это происходит в том числе благодаря тому, что пептидилтрансферазный центр митохондриальных рибосом сохранил высокую степень структурной и функциональной схожести с бактериальными

рибосомами, что указывает на универсальность механизма формирования пептидной связи.

После образования пептидной связи необходимо переместить пептидил-tРНК из А-сайта в Р-сайт и продвинуть мРНК на один кодон для подготовки к следующему циклу элонгации. Этот процесс катализируется фактором mtEF-G1.

mtEF-G1 связывается с миторибосомой, находясь в комплексе с ГТФ. Гидролиз ГТФ обеспечивает энергию для конформационных изменений в миторибосоме, которые приводят к перемещению пептидил-tРНК из А-сайта в Р-сайт, продвижению мРНК на один кодон, а также перемещению деацилированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт.

Недавние структурные исследования с использованием криоэлектронной микроскопии выявили уникальные особенности взаимодействия mtEF-G1 с миторибосомой млекопитающих. Было показано, что mtEF-G1 обладает дополнительным С-концевым доменом, отсутствующим у бактериального EF-G. Этот домен участвует в специфических взаимодействиях с миторибосомой и играет важную роль в адаптации процесса транслокации к уникальной структуре митохондриальных рибосом [41]. Также было обнаружено, что малая субъединица митохондриальной рибосомы совершает не только вращательное движение относительно большой субъединицы (как в бактериальных рибосомах), но и дополнительное "качающееся" движение. Высказываются предположения, что это может быть связано с необычными структурами митохондриальных тРНК и мРНК.

Как и любой другой этап процесса в живой клетке, элонгация митохондриальной трансляции подвергается регуляции в целях удовлетворения текущих нужд клетки. В частности, в условиях ограниченной доступности определенных аминоацил-tРНК скорость элонгации может замедляться на соответствующих кодонах (как и у бактерий). Это может играть роль в координации скорости синтеза белка с доступностью аминокислот и энергетическим состоянием митохондрий. Другой способ регуляции элонгации

может осуществляться за счет белок-белковых взаимодействий. Например, было показано, что белок Mrps27, компонент малой субъединицы митохондриальной рибосомы, взаимодействует с mtEF-Tu и может модулировать его активность [42]. Такие взаимодействия могут обеспечивать тонкую настройку процесса элонгации в зависимости от физиологического состояния митохондрий. Немаловажны и посттрансляционные модификации факторов элонгации. Фосфорилирование mtEF-Tu может изменять его аффинность к ГТФ и аминоацил-tРНК, тем самым регулируя эффективность доставки аминоацил-tРНК к рибосоме [43].

Элонгация митохондриальной трансляции у дрожжей

Механизмы элонгации митохондриальной трансляции у дрожжей и млекопитающих имеют много общего, но известны также и различия между ними. В частности, у *Saccharomyces cerevisiae* не найден ортолог EF-Ts, в то время как в *Schizosaccharomyces pombe* (как и у млекопитающих) этот фактор имеется [44]. Вероятно, у *S. cerevisiae* сформировался альтернативный механизм регенерации EF-Tu, который, однако же, до сих пор не описан. Возможно также, что в митохондриях пекарских дрожжей все же существует пока что не идентифицированный фактор EF-Ts [45].

В митохондриях дрожжей обнаружены два паралога EF-G: mtEF-G1 и mtEF-G2. mtEF-G1 участвует в элонгации, в то время как mtEF-G2 предположительно участвует в рециклинге рибосом [34].

Для обеспечения точности и эффективности митохондриальной трансляции в клетках дрожжей существуют специальные механизмы контроля качества. Одним из ключевых компонентов этой системы является рибосомо-ассоциированный контроль качества (RQC).

В дрожжах ключевым сенсором остановки трансляции и координатором последующей терминации остановленной трансляции и удаления дефектных продуктов трансляции является белок Hel2. Его гомолог в клетках млекопитающих, ZNF598, также играет важную роль в контроле качества трансляции и поддержании митохондриального гомеостаза. Интересно

отметить, что уровень ZNF598 повышается при митохондриальном стрессе, а его сверхэкспрессия защищает клетку от митохондриального стресса. Это указывает на тесную связь между механизмами контроля качества трансляции и митохондриальной функцией [46].

Элонгация митохондриальной трансляции в клетках дрожжей представляет собой сложный и тонко регулируемый процесс, который тесно связан с общим метаболизмом клетки, энергетическим статусом и ответом на стресс. Координация между ядерной и митохондриальной генетическими системами, локализация мРНК, механизмы контроля качества трансляции и альтернативные пути митохондриального дыхания играют важную роль в обеспечении эффективности и точности митохондриальной трансляции.

Дальнейшие исследования в этой области могут быть направлены на более детальное изучение механизмов регуляции элонгации митохондриальной трансляции в ответ на различные физиологические и стрессовые условия, а также на выяснение роли этого процесса в общей адаптации дрожжевых клеток к изменяющимся условиям окружающей среды.

1.2.3 Терминация митохондриальной трансляции и рециклинг миторибосом

Терминация митохондриальной трансляции у млекопитающих

Терминация трансляции является критическим этапом в процессе синтеза белка, обеспечивающим корректную остановку биосинтеза белка и высвобождение синтезированного полипептида из рибосомы. В митохондриях млекопитающих этот процесс имеет ряд особенностей, отличающих его от терминации в цитоплазме и бактериях.

Одной из ключевых особенностей митохондриальной трансляции у млекопитающих является использование нестандартного генетического кода. В отличие от универсального генетического кода, в митохондриях млекопитающих используются только два стоп-кодона: UAA и UAG [47]. Кодон UGA, который в универсальном коде является стоп-кодоном, в митохондриях кодирует триптофан [1]. Эта особенность генетического кода

митохондрий имеет важные последствия для процесса терминации трансляции. Факторы терминации должны быть способны распознавать только два стоп-кодона, что отличается от ситуации в цитоплазме, где используются все три стоп-кодона.

В митохондриях млекопитающих были идентифицированы четыре предполагаемых фактора терминации трансляции (MTRF1A, MTRF1, MRPL58 (ICT1, mL62), MTRFR (C12ORF65)) на основе их гомологии с известными бактериальными терминационными факторами (RF) и наличия важного консервативного катализического мотива GGQ. При этом MTRF1A и MTRF1 содержат все домены, найденные в канонических RF, в то время как MTRFR и MRPL58 (ICT1) не имеют домена распознавания стоп-кодона [20].

MTRF1A считается основным фактором терминации в митохондриях млекопитающих. Он распознает канонические стоп-кодоны UAA и UAG. Недавние исследования с помощью крио-электронной микроскопии пролили свет на функционирование MTRF1A со структурной точки зрения [48]. MTRF1A связывается с миторибосомой в A-сайте против UAA и UAG кодонов. При распознавании стоп-кодона MTRF1A претерпевает конформационные изменения, которые позиционируют его катализический мотив GGQ в пептидил-трансферазном центре (PTC) рибосомы. Это позиционирование позволяет MTRF1A катализировать гидролиз эфирной связи между синтезируемым пептидом и тРНК в P-сайте, что приводит к высвобождению полностью синтезированного белка.

Структура домена пептидил-тРНК-гидролазного домена (PTH) фактора MTRF1A высоко консервативна и включает мотив GGQ, в котором остаток глутамина метилирован. В результате этого существенно возрастает катализическая активность фермента. Предполагается также, что метилирование мотива GGQ важно для контролируемых конформационных изменений белка, необходимых для распознавания стоп-кодона [20].

MTRF1 представляет собой специализированный фактор, необходимый для терминации синтеза белка на нестандартных митохондриальных стоп-

кодонах AGA и AGG, которые встречаются в генах *COX1* и *ND6* соответственно. MTRF1 способствует высвобождению зрелого белка COX1 при остановке рибосомы на нестандартных стоп-кодонах, для которых отсутствуют соответствующие митохондриальные тРНК. При дефиците MTRF1 наблюдается торможение работы миторибосом на этих кодонах и может отмечаться недостаточность комплекса цитохрома с оксидазы (комплекс IV) [49].

В то же время терминация трансляции мРНК *ND6* преимущественно обеспечивается каноническим митохондриальным фактором MTRF1A, а не MTRF1. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при делеции или подавлении экспрессии MTRF1 синтез белка ND6 и уровень его мРНК практически не изменяются, несмотря на блокировку рибосомы на кодоне AGG в отсутствие MTRF1. Установлено, что MTRF1A распознаёт сдвиговый стоп-кодон UAG, возникающий в результате –1 фреймшифта рибосомы в области терминации ND6, что соответствует его специфичности к стоп-кодонам UAA и UAG [49].

Таким образом, несмотря на способность MTRF1 обеспечивать терминацию на кодонах AGA и AGG *in vitro*, его физиологическая роль в завершении трансляции ND6 *in vivo* ограничена. Ключевую роль в терминации играют MTRF1A и механизм фреймшифтинга рибосомы. Отсутствие MTRF1 не приводит к существенному снижению уровня белка или мРНК *ND6*, что свидетельствует о наличии резервных или альтернативных путей терминации трансляции для гена *ND6* [49].

В митохондриях млекопитающих, как и у бактерий и в цитоплазме эукариот, описаны случаи незапрограммированной терминации трансляции, вызываемые преимущественно обрывами молекул мРНК. Подобные ситуации приводят к некорректной остановке работы рибосом и нарушению трансляционного цикла. В таких случаях в процесс митотрансляции у млекопитающих включаются специальные «факторы спасения» (ribosome rescue factors), не имеющие доменов распознавания стоп-кодонов, но

обладающие пептидил-тРНК-гидролизирующей активностью. К таким специальным факторам терминации относятся MRPL58 (ICT1, mL62) и MTRFR.

MRPL58 – уникальный фактор, фактор спасения остановившихся миторибосом, фактически являющийся структурным миторибосомным белком большой субъединицы [20, 21, 48]. Механизм спасения включает в себя стадию распознавания миторибосомы с вакантным А-сайтом, катализ гидролиза пептидил-тРНК и высвобождение синтезируемого пептида из Р-сайта. Такой механизм, помимо всего прочего, содействует рециркуляции компонентов миторибосомы для последующих раундов трансляции.

MTRFR (C12ORF65) – еще один фактор, который может быть вовлечен в спасение остановившихся миторибосом. MTRFR, как и MRPL58, не имеет домена распознавания кодона. Хотя точная функция MTRFR как фактора спасения не описана, результаты некоторых исследований позволяют предположить его участие в спасении миторибосом в отсутствие MTRF1. Эта гипотеза требует дальнейшего исследования, так как полученные результаты были до некоторой степени противоречивыми [21].

Рециклинг миторибосом у млекопитающих

После терминации миторибосомы, как и любые другие рибосомы, должны быть повторно использованы в новых раундах трансляции. Этот процесс получил название «рециклинг» (от англ. recycling); в митохондриях млекопитающих он опосредуется несколькими специализированными факторами, а именно митохондриальным фактором рециркуляции рибосом (MT-RRF) и специализированным фактором элонгации EFG2 (mtEFG2). Также в соответствующие процессы вовлечен недавно описанный белок GTPBP6 [50, 51].

Митохондриальный фактор рециклинга рибосом (MT-RRF) является ключевым участником процесса рециклинга. Как и все прочие факторы митохондриальной трансляции, он кодируется ядерным геном *MTRRF* и после окончания своего синтеза в цитозоле импортируется в митохондрии. *MTRRF*

обладает гомологией с бактериальным белком Rrf, но в то же время содержит и уникальные участки, в частности N-концевое удлинение из 80 аминокислот, отсутствующее у бактериальных гомологов. Любопытно, что MTRRF может эффективно ассоциироваться не только с митохондриальными рибосомами млекопитающих, но и с бактериальными рибосомами, причем *in vitro* и *in vivo* [51, 52].

Рециклинг миторибосом является энергозатратным процессом и требует гидролиза ГТФ. В отличие от бактерий, которые используют ГТФазу EF-G как в элонгации, так и в рециклинге, в митохондриях млекопитающих идентифицированы два специализированных фактора: MT-EFG1 и MT-EFG2. Первый из них участвует в элонгации трансляции (см. выше), а второй взаимодействует исключительно с МТ-RRF для катализа рециклинга миторибосом [51].

Что касается самого механизма рециклинга, то его можно условно разделить на несколько этапов. Началом рециклинга принято считать высвобождение новосинтезированного полипептида. После высвобождения образуется так называемый посттерминационный комплекс, состоящий двух субъединиц миторибосомы и ассоциированных с ними тРНК и мРНК. Далее с таким комплексом связывается МТ-RRF, после чего привлекается фактор МТ-EFG2. Связывание этих факторов вызывает конформационные изменения миторибосомы. Фактор МТ-EFG2 гидролизует ГТФ, обеспечивая энергию, необходимую для диссоциации миторибосомных субъединиц. Диссоциация приводит к высвобождению мРНК и деацилированной тРНК. По результатам недавних структурных исследований было сделано предположение о том, что деацилированная тРНК может оставаться связанной со свободной 39S субъединицей. Это указывает на иную последовательность событий в рециклинге миторибосом по сравнению с бактериями. Чтобы предотвратить преждевременную реассоциацию миторибосомных субъединиц, дополнительные факторы могут связываться со свободными субъединицами, подготавливая их к следующему раунду инициации трансляции [53, 54, 48].

Роль недавно открытого фактора GTPBP6 в рециклине рибосом на сегодняшний день до конца не установлена. Согласно последним данным, GTPBP6 играет уникальную двойную роль в митохондриальной трансляции, участвуя как в рециклине рибосом, так и в их биогенезе. Этот белок GTPBP6 может способствовать диссоциации «пустых» 55S миторибосом на субъединицы. В условиях стресса GTPBP6 может способствовать рециклину рибосом, остановившихся во время трансляции до прохождения стоп-кодона. Также GTPBP6 участвует в поздних стадиях сборки большой субъединицы миторибосомы mtLSU[50].

Терминация митохондриальной трансляции и рециклинг рибосом у дрожжей

Терминация трансляции в митохондриях дрожжей осуществляется по механизму, схожему с таким в митохондриях млекопитающих, однако между двумя данными процессами существуют значимые различия.

Основным фактором, ответственным за терминацию трансляции в митохондриях дрожжей, является митохондриальный фактор терминации 1 (Mrf1), кодируемый ядерным геном *MRF1*. Этот белок распознает стоп-кодоны и катализирует высвобождение завершенной полипептидной цепи из рибосомы. В отличие от млекопитающих, митохондриальные транскрипты дрожжей содержат только два канонических стоп-кодона (UAA и UAG) [55]. Неканонические стоп кодоны AGA и AGG, как у млекопитающих, у дрожжей выявлены не были.

Исследования последних лет выявили в митохондриях дрожжей гомологи белков млекопитающих, участвующих в спасении миторибосом. Так, дрожжевой белок, кодируемый геном *pth3*, функционально аналогичен белку млекопитающих MT-RFR (C12ORF65) и осуществляет спасение остановившихся миторибосом *Saccharomyces cerevisiae*. Другой фактор, Pth4, также участвует в этом процессе, однако его функция описана не до конца. Эксперименты *in vitro* показали, что Pth3 эффективно гидролизует пептидил-

тРНК на рибосомах, застрявших как на «незавершенных» мРНК (non-stop), так и на мРНК, связанных с соответствующими антибиотиками (no-go) [56].

Процесс рециклинга миторибосом дрожжей также схож с аналогичными процессами в митохондриях млекопитающих. У дрожжей основным фактором, участвующим в рециклинге митохондриальных рибосом, является Rrf1p, кодируемый геном *rrf1* (ранее известным как *fill*). Этот белок обладает существенным процентом идентичности аминокислотной последовательности с фактором рециркуляции бактериальных рибосом. Важность Rrf1p подчеркивается тем фактом, что делеция гена *rrf1* приводит к нарушению дыхания и нестабильности митохондриального генома [57]. В митохондриях дрожжей, как и у млекопитающих, были идентифицированы гомологи RRF и IF3; помимо этого, известны также два гомолога EF-G, один из которых (Mef1) действует на стадии элонгации, а другой (Mef2) - на стадии рециклинга [58].

1.2.4 Заключительные замечания о трансляции в митохондриях

Митохондриальная трансляция представляет собой сложный и тонко регулируемый процесс, играющий важнейшую роль в функционировании эукариотических клеток. Несмотря на происхождение митохондрий от альфа-протеобактерий, механизмы, лежащие в основе митохондриальной трансляции, существенно дивергировали от реализующихся при биосинтезе белка у прокариот. Главной отличительной особенностью митохондриальной трансляции является ее утилитарность, а именно адаптированность под биосинтез белков ОXPHOS, которые являются высокогидрофобными мембранными белками. Как следствие, для митохондриальной трансляции характерны специфические механистические черты, не имеющие аналогов ни у бактерий, ни в цитозоле эукариот. К числу самых ярких таких черт следует отнести котрансляционную интеграцию полипептидов во внутреннюю мембрану, скоординированную трансляцию нескольких транскриптов субъединиц комплексов дыхательной цепи, использование только двух канонических стоп-кодонов (UAA и UAG), наличие только двух факторов инициации (второго и третьего), существенно редуцированные регуляторные

области мРНК и уникальные механизмы точного позиционирования стартовых кодонов в процессе инициации.

Вместе с этим, наблюдается существенная дивергенция в механизмах митохондриальной трансляции и между различными группами эукариот. В частности, у дрожжей в митохондриальной трансляции участвует группа уникальных белков - трансляционных активаторов, распознающих 5'-нетранслируемые области мРНК. В то же время, у млекопитающих максимальная длина 5'-UTR в митохондриальных мРНК составляет 3 нуклеотида, что предполагает альтернативные механизмы регуляции инициации трансляции.

Важным аспектом митохондриальной трансляции является контроль качества синтезируемых белков. У дрожжей и млекопитающих обнаружены механизмы спасения застрявших рибосом, включающие факторы, подобные бактериальным ArfA и ArfB. Эти механизмы играют важную роль в поддержании гомеостаза митохондрий и защите митохондрий от стресса.

Дальнейшие исследования механизмов митохондриальной трансляции и их регуляции как у дрожжей, так и у млекопитающих, могут способствовать лучшему пониманию процессов тонкой регуляции биосинтеза в митохондриях. Особый интерес представляет изучение эволюционных адаптаций систем митохондриальной трансляции у разных организмов и их роли в поддержании функций митохондрий в различных физиологических условиях.

1.3 Активаторы трансляции в митохондриях дрожжей

Митохондрии, являясь основными энергетическими органеллами эукариот, зависят от специализированной системы трансляции для синтеза белков, кодируемых их редуцированным геномом. У *Saccharomyces cerevisiae* митохондриальная ДНК кодирует всего восемь белков, семь из которых являются высокогидрофобными субъединицами комплексов дыхательной цепи (OXPHOS). В отличие от бактериальных или цитоплазматических систем трансляции, в митохондриальной трансляции у дрожжей участвует набор специфичных к мРНК трансляционных активаторов (ТА), которые

компенсируют отсутствие в дрожжевых митохондриальных мРНК последовательностей Шайна-Дальгарно и обеспечивают точную координацию между процессами трансляции, встраивания новосинтезируемых белков во внутреннюю мембрану органелл и сборкой комплексов дыхательной цепи.

Митохондриальные рибосомы дрожжей структурно отличаются от бактериальных и цитоплазматических рибосом, содержат 73 белка и 15S pРНК в малой субъединице (mtSSU) и 21S pРНК в большой субъединице (mtLSU) [14]. При этом, как ни удивительно, гомологи бактериальных факторов инициации IF2 и IF3, присутствующие в митохондриях дрожжей, не играют определяющей роли в процессах инициации трансляции [59, 60]. Вместо этого инициация трансляции в митохондриях дрожжей сильно зависит от ТА, которые связываются с 5'-нетранслируемыми участками (UTR) митохондриальных мРНК и рекрутируют к ним миторибосому. Эти ТА часто закреплены во внутренней мемbrane митохондрий, обеспечивая котрансляционное встраивание синтезируемых белков в липидный бислой [61].

1.3.1 Активаторы мРНК *COX1* (Pet309, Mss51, Mam33)

Субъединица 1 цитохром с-оксидазы (Cox1), кодируемая митохондриальным геном *COX1*, является каталитическим ядром комплекса IV у *Saccharomyces cerevisiae*. Её синтез строго регулируется трансляционными активаторами Pet309, Mss51 и Mam33, которые стабилизируют мРНК, привлекают к ней миторибосомы и координируют котрансляционную сборку комплекса IV (Рисунок 3).

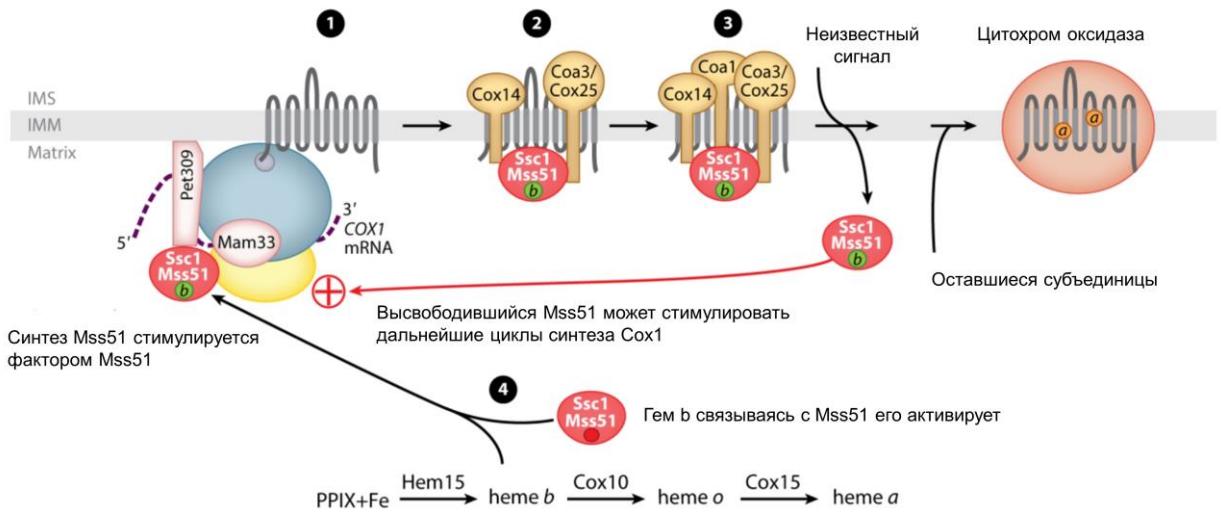


Рисунок 3 – Регуляция синтеза субъединицы 1 цитохром-оксидазы (Cox1).

(1) Для синтеза Cox1 необходимы белки Mam33, Pet309 и Mss51. (2) Вновь синтезированная Cox1 взаимодействует с Mss51 и другими факторами сборки. (3) Связывание Cox1 с промежуточным продуктом сборки полностью блокирует функцию Mss51. Высвобождение Mss51 из связи с Cox1 происходит под действием неизвестного сигнала, после чего Mss51 может инициировать новые циклы синтеза Cox1. Если сборка останавливается, Mss51 задерживается на промежуточной стадии и не может активировать трансляцию мРНК COX1. (4) При достаточном количестве гема *b* он связывается с соответствующим сайтом (маленький красный кружок) и активирует Mss51. При отсутствии синтеза гема *b* кофактор Cox1 — гем *a* — становится недоступен для сборки, что приводит к снижению экспрессии Cox1. Где: Cox1 — факторы сборки цитохром-с-оксидазы; Hem15 — фермент, катализирующий встраивание двухвалентного железа в протопорфирин IX; IMM — внутренняя митохондриальная мембрана; IMS — межмембранные пространства; Mam33, Mss51 и Pet309 — специфические активаторы трансляции мРНК COX1; PPIX — протопорфирин IX; Ssc1 — митохондриальный шаперон класса Hsp70. Изображение взято из обзора Martin Ott et al [1].

Pet309, белок с 12 пентатрикопептидными повторами (PPR), связывается с 5'-UTR мРНК COX1 и взаимодействует с миторибосомой через свой N-концевой домен. Исследования, проведенные методом криоэлектронной микроскопии, показывают, что Pet309 стабилизирует SSU рядом с кодоном инициации, обеспечивая узнавание лидерной мРНК COX1. Его PPR-мотивы формируют туннель для мРНК; показаны конкретные аминокислотные остатки PPR-мотивов, критичные для связывания мРНК [62].

Mss51 обладает как активаторной, так и шаперонной активностью, сопрягая синтез белка Cox1 со сборкой цитохром с-оксидазы. Mss51 связывается как с рибосомами, так и с растущим Cox1, формируя так называемую петлю обратной связи: в случае нарушений интеграции Cox1 в комплекс цитохром с-оксидазы (комплекс IV) синтез новых молекул Cox1 становится невозможным. Тем самым, предотвращается накопление токсичных несобранных белковых комплексов [63].

Mam33, третий активатор, обеспечивает синтез Cox1 при переходе от брожения к дыханию и защищает клетку от респираторного стресса [64].

1.3.2 Активатор мРНК COX2 (Pet111)

Синтез субъединицы II цитохром с-оксидазы (Cox2) в митохондриях пекарских дрожжей строго регулируется трансляционным активатором Pet111, который обеспечивает тесное функциональное сопряжение регуляции стабильности мРНК, привлечения миторибосом и котрансляционного встраивания в мембрану.

Pet111 содержит пентатрикопептидные повторы (PPR-мотивы), обеспечивающие связывание с мРНК [17]. Он взаимодействует с двумя участками мРНК COX2, а именно с 5'-UTR в районе 54-нуклеотидного участка, который критически важен для привлечения миторибосомы, и с участком на кодирующей последовательности, в области между 58-м и 95-м нуклеотидами [65]. Pet111 закреплен во внутренней мемbrane митохондрий, позиционируя рибосомы для ко-трансляционного встраивания Cox2. Это «двойное» связывание предотвращает образование вторичных структур, мешающих

доступу рибосомы, и обеспечивает инициацию. Pet111 взаимодействует с Aim23p (ортологом бактериального третьего фактора инициации), и такое взаимодействие необходимо для эффективной трансляции мРНК *COX2* [66]. При этом сверхэкспрессия Pet111 компенсирует отсутствие Aim23p, в дрожжевых митохондриях, что подчеркивает функциональную дивергенцию Aim23p от канонического фактора инициации.

1.3.3 Активаторы мРНК *COX3* (Pet54, Pet122, Pet494)

Субъединица III цитохром с-оксидазы (Cox3), кодируемая митохондриальным геном *COX3*, является ключевым компонентом комплекса IV (цитохром с-оксидаза) у *Saccharomyces cerevisiae*. Её синтез зависит от трансляционных активаторов, которые обеспечивают точную координацию между трансляцией и котрансляционным встраиванием синтезируемого полипептида в мембрану. Трансляция мРНК *COX3* требует кооперативной работы Pet54, Pet122 и Pet494, формирующих комплекс на внутренней мембране [67, 68].

Pet54 обладает двумя биологическими функциями. Помимо функционирования в качестве трансляционного активатора (связывание с 5'-UTR *COX3* и способствует привлечению миторибосом в комплекс с Pet122 и Pet494) [67, 61], этот белок участвует в процессинге мРНК *COX1*, а именно способствует сплайсингу интрана aI5β в данной мРНК [69].

Pet122 взаимодействует с большой субъединицей рибосомы через С-концевой домен, способствуя корректному позиционированию мРНК *COX3* на миторибосоме [70, 71]. Этот С-концевой домен имеет существенное сходство с бактериальной аланил-тРНК-синтетазой, что предполагает способность связывать АТФ и/или РНК; однако соответствующие активности белка Pet122 на сегодняшний день не выявлены. Миссенс-мутации (например, G211V) подавляют дефекты Pet54, что говорит о функциональной синергии двух данных активаторов [72].

Pet494 прочно связан с внутренней мембраной митохондрий, обеспечивая ко-трансляционное встраивание синтезируемого полипептида Cox3. Pet494

связывается с Pet54 через свой N-концевой домен, формируя тем самым ассоциированный с мембраной тройственный комплекс (с участием Pet122) [67, 73]. Этот комплекс специфически связывается с комплексом IV, находящимся в промежуточных состояниях сборки. Тем самым блокируется возможность синтеза Cox3, поскольку все активаторы присутствуют в митохондриях дрожжей в крайне малых количествах, и в те моменты, когда тройственный комплекс связан с недособранным комплексом IV, свободных молекул активаторов для связи с мРНК COX3 не имеется. После окончания сборки комплексом IV тройственный комплекс отсоединяется от него, и Pet54, Pet122 и Pet494 получают возможность участвовать в трансляции, реализуя тем самым еще одну петлю обратной связи, аналогичную описанной выше [74].

1.3.4 Активаторы мРНК COB (Cbs1, Cbs2, Cbp1, Cbp3, Cbp6)

Ген *COB* у *Saccharomyces cerevisiae* кодирует цитохром b - ключевую субъединицу комплекса III дыхательной цепи (убихинон-цитохром c-редуктазы). Трансляция мРНК *COB* зависит от целого ряда трансляционных активаторов, стабилизирующих мРНК, привлекающих к ней миторибосомы и координирующих биосинтез белка со сборкой комплекса III (Рисунок 4).

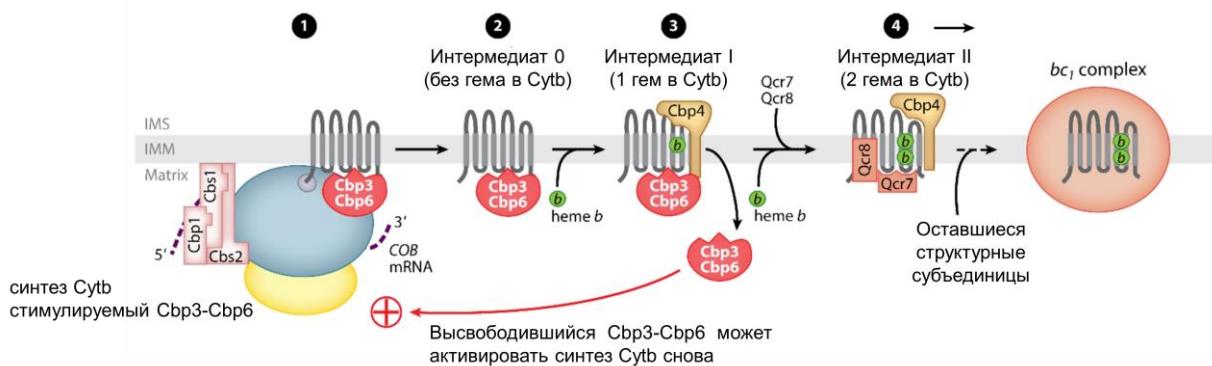


Рисунок 4 – Трансляционная регуляция синтеза цитохрома b (Cytb).

(1) Синтез Cytb требует взаимодействия Cbs1, Cbs2, Cbp1 и комплекса Cbp3–Cbp6 с митохондриальной рибосомой. (2) После завершения синтеза Cytb комплекс Cbp3–Cbp6 связывается с вновь синтезированным белком и отделяется от миторибосомы. (3) Cytb получает первый гем b и совместно с фактором сборки Cbp4 образует промежуточный продукт I на

ассемблировочной линии Сytb. (4) После полного гемилирования Сytb комплекс Cbp3–Cbp6 высвобождается для взаимодействия с первыми закодированными в ядре субъединицами комплекса bc1 (Qcr7 и Qcr8). Освобождённый комплекс Cbp3–Cbp6 может запускать новые циклы синтеза Сytb. В случаях блокировки сборки или отсутствия гема b комплекс Cbp3–Cbp6 удерживается на промежуточных стадиях и не может инициировать синтез Сytb. Где: bc1-комплекс – комплекс III дыхательной цепи; Cbs1 и Cbs2 – активаторы трансляции мРНК COB; Cbp1 – фактор стабилизации мРНК цитохрома b; Cbp3–Cbp6 – активатор трансляции мРНК COB и сборочный фактор; COB – мРНК, кодирующая цитохром b; IMM – внутренняя митохондриальная мембрана; IMS – межмембранные пространство. Изображение взято из обзора Martin Ott et al [1].

Интегральный мембранный белок **Cbs1**, абсолютно необходимый для инициации трансляции мРНК *COB* [75], взаимодействует с GC-богатыми регионами 5'-UTR данной мРНК, способствуя привлечению миторибосомы [76].

Ассоциированный с мембраной белок **Cbs2**, N-конец которого интегрирован во внутреннюю мембрану митохондрии, участвует в позиционировании старт-кодона мРНК *COB* за счет связывания с большой субъединицей миторибосомы [77]. Активность Cbs2 дополнительно регулируется белком Mrx4, однако молекулярные механизмы такой регуляции остаются неизвестными.

Белок **Cbp1** участвует в стабилизации мРНК *COB* за счет связывания с CCG-мотивом в 5'-UTR мРНК, предотвращая тем самым ее деградацию [78].

Комплекс **Cbp3-Cbp6** обладает двумя функциями, первая из которых – это трансляционная активация. Комплекс повышает процессивность рибосомы при синтезе цитохрома b и, что более важно, обеспечивает работу петли обратной связи, прочно взаимодействуя с интермедиатами сборки комплекса III. Вторая функция данного комплекса – шаперонная; он связывает синтезируемый

цитохром b, обеспечивая его корректное встраивание во внутреннюю мембрану и интеграцию в собираемый комплекс III [79].

Mrx4 является молекулярным переключателем, регулирующим трансляцию *COB*. Mrx4 связывается с Cbs2 и репрессирует трансляцию при низком энергетическом статусе клетки [77].

1.3.5 Активаторы мРНК генов АТФ-сингтазы (*ATP6/ATP8, ATP9*)

В митохондриальном геноме пекарских дрожжей закодированы гены субъединиц F1-АТФ-сингтазы: *ATP6*, *ATP8* и субъединицы F0 - *ATP9*. Необходимо отметить, что белки Atp6 и Atp8 синтезируются с единственной в дрожжевых митохондриях бицистронной мРНК, обозначаемой как *ATP6/ATP8*. Так же, как и в случае трансляции мРНК генов субъединиц комплекса IV и III, трансляция мРНК *ATP6-ATP8* и *ATP9* опосредуется специальными активаторами.

Atp22p является трансляционным активатором для мРНК *ATP6/ATP8*. Было показано, что Atp22p необходим для биосинтеза белка Atp6, связываясь с 5'-UTR матрицы *ATP6* и способствуя привлечению рибосомы [80, 81]. Вместе с тем, для активации трансляции транскриптов генов *ATP6* и *ATP8* необходимо наличие F1-АТФазы или промежуточных форм ее сборки, которые вытесняют с мРНК трансляционный репрессор Smt1p/Dmt1p, что позволяет Atp22p активировать трансляцию [82]. Было показано, что сверхэкспрессия Atp22p частично восстанавливает синтез Atp6/8 у мутантов, лишённых F1-АТФазы [81, 83]. Таким образом, трансляция транскриптов *ATP8/ATP6* находится под контролем ряда факторов, среди которых сама F1-АТФаза выступает как коактиватор, ослабляя репрессию со стороны Smt1p/Dmt1p [82]. При этом Smt1p/Dmt1p, связываясь с мРНК, поддерживает ее в неактивном состоянии при дефиците F1 [81]. Тем самым, предотвращается преждевременная утечка протонов и фактически реализуется еще одна петля обратной связи.

Активация трансляции с мРНК *ATP9* также опосредуется набором активаторов. Белок Aer1 стабилизирует мРНК *ATP9* за счет PPR-мотивов и образует тройственный комплекс с Aer2 и Atp25, который обеспечивает

правильное позиционирование мРНК *ATP9* на миторибосоме [83, 84]. При этом активатор Atp25 обладает дополнительной активностью: его N-концевой домен участвует в олигомеризации Atp9 в структуру F0-кольца [83].

1.3.6 Активатор мРНК *VAR1* (**Sov1**)

Ген *VAR1* в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae* кодирует рибосомный белок Var1 (uS3m) - ключевой белок малой субъединицы митохондриальной рибосомы (mtSSU). В отличие от других митохондриальных рибосомных белков, Var1 уникален тем, что кодируется митохондриальной ДНК, что требует специализированных механизмов регуляции его синтеза и сборки. При этом Var1 – это единственный растворимый белок, кодируемый митохондриальным геномом дрожжей. В настоящее время обнаружен единственный активатор гена *VAR1* - белок **Sov1**. Активатор Sov1 связывается с 5'-UTR мРНК *VAR1*, предотвращая её деградацию и способствуя привлечению миторибосомы [85]. Структурные исследования показывают, что Sov1 участвует в поздних этапах сборки mtSSU малой субъединицы миторибосом, обеспечивая корректное присоединение Var1, uS14 и mS46 [85]. В отсутствии Sov1 в митохондриях накапливается невключенный в состав миторибосом Var1 накапливается при отсутствии, что запускает обратную связь и останавливает дальнейшую трансляцию мРНК *VAR1*. Это обеспечивает корректное количество белка Var1 относительно количества закодированных в ядре миторибосомных белков.

1.3.7 Универсальный постинициаторный фактор Dpc29

Dpc29 (Delta-Psi dependent mitochondrial import and Cleavage protein of 29 kDa) - это закодированный в ядре фактор митохондриальной трансляции у *Saccharomyces cerevisiae*. Изначально предполагалось, что он действует как мРНК-специфический активатор для *COX1*, однако в настоящее время имеются данные, демонстрирующие, что Dpc29 - универсальный фактор митохондриальной трансляции, необходимый для экспрессии практически всех митохондриально кодируемых генов окислительного фосфорилирования (OXPHOS) (например, *COB*, *COX1*, *COX2*, *ATP6*) [39]. В отличие от

классических мРНК-специфических активаторов, Dpc29 действует на постинициаторном этапе, устранивая внеплановые остановки рибосом в ходе биосинтеза белка и способствуя таким образом элонгации [39, 86].

Исследования препаратов, полученных с помощью УФ-шивки *in situ*, показали, что в ходе трансляции Dpc29 взаимодействует с белками миторибосомы Mrp7 и Mrp13. Миторибосомный профайлинг клеток *dpc29Δ* выявил повышенную концентрацию миторибосом на 3'-концах мРНК, что свидетельствует о нарушении их продвижения по мРНК или о преждевременном окончании трансляции.

1.3.8 Человеческие аналоги дрожжевых активаторов митохондриальной трансляции

Митохондриальная трансляция у человека и дрожжей зависит от ядерных факторов, регулирующих синтез субъединиц окислительного фосфорилирования (OXPHOS). У дрожжей используются мРНК-специфические трансляционные активаторы, привлекающие миторибосомы к лидерным участкам мРНК и обеспечивающие тонкую регуляцию процесса. В митохондриях млекопитающих такой возможности не имеется в связи с практически полным отсутствием в митохондриальных мРНК 5'-UTR. Тем не менее, в митохондриях млекопитающих идентифицировано несколько белков, оказывающих мРНК-специфическое воздействие на процесс митохондриальной трансляции.

TACO1 (Translational Activator of Cytochrome c Oxidase Subunit I) необходим для синтеза Cox1. Он связывается с мРНК *MT-CO1* и ассоциируется с митохондриальной рибосомой, способствуя элонгации [87, 88].

Экспрессия человеческого гена TACO1 в дрожжах восстанавливает дыхание и митохондриальную трансляцию у штаммов-делетантов по гену *DPC29*, что свидетельствует об эволюционной консервативности их функции [39]. Хотя TACO1 не имеет выраженного сходства по последовательности с Dpc29, но, судя по всему, он выполняет аналогичные функции в

митохондриальной трансляции. Оба белка устраняют остановки рибосом на этапе элонгации, особенно при синтезе Cox1 [39, 86].

Комплекс LRPPRC-SLIRP до некоторой степени является функциональным аналогом дрожжевого Pet309 с пентатрикопептидными повторами (PPR) и стабилизирует митохондриальные мРНК. Этот комплекс связывается с белками миторибосомы (mS31, mS39), формируя коридор для доставки мРНК. При этом недавно было показано, что комплекс регулирует эффективность трансляции *COX1* и *COX2* и критичен для сборки комплекса IV [89, 90].

1.4 Митохондриальные рибосомы пекарских дрожжей

1.4.1 Структура и состав миторибосомы дрожжей

Митохондриальные рибосомы (миторибосомы) дрожжей - специализированные молекулярные машины, отвечающие за трансляцию митохондриальных мРНК и биосинтез белков, необходимых для окислительного фосфорилирования. Дрожжевые миторибосомы обладают уникальными особенностями структуры в сравнении с бактериальными рибосомами и даже миторибосомами млекопитающих. В число таких особенностей входят наличие уникальных участков рРНК и обогащённый белковый состав.

Миторибосома дрожжей - 74S частица, состоящая из большой (54S, mtLSU) и малой (37S, mtSSU) субъединиц. В состав mtLSU входит 21S pРНК (3288 нуклеотидов) и 46 белков, а в состав mt-SSU - 15S pРНК (1789 нуклеотидов) и 34 белка. В отличие от миторибосом млекопитающих, в которых наблюдается существенная редукция рРНК, у дрожжей сохраняются бактериальные размеры рРНК с периферическими расширениями (например, h16-ES, h17-ES), компенсирующими уменьшение числа контактов рРНК с белками. Эти расширения служат структурными платформами для посадки специфических митохондриальных белков и обеспечивают стабильность субъединиц [14, 91]. 15S pРНК mtSSU длиннее бактериальной 16S pРНК, а её расширения формируют V-образный канал на входе мРНК, который служит

платформой для трансляционных активаторов - уникальных для дрожжей регуляторов трансляции (см. выше) [14].

В миторибосоме дрожжей присутствуют 14 белков mtSSU и 13 белков mtLSU, не имеющих бактериальных гомологов. Среди них:

Var1 (uS3m) – единственный растворимый белок, кодируемый митохондриальной ДНК, обогащён аспарагином (23%), что отражает высокое содержание АТ в митохондриальном геноме дрожжей (83%) [6].

mS47 (Ehd3) – фермент, структурно схожий с β -гидроксизобутирил-КоА-гидrolазой, сохранил каталитическую активность, функционально связывает трансляцию с митохондриальным метаболизмом [14].

mS42/mS43 – гетеродимер, структурно напоминающий супероксиддисмутазу, но не обладающий ферментативной активностью, формирует крупные периферические выступы mtSSU [14].

Именно эти белки усиливают межсубъединичные контакты и обеспечивают взаимодействие с трансляционными активаторами.

1.4.2 Биогенез и сборка миторибосомы пекарских дрожжей

Благодаря криоэлектронной микроскопии была установлена последовательность этапов сборки миторибосомы, а также продемонстрировано участие факторов сборки. Сборка mtLSU дрожжей происходит на внутренней мемbrane митохондрии, что обеспечивает пространственную координацию трансляции и встраивания белков в мембрану и минимизирует ошибки в сборке гидрофобных субъединиц OXPHOS [92]. Трансляционный активатор Mam33 связывает неассоциированные белки mtLSU, предотвращая их неправильное сворачивание [93]. Белок Mba1 стабилизирует mtLSU на этапе сборки, после окончания которой он заменяется на Oxa1 [92].

Ключевую роль в ранней сборке mtSSU играет метилтрансферазный фактор - Rsm22 [94].

1.4.3 Особенности функционирования миторибосом дрожжей в ходе трансляции

Активация трансляции и рекрутирование мРНК

Так как митохондриальные мРНК дрожжей не содержат последовательностей Шайна-Дальгарно, для их вовлечения в трансляцию необходимы специализированные трансляционные активаторы. Эти белки связываются с 5'-нетранслируемыми участками мРНК и взаимодействуют со структурными элементами миторибосомы. Данные криоэлектронной микроскопии показывают, что малая субъединица (mtSSU) содержит расширенный входной канал для мРНК, который служит площадкой для связывания трансляционных активаторов. Эта платформа выравнивает рибосому по старт-кодону, компенсируя отсутствие последовательности Shine-Dalgarno [14], и обеспечивает посадку ТА, позволяя им "мостиком" соединять рибосому и мРНК. Структурные исследования показывают, что активатор Cbs2 формирует гетерогенную плотность в данном участке, что говорит о динамических взаимодействиях в процессе инициации.

Многие трансляционные активаторы (такие, как Cbs1, Cbs2 для мРНК *COB* и Pet309 для мРНК *COX1*) содержат PPR-мотивы, которые связываются с мРНК и рРНК. Эти взаимодействия обеспечивают специфичность инициации трансляции, а также корректность позиционирования мРНК в рибосомном канале [14].

Ко-трансляционная вставка в мембрану

Вследствие высокой гидрофобности синтезируемых в митохондриях полипептидов их трансляция сопряжена непосредственно с интеграцией во внутреннюю мембрану митохондрий. Интеграза Oxa1 опосредует процесс транспорта новосинтезированных полипептидов из миторибосомы в мембрану, полипептидный туннель mtLSU структурно максимально пригоден для работы Oxa1. Гидрофобные аминокислотные остатки туннеля способствуют эффективной передаче синтезируемых цепей на Oxa1 для последующей интеграции в мембрану митохондрии [7, 121].

Для интеграции новосинтезированного полипептида необходимо заякоривание миторибосомы на внутренней мемbrane. Данный процесс осуществляется через расширение pPHK 96-ES1 на mtLSU, а также с участием мембранных рецепторов Mrx15 и Mba1 [5, 95, 96]. Тем самым обеспечивается пространственная координация трансляции со встраиванием ее продуктов во внутреннюю мембрану органелл.

1.4.4 Эволюционные отличия миторибосом у дрожжей и млекопитающих

Миторибосомы дрожжей сохраняют крупные РНК: 21S pPHK в большой субъединице (mtLSU) и 15S pPHK в малой субъединице (mtSSU). 15S pPHK длиннее бактериальной 16S pPHK, и у дрожжей не наблюдается масштабной редукции pPHK, характерной для млекопитающих. Вместо этого pPHK дрожжей приобрела многочисленные специфические митохондриальные расширенные сегменты (ES), которые служат каркасом для специфических для органелл белковых элементов миторибосомы и обеспечивают уникальные структурные особенности, такие как V-образный канал выхода мРНК [14] (Рисунок 5).

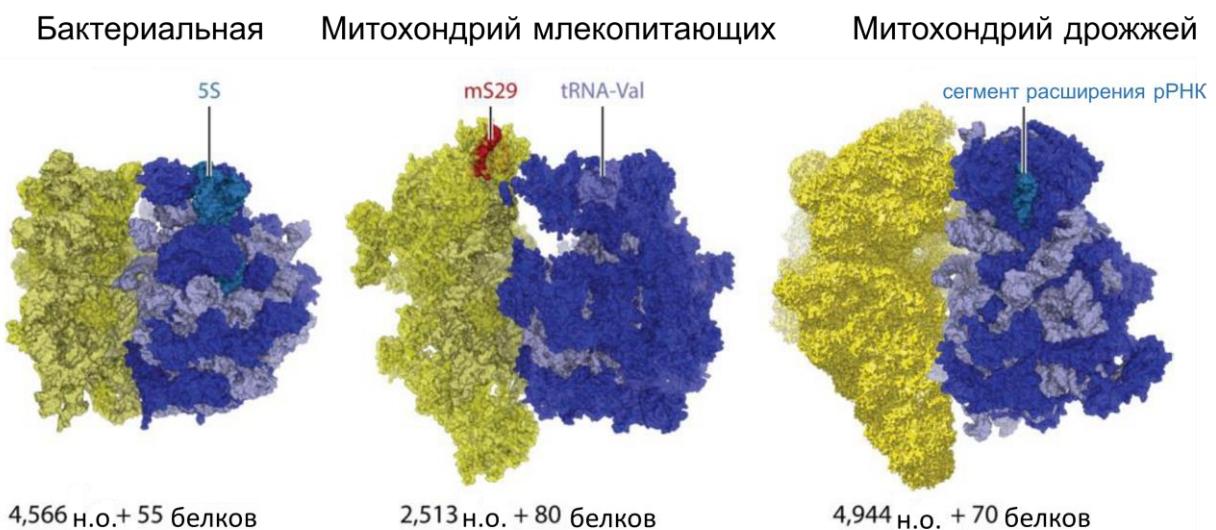


Рисунок 5 – Сравнение общей структуры бактериальных и митохондриальных рибосом.

На схеме указаны бактериальная 5S pPHK и структурные элементы, заменяющие 5S pPHK в митохондриальной рибосоме дрожжей (сегмент

расширения рРНК) и человека (тРНК-Val). В митохондриях млекопитающих дополнительно присутствует специфическая ГТФаза (mS29), локализованная на межсубъединичном интерфейсе. Малая субъединица митохондриальной рибосомы дрожжей показана как неинтерпретируемая карта электронной плотности. Белки и рРНК большой субъединицы окрашены в синий и голубой цвета соответственно, белки и рРНК малой субъединицы — в жёлтый и бледно-жёлтый. Сокращения: mS29 — митохондриально-специфическая внутренняя ГТФаза. Изображение взято из обзора Martin Ott et al [1].

Миторибосомы млекопитающих в этом отношении существенно отличаются от миторибосом дрожжей, их рРНК в ходе эволюции существенно редуцировалась. Эта редукция компенсируется резким увеличением числа белков. Сокращение рРНК и расширение протеома — определяющие черты эволюции миторибосом млекопитающих [5] (Рисунок 5).

Миторибосомы дрожжей состоят из 73 белков, включая 14 в малой субъединице, не имеющих бактериальных гомологов. Многие консервативные белки имеют длинные N- и C-концевые расширения, усиливающие межбелковые связи внутри рибосомы. Эти расширения в основном уникальны для дрожжей и редко совпадают по длине, последовательности или структуре с аналогичными расширениями у млекопитающих. Примечательно, что дрожжевые миторибосомы приобрели потенциально активный фермент mS47 (Ehd3), структурно схожий с метаболическим ферментом и обладающий каталитической активностью, а у млекопитающих такого не обнаружено [14].

Миторибосомы млекопитающих более богаты белками — их около 80, многие из которых специфичны для митохондрий и не имеют бактериальных или дрожжевых гомологов [5, 97]. Увеличение числа белков компенсирует потерю рРНК и приводит к более пористой и гибкой структуре миторибосомы. Расширение протеома миторибосомы у млекопитающих отличается от таковых у дрожжей, что отражает независимые эволюционные события [5].

Миторибосомы млекопитающих лишены расширений рРНК и связанных с ними регуляторных платформ, характерных для миторибосом дрожжей. Их канал для мРНК и выходной туннель в основном сформированы белковыми элементами. Центральный выступ большой субъединицы у млекопитающих содержит структурную тРНК (tРНК^{Phe} или tРНК^{Val}) вместо бактериальной 5S рРНК — это уникальная адаптация, отсутствующая у дрожжей, у которых место 5S рРНК занято еще одним выступом основной рРНК большой субъединицы [5, 97] (Рисунок 5).

Миторибосомы дрожжей характеризуются наличием пластичных межсубъединичных мостиков, включая девять специфических митохондриальных. Считается, что основной функцией таких мостиков является ограничение относительного движения субъединиц. Это приводит к формированию более жесткой структуры миторибосом [14]. В миторибосомах млекопитающих имеется существенно меньше межсубъединичных контактов, что обеспечивает большую свободу движений и гибкость во время трансляции [5].

Миторибосомы дрожжей постоянно ассоциированы с внутренней митохондриальной мембраной (даже в неактивном состоянии). Эта ассоциация обеспечивается расширенными сегментами рРНК (например, 96-ES1) и белками, такими как Mba1. Мембрano-ориентированный выступ миторибосомы служит якорем, облегчая ко-трансляционное встраивание белков в мембрану [5, 14].

Миторибосомы млекопитающих для закрепления на внутренней мемbrane используют свои белковые компоненты (mL45), что согласуется с отсутствием в составе их рРНК участков, аналогичных участкам закрепления в составе дрожжевых миторибосомных рРНК [95].

В таблице 1 представлены ключевые различия миторибосом из пекарских дрожжей и клеток млекопитающих.

Таблица 1. Сводная таблица ключевых различий миторибосом из пекарских дрожжей и клеток млекопитающих

Ключевые характеристики	Миторибосома пекарских дрожжей	Миторибосома млекопитающих
Размер рРНК	Крупная, с расширениями	Сокращённая, без расширений
Количество белков	73 белка	~80 белков
Привлечение мРНК	Трансляционные активаторы	Нет аналогичной системы
Синтез растворимых белков	Да (Var1/uS3m)	Нет
Центральный выступ	Расширения рРНК	Структурная тРНК вместо 5S рРНК
Межсубъединичные мостики	Много, более жёсткие	Меньше, более гибкие
Закрепление на внутренней мемbrane	рРНК (96-ES1), Mba1	Белок mL45
Эволюционный тренд	Расширение рРНК, прирост белков	Сокращение рРНК, прирост белков

1.5 Гуманизация пекарских дрожжей

1.5.1 Общие сведения о гуманизации дрожжей

Гуманизация дрожжей – это систематическая замена белков дрожжей на их человеческие аналоги, что позволяет изучать процессы и заболевания человека в упрощённой эукариотической модели. Такой подход чрезвычайно удобен для генетических, биохимических и фармакологических исследований благодаря удобству работы с дрожжами и сохранению у них ключевых функций, общих для всех эукариотических клеток [98].

Значительная часть (более 30%) генов дрожжей имеет человеческие ортологи, что делает дрожжи привлекательной системой для гуманизации [99]. Современные методы генетической инженерии, включая систему CRISPR/Cas9, позволяют с высокой точностью интегрировать человеческие последовательности ДНК в локусы дрожжевых генов при сохранении эндогенных элементов регуляции транскрипции. Классический подход предусматривает предварительное создание дрожжевого штамма с нокаутом целевого гена, после чего в данный геномный локус интегрируется соответствующий человеческий ген. Успешность интеграции оценивается по способности дрожжевых клеток сохранять жизнеспособность и обеспечивать рост при соответствующих селективных условиях. Таким образом, рост и выживание штамма свидетельствуют о функциональной активности интегрированного человеческого гена в дрожжевом генетическом контексте [98, 99].

В масштабных экспериментах сотни генов дрожжей были заменены на человеческие ортологи. Было показано, что по крайней мере один из человеческих паралогов часто сохраняет достаточную степень исходной функции для полного функционального замещения дрожжевого гена [100]. Около половины протестированных человеческих генов были способны компенсировать отсутствие соответствующего дрожжевого гена, что указывает на глубокое функциональное сходство и обосновывает использование дрожжей для моделирования функций человеческих генов [99]. Полные «модули» или биохимические пути, например гликолиз, уже были полностью гуманизированы путём замены всех родственных дрожжевых генов человеческими. Это позволяет исследовать более сложные аспекты метаболизма и заболеваний человека на дрожжах [101].

Вместе с тем, часть генов дрожжей не могут быть замещены человеческими аналогами из-за эволюционного расхождения или несовместимости белковых взаимодействий. Полная гуманизация многокомпонентных модулей – новая и интенсивно развивающаяся область,

способная дать знания, недоступные при проведении одиночных замен. С развитием технологий возможно проведение ещё более масштабных проектов, вплоть до моделирования сложных, полигенных человеческих заболеваний на дрожжах [98] [101].

1.5.2 Гуманизация митохондриальных белков

Гумманизированные дрожжи позволяют раскрывать фундаментальные клеточные механизмы, сохраняющиеся от дрожжей до человека, проводить скрининг аллелей, связанных с заболеваниями, и тестировать лекарственные соединения, используя рост дрожжей как индикатор работы человеческого белка [98, 100].

Однако, несмотря на многочисленные попытки гуманизации дрожжевого генома, успешные случаи замены митохондриальных факторов транскрипции, трансляции и репликации пока остаются крайне редкими. В частности, достоверным успешным примером гуманизации является замена эндогенного гена митохондриальной ДНК-полимеразы *MIP1* на его человеческий ортолог *POLG* (кодирующий ДНК-полимеразу γ). Человеческий *POLG* способен компенсировать отсутствие *MIP1*, обеспечивая полноценную репликацию митохондриальной ДНК и служа моделью для изучения мутаций, связанных с митохондриальными заболеваниями человека [102]. Другим успешным примером является экспрессия человеческого транскрипционного фактора TFAM в дрожжах с делецией гена *ABF2*, что позволяет поддерживать стабильность mtДНК [103]. Наконец, в нашей лаборатории ранее была проведена успешная функциональная замена дрожжевого гена *AIM23*, являющегося фактором инициации митохондриальной трансляции, на его человеческий ортолог MTIF3 [104]. В целом гуманизация наиболее результативна для метаболических генов и генов домашнего хозяйства, тогда как специализированные дрожжевые митохондриальные системы транскрипции, трансляции и репликации практически не поддаются эффективной замене человеческими аналогами [100].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1.1 Выбор штамма и способ их культивирования.

Штаммы пекарских дрожжей, использованные в этом исследовании, были получены из штамма *S. cerevisiae* DAU2 [105] (Дополнительные материалы, таблица «штаммы *S. cerevisiae*»). Культивирование штаммов пекарских дрожжей проводили при температуре 30°C в шейкере-инкубаторе (New Brunswick Scientific, США) на средах YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% D-глюкозы) и YPG (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 3% глицерина) или на чашках со средами того же состава, дополненными 2% агара. Антибиотики G418 или гигромицин Б добавляли в селективные среды в концентрации 500 мкг/мл. Штаммы, находящиеся в работе, содержали на чашках не более 30 дней и хранили долгосрочно в среде YPD с добавлением 20% глицерола при температуре -80°C.

2.1.2 Анализ респираторного фенотипа и функциональности митохондрий дрожжей

Функциональность митохондрий дрожжей определялась по способности штаммов метаболизировать несбраживаемые источники углерода, такие как глицерин и этанол, потому что метаболизм данных соединений происходит только при наличии нормально работающих митохондрий [106]. Скорости роста сравнивали методом дроп-тестов. Для этого высевали три последовательных десятикратных разведения суспензий анализируемых штаммов/клонов дрожжей, начиная с наибольшего значения OD₆₀₀ = 0,1. Инкубировали при 30 °C в течение 3 суток. Регистрируя с помощью фотофиксации динамику роста.

2.1.3 Получения штаммов дрожжей с фенотипом *rho*⁰ из клеток дрожжей дикого типа.

Свежую питательную среду YPD инокулировали ночной культурой дикого типа дрожжей до конечной оптической плотности OD₆₀₀ = 0,1, а также добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 25 мкг/мл.

Инкубировали с агитацией в течении 72 часов. После завершения инкубации клетки дрожжей отмывали дистиллированной водой для удаления бромистого этидия. Клетки дрожжей разводили дистиллированной водой до плотности OD₆₀₀ = 0,0005 и аликвоту объемов 150 мкл высевали на чашки с YPD-агаром. Чашки инкубировали 4 суток. Полученные колонии анализировали методом ПЦР и высевом на среды с несбраживаемым источником углерода [107] [108].

2.1.4 Скрещивание гаплоидных штаммов пекарских дрожжей.

Родительские штаммы дрожжей с гаплоидным набором хромосом предварительно высевали на агаризованную среду YPD и инкубировали при 30°C в течение суток до появления изолированных колоний. Бактериологической петлей переносили колонию каждого штамма на агаризованную среду YPD, так чтобы они располагались в непосредственной близости друг от друга. Биомассу перенесенных колоний противоположного типа спаривания смешивали на чашке так, чтобы образовалось пятно диаметром (~1 см²) для увеличения контакта между клетками. Чашку инкубировали при 30°C в течение 4–8 часов или на ночь для образования зигот и осуществления спаривания. После инкубации бактериологической петлей соскабливали смешанный участок и переносили в 100–200 мкл стерильной воды. Полученную суспензию наносили на чашку с селективной агаризованной средой позволяющей расти только диплоидным клеткам. Чашки инкубировали 3-5 суток. Отбирали несколько колоний с селективной среды и пересевали их на свежие селективные чашки для получения клональных линий. Диплоидные штаммы анализировали методом ПЦР-анализа на наличие аллелей MAT α и MAT α . [109]

2.1.5 Редактирование генома дрожжей *S. cerevisiae*.

Для редактирование генома дрожжей *S. cerevisiae* в том числе делеции гена MRF1, замены дрожжевого гена MRF1 на человеческие гомологи и получения **меченных эпитопами гемагглютинина гриппа (НА)** на С-конце белков применялась стратегия, в основе которой лежит доставка линейного фрагмента ДНК, полученного с помощью ПЦР, в клетки дрожжей и его

последующая направленная интеграция в геном по механизму гомологичной рекомбинации, обменивающей исходный ген на ген-интереса и/или селективный маркер — кассету устойчивости к антибиотику [110']. Линейные кассеты получали методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров (Дополнительные материалы, таблица «Олигонуклеотиды»). В качестве матрицы использовались соответствующие плазмиды семейства pFA6-HphMX6 и pFA6-KanMX6 либо специально синтезированные (Дополнительные материалы, таблица «Плазмидные конструкции») [111]. Продукты амплификации очищали из агарозного геля с помощью набора HiPure Gel DNA Mini Kit («Magen Biotech», КНР). Для трансформации дрожжей по методу теплового шока использовали 5-10 мкг очищенных ПЦР-продуктов [111]. Трансформанты с успешной интеграцией отбирали на чашках сYPD, с соответствующим антибиотиком, и валидировали методом генотипирования посредством ПЦР по матрице геномной ДНК с соответствующими праймерами (Дополнительные материалы, таблица «Олигонуклеотиды» и Рисунок 2).

2.1.6 Мечение С-концов митохондриальных рибосомных белков

Для конструирования мутантов, несущих три копии НА-тега (YPYDVPDYA) на С-концах целевых белков, применялась ПЦР-стратегия [110]. На первом этапе создали плазмиду pFA6-3НА-HphMX6, содержащую последовательности 3xНА-тега, стоп-кодона, терминатора ADH1 и кассету HphMX6, обеспечивающую устойчивость к гигромицину В. Плазмиду получали лигированием фрагмента XmaI/BglII из pFA6-3НА-KanMX6 (Addgene Plasmid #39295) в вектор pFA6-HphMX6 (P30438, Euroscarf). Отметим, что вместо pFA6-3НА-HphMX6 можно использовать pFA6-3НА-KanMX6, однако в этом случае селективным маркером является устойчивость к G418.

Для каждого гена, подлежащего тегированию, разработали пару праймеров, состоящих из двух частей (см. список праймеров в дополнительных материалах). 3'-регионы праймеров были комплементарны плазмиде pFA6-3НА-HphMX6, а 5'-участки представляли собой 40-нуклеотидные гомологичные плечи, соответствующие областям до (для прямых праймеров) и

после стоп-кодона целевого гена. Данные праймеры использовали для амплификации ПЦР-продукта 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с гомологичными участками. Продукты очищали из агарозного геля с использованием набора HiPure Gel DNA Mini Kit (Magen Biotech, Китайская Народная Республика).

Трансформацию дрожжей проводили по классическому протоколу PEG-LiAc-SS carrier DNA, используя 5–10 мкг ПЦР-продуктов [112]. Гомологичные плечи направляли интеграцию тегов в рамку считывания на 3'-конце генов, заменяя природный стоп-кодон. Преимущество метода — сохранение нативной хромосомной локализации генов и их промоторов. Однако, как отмечено в литературе Swaminathan и Beilharz, вставка антибиотикорезистентных кассет может влиять на уровень экспрессии генов за счёт антисмысловой транскрипции с криптических промоторов, что ограничивает применимость метода в количественной биологии [113].

Трансформанты с успешной интеграцией тегов отбирали на среде YPD с гигромицином В и валидировали методом ПЦР.

2.1.7 Иммунопреципитация митохондриальных рибосомных комплексов

Для проведения иммунопреципитации дрожжевые клетки, содержащие аффинные метки, высевали из коллекции (-80°C) на свежие агаризованные чашки со средой YPD, дополненным соответствующим антибиотиком. Колонии выращивали при 30°C до возникновения видимых колоний. Для инокуляции ночной культуры осуществляли посев в 10 мл среды YPGal, содержащей 500 мкг/мл гигромицина В, инкубацию проводили при 30°C .

Дальнейшее культивирование выполняли в объёме 0,5–2 л свежей YPD при агитации (200 об/мин) и температуре 30°C до достижения оптической плотности $\text{OD}_{600} = 1,5\text{--}2,0$. Затем вносили хлорамфеникол до конечной концентрации 34 мкг/мл, перемешивали и инкубировали при 30°C , 200 об/мин в течение 60 минут. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g, в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего полученный осадок быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до использования.

Для механического лизиса осадок дрожжей помещали в предварительно охлаждённые в жидким азоте ступку и пестик, покрывая образец азотом. В пробу добавляли по каплям 3 мл лизирующего буфера (25 мМ HEPES-KOH, pH 7,5; 100 мМ KCl; 20 мМ ацетата магния; 1,7% Triton X-100; 34 мкг/мл хлорамфеникола), после чего материал растирали до получения гомогенного порошка. Полученный порошок допускалось хранить при – 80 °C.

Перед экстракцией порошок оттаивали при комнатной температуре, после увлажнения доводили объём до 15 мл охлаждённым на льду лизирующим буфером и осторожно перемешивали переворачиваниями (10–15 раз). Суспензию выдерживали на льду 30 минут. Далее лизат центрифугировали (3000g, 5 мин, 4 °C), супернатант переносили в новую охлаждённую пробирку. Вторичное центрифugирование супернатанта проводили при 20000g, 10 минут, 4°C; осадок отбрасывали, супернатант сохраняли.

Для иммунопреципитации использовали 50 мкл магнитных шариков PierceTM Anti-HA (Thermo Fisher Scientific, США), которые предварительно дважды промывали 10-кратным объёмом лизирующего буфера. Шарики добавляли к полученному лизату и инкубировали при медленном перемешивании или вращении в течение 60 минут при комнатной температуре. После связывания шарики осаждали на магнитной стойке и трижды промывали 10-кратным объёмом буфера.

Элюирование иммунокомплексов осуществляли в зависимости от назначения: для выделения белков использовали 50 мкл буфера Леммли без β-меркаптоэтанола, для выделения РНК — 500 мкл реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный материал далее использовали для протеомного или РНК-анализа.

2.1.8 Сравнительная протеомика ко-иммунопреципитатов

Анализ протеома выполняли, как описано в работе Балевой, с незначительными модификациями [114]. Элюаты, полученные после иммунопреципитации, наносили на 10% денатурирующий ПААГ. После прохождения бромфенолового синего 5 мм разделяющего геля подачу тока

останавливали, полосу, содержащую общий пул концентрированных белков, вырезали из геля и нарезали на фрагменты. Образцы отмывали дважды раствором 1 (40% ацетонитрил, 50 мМ NH₄HCO₃). Фрагменты геля обезвоживали в ацетонитриле, регистрировали в растворе 2 (100 мМ NH₄HCO₃, 20 мМ DTT) и инкубировали 30 мин при 56 °С. Затем раствор 2 удаляли, образцы обрабатывали раствором 3 (100 мМ NH₄HCO₃, 20 мМ йодацетамид) в темноте в течение 20 мин, дважды отмывали водой, трижды раствором 1, обезвоживали в ацетонитриле и подвергали трипсинизации трипсином Gold (Promega, США) в 100 мМ NH₄HCO₃ при 37 °С в течение 6 ч. Пептиды десалировали с использованием спин-наконечников Pierce™ C18 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Элюированные пептиды высушивали на вакуумном манифестере и ресуспенсировали в 0.1% муравьиной кислоте.

1 мкг пептидов в объеме 1–4 мкл наносили на μ -предколонку Acclaim (0.5×3 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Fisher Scientific) со скоростью потока 10 мкл/мин в изократическом режиме подвижной фазы С (2% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота) в течение 4 мин. Далее пептиды разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, система Ultimate 3000 Nano LC, Thermo Fisher Scientific) на колонке C18 длиной 15 см (Acclaim® PepMap™ RSLC, внутренний диаметр 75 мкм). Элюирование проводили градиентом буфера В (80% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота) со скоростью потока 0.3 мкл/мин. Общее время анализа составило 90 мин, включая 4 мин уравновешивания колонки буфером А (0.1% муравьиная кислота), градиент от 5% до 35% буфера В за 65 мин, 6 мин до 99% буфера В, промывку 10 мин 99% буфером В и 5 мин ре-уравновешивания буфером А.

2.1.9 Масс-спектрометрический анализ

Анализ выполняли в трех технических повторностях на масс-спектрометре Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific). Температура капилляра – 240 °С, напряжение эмиттера – 2.1 кВ. Масс-спектры регистрировали с разрешением 120,000 (MS) в диапазоне 300–1500 m/z.

MS/MS-спектры фрагментов получали с разрешением 15,000 в диапазоне 100 m/z до m/z, определяемого зарядом прекурсора (максимум 2000 m/z). Время интегрирования: 50 мс (прекурсоры) и 110 мс (фрагменты). Цели AGC: 1×10^6 (прекурсоры) и 2×10^5 (фрагменты). Порог интенсивности изоляции — 50,000 счетов; для фрагментации отбирали до 20 прекурсоров с использованием коллизионной диссоциации (HCD, 29 NCE). Прекурсоры с зарядом +1 и >+5 исключали. Динамическое исключение — 20 сек.

Обработку данных проводили в MaxQuant с поисковой системой Andromeda [116] [117]. Для идентификации белков использовали полный протеом *Saccharomyces cerevisiae* (Ensemble Genome Browser). Модификации: карбамидометилирование цистеинов (фиксированное), ацетилирование N-конца и окисление метионинов (вариабельные). Допустимое отклонение массы: 4.5 ppm (прекурсоры), 20 ppm (фрагменты). Допускалось до двух пропущенных сайтов расщепления трипсином. FDR для пептидов и белков — 1%. Данные анализировали в режиме LFQ. Файл «Protein groups» импортировали в Perseus (10.1038/nmeth.3901), конвертировали в XLM и обрабатывали в Microsoft Excel и RStudio. Volcano plots строили в RStudio.

2.1.9 Выделение и очистка митохондрий из клеток пекарских дрожжей.

Дрожжи растали до логарифмической фазы соответствующей плотности культуры OD₆₀₀ = 0,8 – 1,0 ед. Суспензию дрожжей осаждали центрифугированием при 2000–3000g, 5 минут при комнатной температуре. Осадок промывали стерильной дистиллированной водой, затем ресуспендировали в 1 объёме 1.2 М сorbitола 50 mM фосфат калия, pH 7.5 для предотвращения осмотического осаждения сферопластов. К суспензии добавляли 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 10 mM и зимолиазы в количестве 10 ед/мл. Реакционную смесь инкубировали при 37 °C в течение 60 минут, периодически помешивая. Клеточную суспензию охлаждали на льду и центрифугировали при 1000 g в течении 5 минут при 4 °C. Осадок ресуспендировали буферным раствором для гомогенизации (0,6 M сorbitол, 10

мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мМ EDTA) с добавлением ингибиторов протеаз (PMSF). Гомогенизацию проводили с использованием стеклянного лабораторного гомогенизатора во льду. Полученный гомогенат центрифугировали при 3000g в течение 5 минут при 4 °C для удаления остаточных неповрежденных клеток и крупных фрагментов. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и центрифугировали при 12 000 g в течение 15 минут при 4 °C. Полученный осадок ресуспендировали в буферном растворе для гомогенизации. В соответствующие центрифужные пробирки послойно вносили (наслаждали) равные объемы 2,0 М, 1,5 М и 1,0 М растворов сахарозы. Осторожно наносили ресуспендированную митохондриальную фракцию на верх градиента. Пробирки центрифугировали при 100 000 g в течение 1 часа при 4 °C. Митохондрии концентрировались на границе между 1,5 М и 2,0 М слоями сахарозы. С помощью пастеровской пипетки собирали митохондриальную зону, и разбавляли полученную фракцию 3–5-кратным объемом буфера. [115]

2.1.10 Выделение белков и Вестерн-блоттинг.

В культуральную пробирку со средой YPGal объемом 10 мл, содержащей антибиотик гигромицин Б в концентрации 50 мкг/мл пересевали из свежего посева анализируемую культуру дрожжей и инкубировали 18 часов. Далее отбирали 100 мкл суспензии дрожжей в свежую пробирку и центрифугировали при 9000 g в течении 30 секунд. Супернатант выбрасывали, а к осадку добавляли 100 мкл лизирующего буфера содержащего 1,8 М NaOH и 1 М β-меркаптоэтанола и ресуспендировали на вортексе. К суспензии добавляли 400 мкл 0,5 М раствора Трис-HCl pH 6,8 и интенсивно перемешивали. К суспензии последовательно добавляли 500 мкл метанола и 150 мкл хлороформа, после каждого добавления реагентов суспензию тщательно перемешивали с помощью вортекса. Далее суспензию центрифугировали в течении 2 минут при 16 000 g. Аккуратно удаляли верхнюю фазу. К хлороформ-содержащей фазе добавляли 500 мкл метанола и тщательно перемешивали содержимое пробирки. Пробирку с содержимым центрифугировали 2 минуты при 16 000 g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок сушили на воздухе в течение 2 минут при

температуре 80 °С. Высушенный осадок растворяли в 60 мкл в однократном буфере Лэммли для нанесения на гель и нагревали в течение 5 минут при температуре 80 °С.

Образцы разделяли на 12% денатурирующем полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Protran («Sigma-Aldrich», США). Мембрану инкубировали в течение часа в растворе PBS, содержащий 0,05% Твин 20 и 3% сухого молока. Мембрану отмывали от суспензии сухого молока раствором PBS, содержащем 0,05% Твин 20. Мембрану инкубировали в растворе антител против НА, конъюгированных с пероксидазой HRP («Abcam», Великобритания) разведенных в соотношении 1:2500. Сигналы проявлялись с помощью реагентов SuperSignal West Pico ECL («Thermo Fisher Scientific», США) и визуализировались с помощью системы визуализации ChemiDoc («BioRad», США).

2.1.11 Анализ РНК методом обратной транскрипции и количественной ПЦР (ОТ-кПЦР)

Выделение РНК осуществляли с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) в строгом соответствии с рекомендациями производителя. Полученную тотальную РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора MMLV RT (Evrogen, Россия). На каждую реакцию брали 3–5 мкг РНК, в качестве праймеров использовали случайные гексамеры. Реакция обратной транскрипции проводилась при температуре 37°С в течение 1 часа, далее продукт очищали фенол-хлороформной экстракцией.

Синтезированную кДНК применяли в качестве матрицы для количественной ПЦР. Реакцию амплификации проводили с использованием смеси SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) по стандартному двухшаговому протоколу производителя (температуры отжига и амплификации — 60°С). Нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации митохондриальных мРНК дрожжей приведены в дополнительном материале. Реакции проводили на детекторе CFX Connect Real-Time PCR (Bio-Rad, США).

Так как стандартного калибратора для данных целей не существует, относительный подход к анализу результатов не использовался; вместо этого была реализована схема абсолютного количественного анализа. Для построения калибровочных кривых каждую амплифицируемую последовательность клонировали в вектор pJET1.2 с помощью набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные плазмиды трансформировали в клетки *Escherichia coli* TOP10, очищали с использованием набора HiPure Plasmid Mini Kit (Magen Biotech, Китай), а затем применяли в качестве стандартов. Калибровочные кривые приведены в дополнительном материале («qPCR calibration»).

Пересчёт значений пороговых циклов осуществлялся в соответствующее количество вещества (нанограммы) на основании построенных калибровочных кривых. Полученные результаты визуализировали в виде диаграмм, построенных в Microsoft Excel и RStudio.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Гетерологичный белковый состав транслируемых миторибосом

3.1.1 Экспериментальная система для иммунопреципитации митохондриальных рибосом пекарских дрожжей

Пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) были выбраны модельным организмом для изучения гетерогенности белкового состава транслирующих миторибосом по трем причинам. Первая из них – относительная простота и низкие временные затраты на модификацию их генома с помощью гомологичной рекомбинации. Вторая причина – хорошая способность к брожению, что обеспечивает толерантность к мутациям, инактивирующими окислительное фосфорилирование, и к полной утрате митохондриальной ДНК в случае роста на средах с соответствующими источниками углерода [30]. Наконец, третья причина состоит в, пожалуй, максимальной специализированности процесса митотрансляции дрожжей среди всех исследованных систем митохондриального биосинтеза белка, заключающейся в функционировании в дрожжевых митохондриях набора трансляционных активаторов (см. обзор литературы).

В ходе данного исследования были поставлены две основные задачи. Первая заключалась в определении возможности детекции различий в составе рибосомных белков при иммунопреципитации митохондриальных рибосом, несущих аффинные теги в различных позициях. В случае структурной и функциональной однородности всех рибосом следовало ожидать, что набор рибосомных белков будет идентичен, независимо от локализации метки. Однако если в митохондриях существуют различные популяции рибосом, отличающиеся белковым составом, указанные различия могут быть выявлены при правильно выбранном белке для тегирования.

Также представлялось интересным определить, какие рибосомные белки ко-иммунопреципитируются при размещении аффинной метки на каком-либо активаторе митохондриальной трансляции. Поскольку активаторы участвуют в

трансляции отдельных мРНК и часто ассоциированы с митохондриальными рибосомами, подобные эксперименты позволяют предположить, различается ли белковый состав рибосом, вовлечённых в трансляцию конкретных специфических мРНК.

Вторая задача заключалась в анализе возможных различий в наборе мРНК, ассоциированных с митохондриальными рибосомами в зависимости от положения аффинной метки. Если митохондриальные рибосомы представляют собой однородную популяцию, различий в составе связанных мРНК обнаружено быть не должно, и, вероятнее всего, будут идентифицированы все возможные варианты. Однако, если для трансляции определённых мРНК необходимы специфические рибосомные белки, то спектр мРНК, ассоциированных с рибосомами в мутантных штаммах, может демонстрировать определённую вариабельность.

Были получены рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, несущие иммунологические метки (теги) в виде эпитопов НА – геммаглютинина вируса гриппа – на С-конце некоторых митохондриальных рибосомных белков. Белки для тегирования были выбраны на основании структуры митохондриальной рибосомы дрожжей, полученной с помощью крио-ЭМ [14]. Критерием отбора кандидатов являлась доступность их С-концов для антител. Все митохондриальные рибосомные белки, кроме Var1p, кодируются ядерным геномом, синтезируются цитоплазматическими рибосомами и импортируются в органеллы. Митохондриальный сигнальный пептид локализован на N-конце белка, поэтому для сохранения сигнала импорта иммунологические метки размещались на С-конце. Дополнительной причиной отказа от мечения белков с «утопленными» внутрь миторибосомы С-концами были потенциальные нарушения сборки рибосомы, которые могли возникнуть в результате такого мечения. Таким образом, в рамках данного исследования были сконструированы мутантные штаммы *S. cerevisiae*, экспрессирующие три tandemные копии НА-тега (3xHA) на С-концах следующих белков: Mrps17, Mrp20, Mrp1, Mrpl8, Mrpl6, Rsm10, а также

активаторов трансляции: мРНК *COX2* – Pet111 и мРНК *COX1* – MSS51. Введение тега осуществлялось посредством гомологичной рекомбинации с использованием ДНК-фрагмента, включающего последовательность 3xHA, стоп-кодон, терминатор транскрипции *ADH1* и кассету устойчивости к гигромицину В (Рисунок 6).

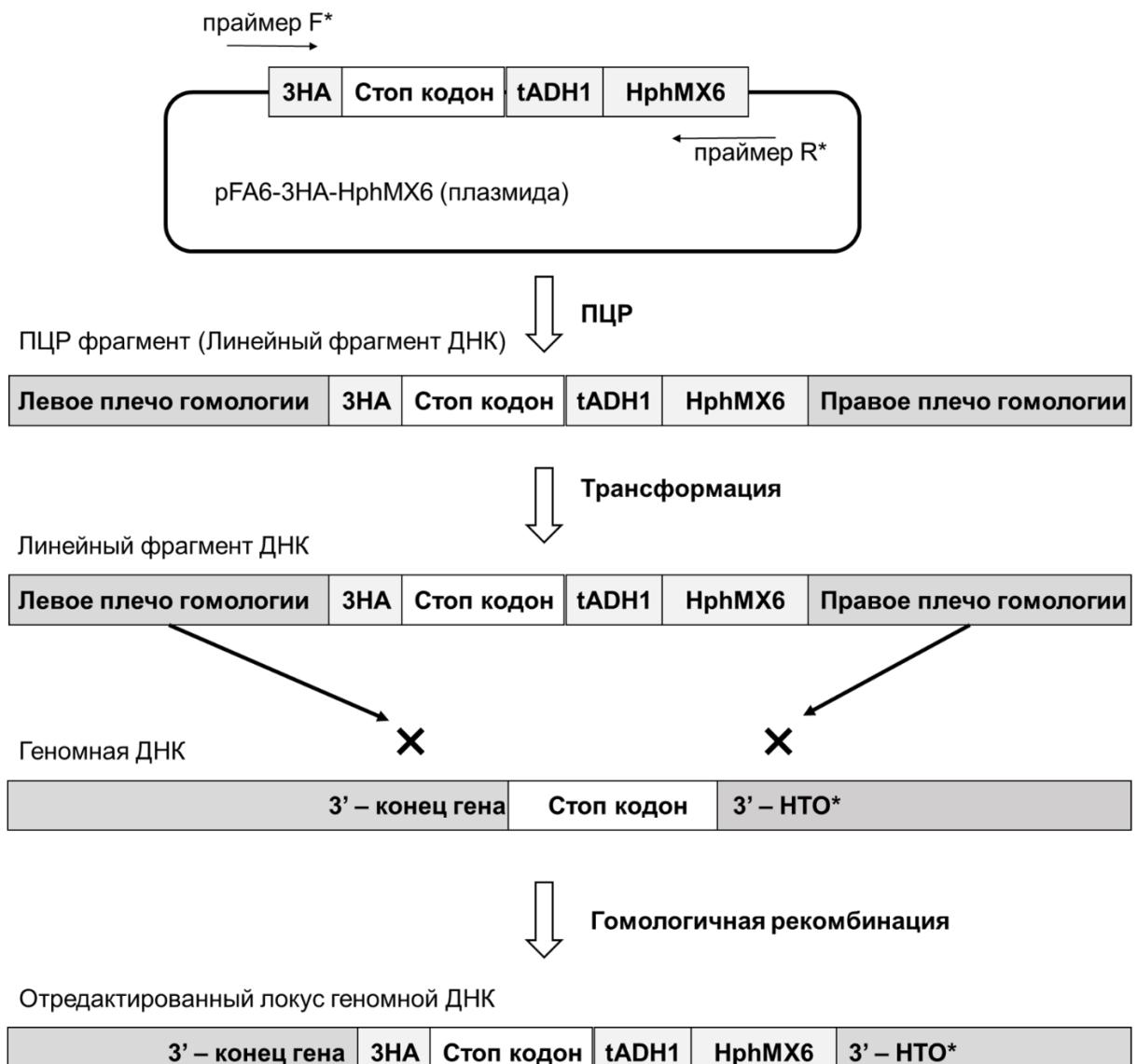


Рисунок 6 – Схема получение линейного вектора для гомологичной рекомбинации и редактирование 3'-концевого региона гена белка-мишени посредством замены стоп-кодона целевого гена на последовательность кодирующую эпитопную метку (три идущих подряд тега НА, 3HA) с кассетой устойчивости к гигромицину Б.

* - Праймеры для получения линейного фрагмента ДНК представлены в Приложении 2. 3'-НТО – 3'-нетранслируемая область гена белка-мишени.

Амплификация линейных фрагментов проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием плазиды pFA6-ЗНА-НрhMX6 в качестве матрицы и праймеров, содержащих 40-нуклеотидные гомологичные участки для обеспечения направленной интеграции в 3'-концевой регион целевого гена с замещением природного стоп-кодона. Отбор трансформантов осуществлялся на селективной среде, содержащей гигромицин Б. Корректность интеграции тега в геном верифицировали на уровне ДНК методом ПЦР (Рисунок 7 и 8), а экспрессию меченого белка подтверждали методом вестерн-блоттинга с использованием антител к НА-тегу (Рисунок 9).



Рисунок 7 – Схема расположения позиций отжига праймеров для ПЦР-верификации вставки кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 в 3'-концевой регион целевого гена.

А – схема неотредактированного участка 3'-конца гена белка-мишени со схематическим расположением праймеров для ПЦР-верификации вставки кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6, где С – прямой праймер, D – обратный.

Б – схема отредактированного участка 3'-конца гена белка-мишени со схематическим расположением праймеров для ПЦР-верификации вставки

кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6, где С и Hyg_B – первая пара праймеров, Hyg_C и D – вторая пара праймеров.

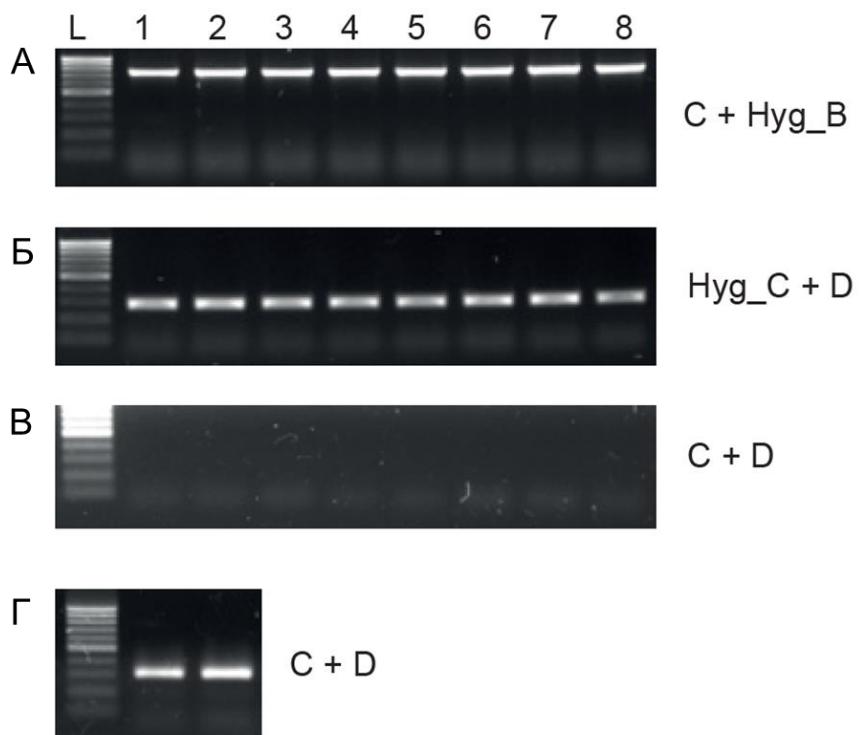


Рисунок 8 – Электрофореграмма ПЦР-скрининга геномной ДНК рекомбинантных штаммов дрожжей с отредактированным 3'-концевым регионом гена белка-мишени.

А, Б, В – Результаты ПЦР-скрининга штаммов дрожжей с отредактированным 3'-концевым регионом гена белка-мишени, где дорожки 1-8: MRPS17-HA, MRP20-HA, MRP1-HA, MRPL8-HA, MRPL6-HA, RSM10-HA, PET111-HA, MSS51-HA соответственно, С и Hyg_B – первая пара праймеров, Hyg_C и D – вторая пара праймеров.

Г – ПЦР-скрининг неотредактированного дрожжевого штамма (дикого типа), где С + D – пара праймеров, расположение которых представлено на рисунке 6.

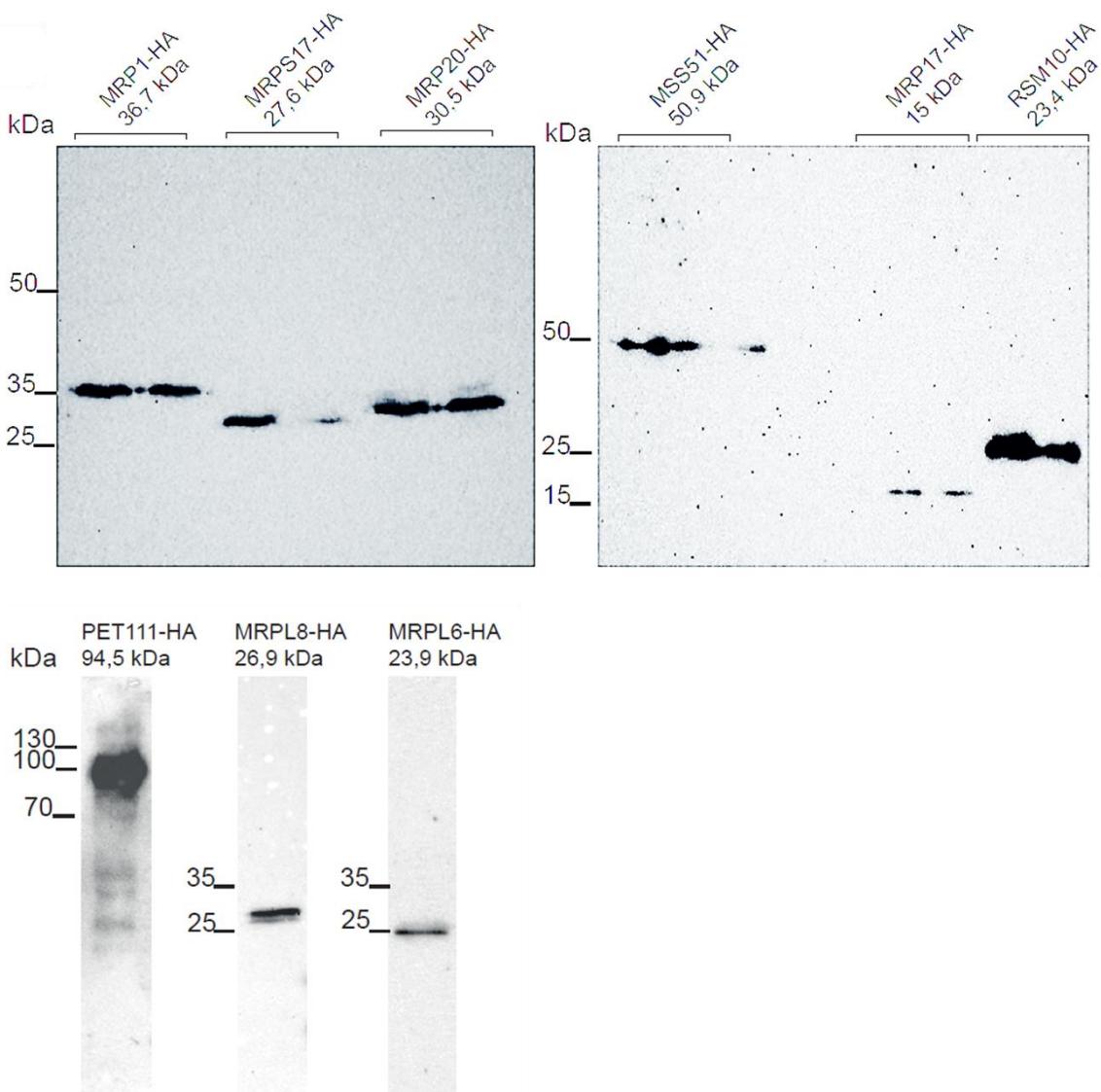


Рисунок 9 – Вестерн-блоттинг клеточных лизатов штаммов пекарских дрожжей с отредактированным 3'-концевым регионом гена белка-мишени. Над дорожками указаны наименования штаммов и молекулярный вес меченого белка. В левой части каждой панели указано расположение маркеров молекулярного веса белков с указанием веса в кДа.

Для оценки функциональной полноценности меченых белков проводился анализ роста мутантных штаммов на среде с глицерином, в качестве единственного источника углерода. Глицерин метаболизируется до пирувата в ходе гликолиза, после чего пируват транспортируется в митохондрии и включается в цикл трикарбоновых кислот. Соответственно, рост на глицерин-содержащей среде требует полноценного функционирования митохондрий. В

случае нарушения интеграции белка в рибосомный комплекс вследствие введения 3HA-тега у штамма должны наблюдаться дефекты сборки рибосом, приводящие к утрате способности к росту на среде с глицерином или к замедлению такого роста. Большинство полученных мутантов демонстрировали темпы роста, сопоставимые с диким типом, что свидетельствует о сохранении функциональной активности меченых белков (Рисунок 10). Исключение составили штаммы MRP1-HA и MRPL6-HA: первый характеризовался существенно замедленным ростом, а второй вовсе не был способен к росту на среде с глицерином, в связи с чем эти мутанты были исключены из дальнейших экспериментов.

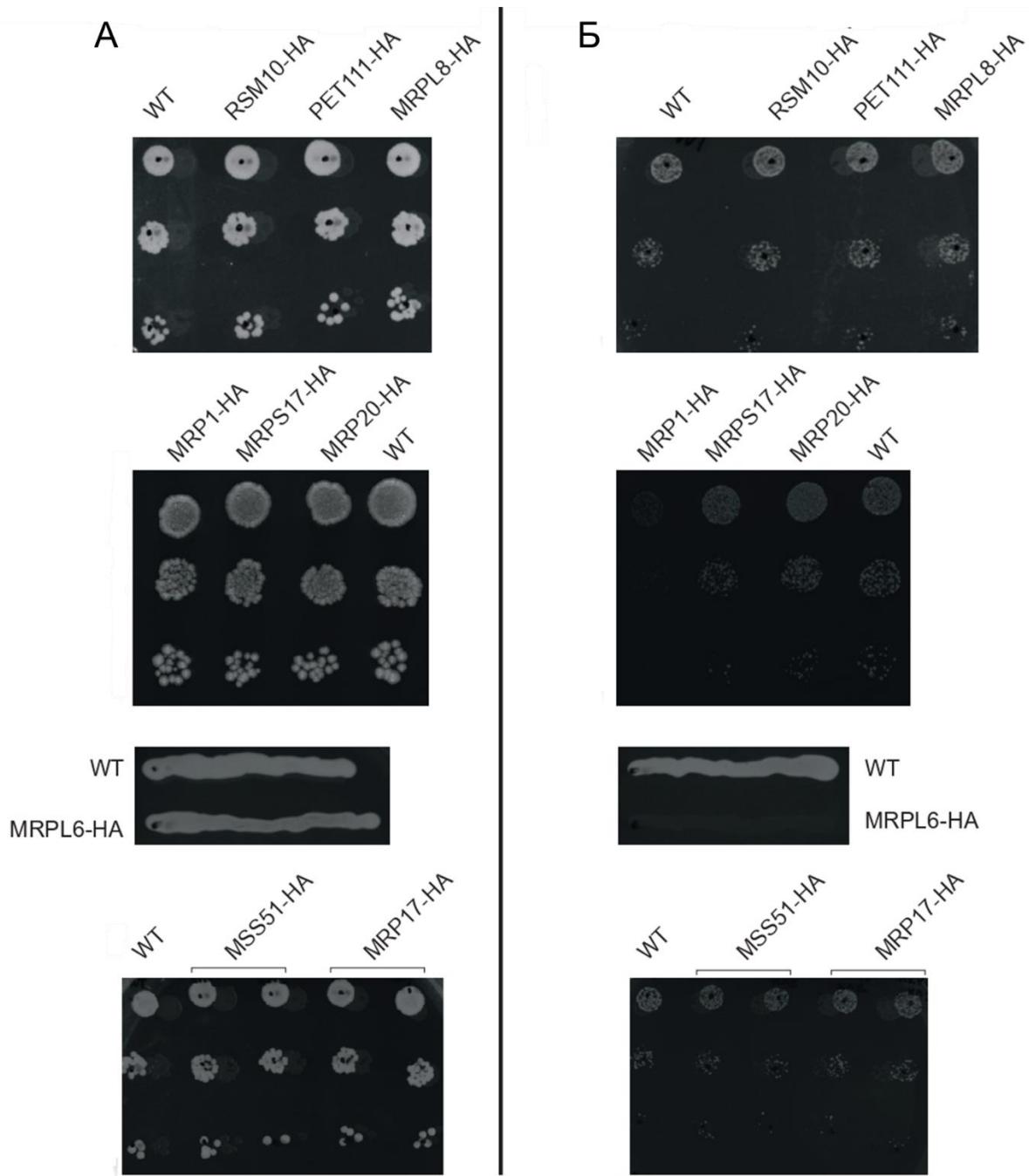


Рисунок 10 – Анализ респираторного фенотипа штаммов пекарских дрожжей с отредактированными 3'-концевыми регионами генов белков-мишеней.

А – Анализ роста (дроп-тест) штаммов с меченными митохондриальными белками на средах со сбраживаемым источником углерода (глюкоза); Б – на средах с несбраживаемым источником углерода (глицерин). WT – штамм DAU2 (дикий тип)

После завершения этапов конструирования и валидации мутантных штаммов был проведён эксперимент по апробации разработанного протокола иммунопреципитации. Для оценки эффективности выделения меченных 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 11).

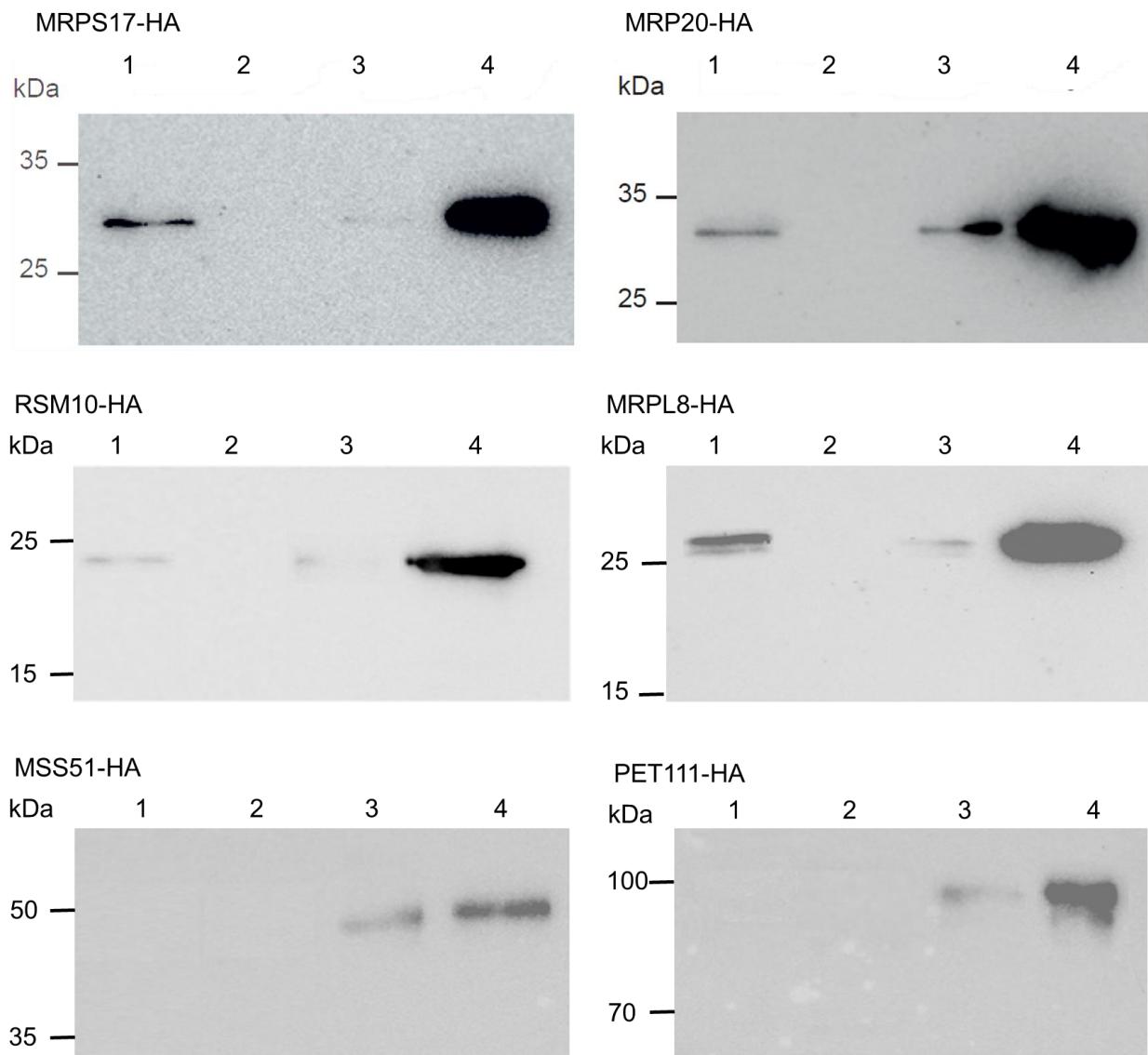


Рисунок 11 – Вестерн блоттинг фракций ко-иммунопреципитации меченых белков из клеточных лизатов рекомбинантных штаммов пекарских дрожжей.

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

Как показано на рисунке 11, НА-меченные белки эффективно детектируются в элюате, при этом на бусинах после промывки регистрируется лишь незначительный остаточный сигнал. Отсутствие сигнала в тотальном клеточном лизате для MSS51-НА и PET111-НА объясняется их крайне низкой концентрацией меченых белков. Вместе с тем при обогащении посредством сорбции на магнитных бусинах с конъюгированными антителами они отчётливо детектировались в основном элюате, но наблюдалось их остаточное количество на сорбенте. Полученные результаты были расценены как удовлетворительные, что позволило перейти к последующей идентификации белков, ко-осаждаемых вместе с целевыми тегированными компонентами.

3.1.2 Сравнительная протеомика ко-иммунопреципитатов.

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 в соответствии с протоколом, изложенным в разделе «Материалы и методы». Масс-спектрометрический анализ проводился на базе Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. Первоначальной целью являлась идентификация белков, осаждаемых из штамма дикого типа и рассматриваемых в качестве фоновых компонентов и отрицательного контроля. Примечательно, что три белка, демонстрировавшие наибольшую интенсивность сигнала в отрицательном контроле, не принадлежали к белкам дрожжей. Один из них — трипсин свиной (Uniprot ID: P00761), использовавшийся при подготовке образцов для протеомного анализа; два других — человеческие кератины типа I (Uniprot ID: P13645) и типа II (Uniprot

ID: P04264). Очевидно, что данные белки попали в образцы на этапе подготовки и не были специфически обогащены в ходе иммунопреципитации. Всего в штамме дикого типа было идентифицировано лишь 12 белков дрожжей, которые неоднократно определялись в анализируемых образцах (полный перечень приведён в Приложении 4). Данные белки относятся к числу типичных загрязнителей, часто встречающихся в протеомных исследованиях, таких как гистоны, шапероны, актин и субъединицы АТФ-синтазы. Следует отметить, что указанные белки выявлялись в 70% всех образцов дикого типа, тогда как в оставшихся 30% были обнаружены исключительно различные типы человеческих кератинов, автоматически классифицированных программным обеспечением MaxQuant как загрязнители.

Дальнейший анализ протеомных данных, полученных из образцов мутантных штаммов, экспрессирующих белки с НА-метками, позволил сформировать обширные списки белков, включающие от 1500 до 2400 позиций в зависимости от конкретного образца. Для систематизации полученных данных все выявленные белки были классифицированы по субклеточным компартментам. На рисунке 12 представлены диаграммы, отражающие соотношение суммарной интенсивности сигнала белков, относящихся к различным клеточным компартментам, к общей интенсивности сигнала каждого образца.

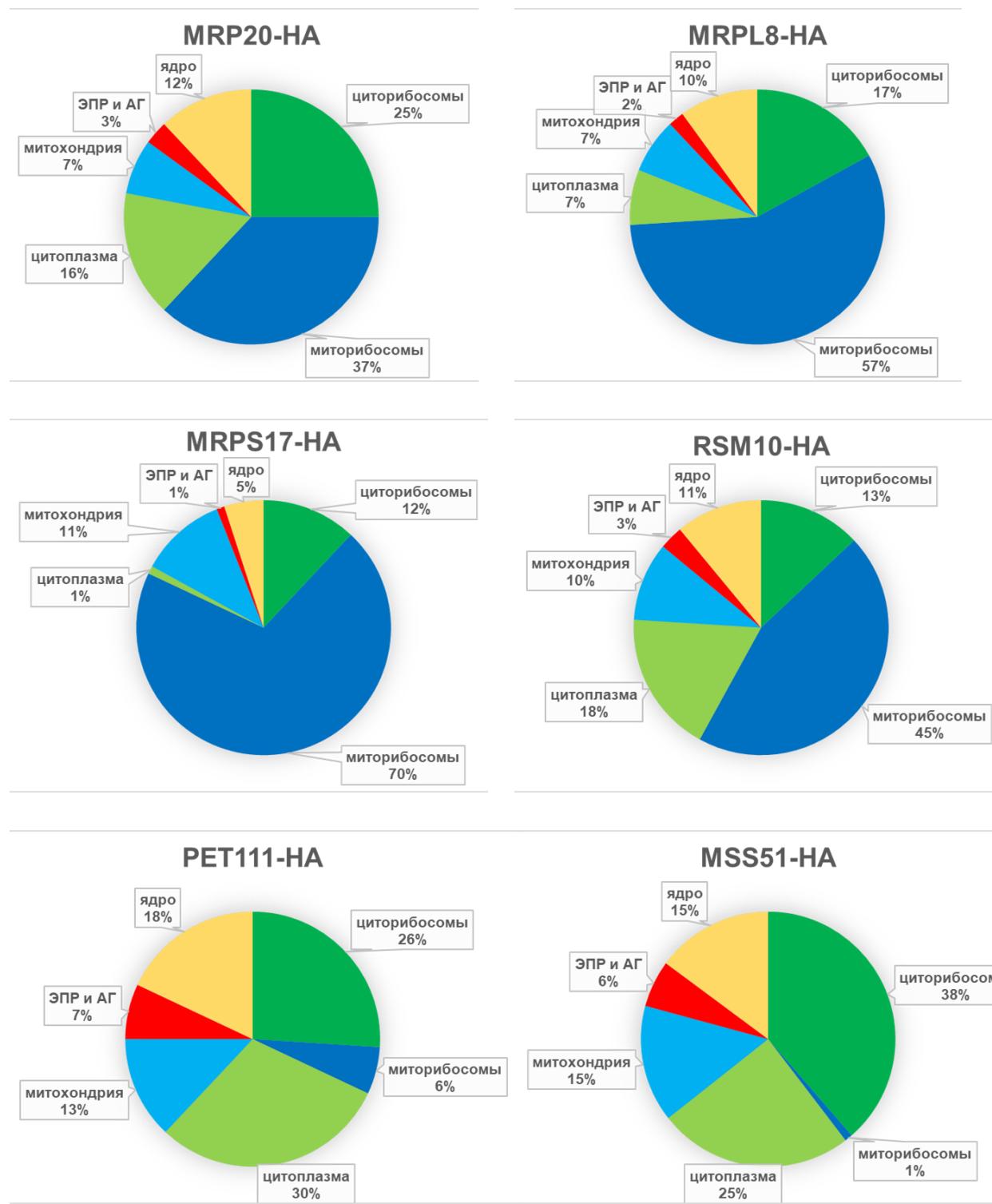


Рисунок 12 – Распределение идентифицированных в образцах иммунопрепараций белков по субклеточным компартментам. Диаграммы показывают процентные значения для суммарной LFQ-интенсивности белков, отнесённых к каждому компартменту, относительно общей LFQ-интенсивности образца. Диаграммы построены на основе данных трёх независимых

экспериментов для каждого мутантного штамма. LFQ (Label-Free Quantification), количественный анализ без маркировки метод в протеомике, который позволяет определять относительное количество белков в биологических образцах без использования изотопной метки.

Примечательно, что в коиммунопреципитатах с НА-тегами на митохондриальных рибосомных белках (МРБ) наибольший вклад в общий протеом вносили митохондриальные белки, в частности, компоненты митохондриальных рибосом. Неожиданным оказалось то, что при этом иммунопреципитация из лизата штамма, экспрессирующего Pet111-НА, приводила преимущественно к выделению цитоплазматических белков. С другой стороны, митохондриальные рибосомные и нерибосомные белки также составляли значительную долю в составе иммунопреципитата штамма, содержащего Pet111-НА.

Согласно литературным данным, митохондриальные белки составляют порядка 0,1–0,5% общего белкового пула клетки, при этом митохондриальные рибосомы представляют собой лишь небольшую фракцию митохондриального протеома [118]. Тот факт, что доля митохондриальных рибосомных белков в иммунопреципитированных образцах достигала 40–70% от общей интенсивности, свидетельствует о высокой специфичности разработанной экспериментальной системы.

Мы предполагаем, что присутствие других митохондриальных и клеточных белков не является результатом контаминации, поскольку ранее было показано, что отрицательный контроль с использованием штамма дикого типа характеризуется крайне низким уровнем белкового фона. Следовательно, данные белки, вероятно, взаимодействуют с тегированными мишениями, однако характер этих взаимодействий требует дальнейшего изучения. Например, цитозольные рибосомные белки и белки, связывающие мРНК, могут быть обнаружены в образцах, поскольку все тегированные белки синтезируются в цитоплазме. Митохондриальные белки могли быть ко-осаждены как

компоненты комплекса MIOREX либо в результате взаимодействия импортируемых белков с белками транспортного аппарата [119]. Тем не менее, полностью исключить возможность неспецифических, искусственно индуцированных взаимодействий белков с мишенью в лизате невозможно.

Анализ образцов, полученных с использованием другого активатора трансляции – *Mss51*, показал, что при применённых экспериментальных условиях данный белок практически не ассоциируется с миторибосомами. В соответствующем коиммунопреципитате сам *Mss51* был представлен в наибольшем количестве, тогда как митохондриальные рибосомные белки составляли лишь незначительную долю, что указывает на преимущественное выделение свободной формы *Mss51*.

Дальнейший анализ был посвящён исследованию митохондриальных рибосомных белков, выявленных в экспериментальных образцах, что представляло собой наиболее значимый и информативный аспект данного исследования. Для оценки различий в составе рибосомных белков между различными вариантами иммунопреципитации было проведено попарное сравнение образцов с использованием вулкан-плотов, отражающих два ключевых параметра: fold change (характеризует степень различия между образцами) и p-value (определяет статистическую значимость наблюдаемых изменений) (Рисунок 8). В результате было проведено 15 попарных сравнений. На рисунке 13 показаны 6 наиболее характеристических сравнений.

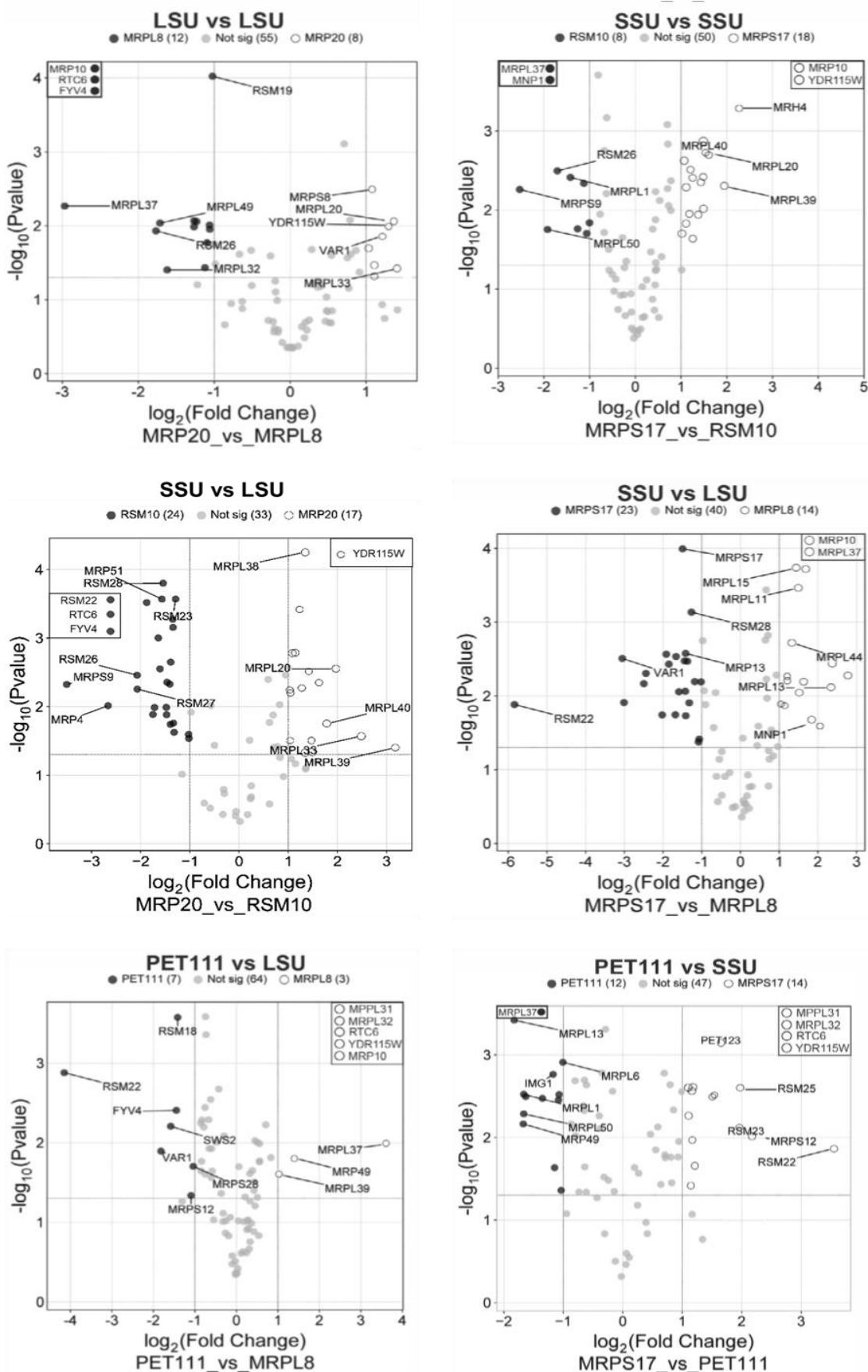


Рисунок 13 – Диаграммы попарного сравнения интенсивности LFQ-сигналов митохондриальных рибосомных белков из различных ко-

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 р-значении $\leq 0,05$ или в логарифмическом выражении [$\log_2(\text{fold change}) = 1$ и $-\log_{10}(p) = 1.3$]; граничные 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.

Согласно структурным данным, представленным в базе PDB (5MRC), митохондриальные рибосомы *Saccharomyces cerevisiae* включают в себя 73 белка: 34 – в составе малой субъединицы и 39 – в составе большой субъединицы [6]. Однако, согласно более поздним данным, этот показатель может достигать 80 белков, что обусловлено наличием группы белков, временно ассоциирующихся с рибосомами (например, Rsm22) [14]. В рамках настоящей работы все указанные белки были идентифицированы в анализируемых образцах, что свидетельствует о полноте представленного набора.

При построении сравнительных графиков регулярно выявлялась группа белков, воспроизводимо детектируемых исключительно в одном из сравниваемых образцов и полностью отсутствующих в другом. Для предотвращения математических артефактов при расчёте fold change (деление на ноль), такие «специфичные для образца» белки были исключены из основного анализа; их перечень представлен в отдельном блоке в верхнем углу

соответствующих вулкан-плотов, справа или слева, в зависимости от локализации белка.

Одним из исследовательских вопросов являлось определение степени обогащения белка-приманки в соответствующих иммунопреципитатах; такое обогащение ожидалось вследствие наличия аффинного тега именно на белке-приманке. Однако полученные результаты не подтвердили данного предположения. Так, сравнение данных интерактома MRP20-НА и MRPL8-НА показало, что уровень обогащения соответствующих белков в собственных вытяжках не превышал двукратного значения. Аналогично, при сравнении MRPS17-НА и RSM10-НА было обнаружено, что Rsm10 лишь незначительно обогащён в иммунопреципитате RSM10-НА, а Mrps17 также не демонстрирует значительного повышения концентрации в собственном интерактоме.

Учитывая, что клетки дрожжей подвергались быстрой заморозке в жидком азоте перед лизисом, что позволяет зафиксировать все молекулярные взаимодействия *in situ*, полученные результаты могут свидетельствовать 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 рибосомного комплекса, поскольку в противном случае наблюдалось бы значительное обогащение меченого белка, не связанного с рибосомой.

Анализ иммунопреципитата MSS51-НА выявил неполный набор митохондриальных рибосомных белков при преобладании самого белка-приманки в составе осаждённого материала. Это позволяет предположить, что применённые условия не являются оптимальными для изучения макромолекулярных комплексов MSS51-НА, поскольку преимущественно выделялась его свободная форма.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии ограниченного поднабора белков, которые практически никогда не детектируются в «серых зонах» вулкан-плотов, где располагаются необогащённые и статистически

незначимые белки. К данной категории относятся Mrp10 (mS37), Rtc6 (bL36m), Fyv4 (mS41), Mrpl37 (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 Mrpl31, Mrpl32, 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. Mrpl37 демонстрирует положительную корреляцию с Mrpl8 (эти белки часто ко-детектируются), а также отрицательную корреляцию с Mrps17. Данная закономерность соответствует принадлежности Mrpl37 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 Mrpl37 по сравнению с большинством других митохондриальных рибосомных белков.

Дополнительное внимание привлекли белки Var1 и Rsm22. Var1p является единственным рибосомным белком, кодируемым митохондриальным геномом дрожжей, тогда как Rsm22p представляет собой метилтрансферазу с неизвестной мишенью и функцией. 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 сигнала для митохондриальных рибосомных белков в каждом ко-иммунопреципитате, после чего для каждого отдельного белка определили отношение интенсивности соответствующего ему сигнала к медианному значению, что отражало степень обогащения (fold enrichment) относительно медианы (Рисунки 14 и 15 для белков малой и большой субъединиц соответственно).

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 (Таблицы 2 и 3).

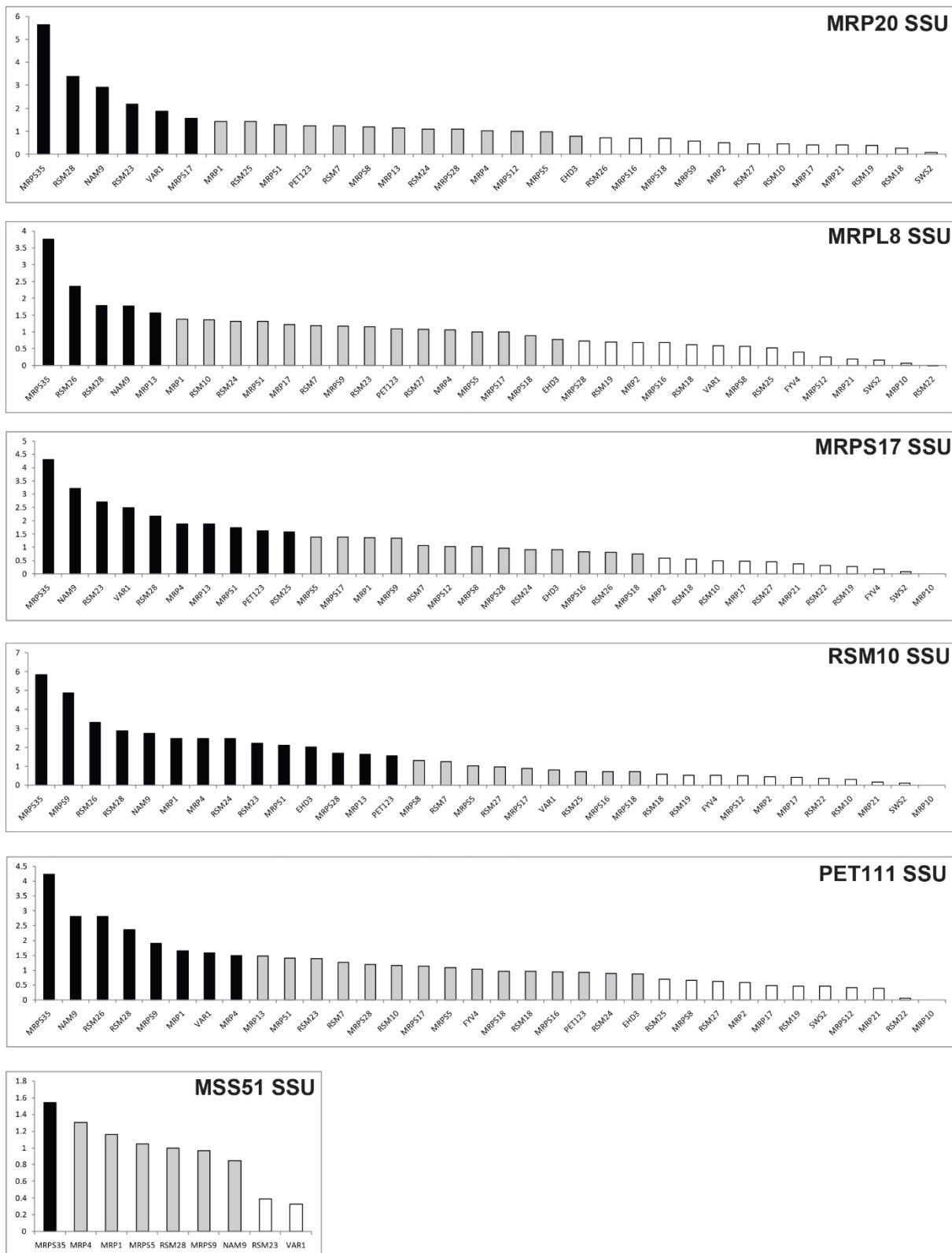


Рисунок 14 – Степень обогащения (fold enrichment) белков малой субъединицы. Указаны соответствующие названия генов. Значения для каждого отдельного белка были нормализованы на медианные значения, рассчитанные для всех белков в образце, и отображены по оси ОY. Таким образом, эти значения показывают отношение каждого МРБ к «медианному» МРБ. Значения выше 1,5 обозначены чёрным цветом, от 0,75 до 1,5 – серым, менее 0,75 – белым.

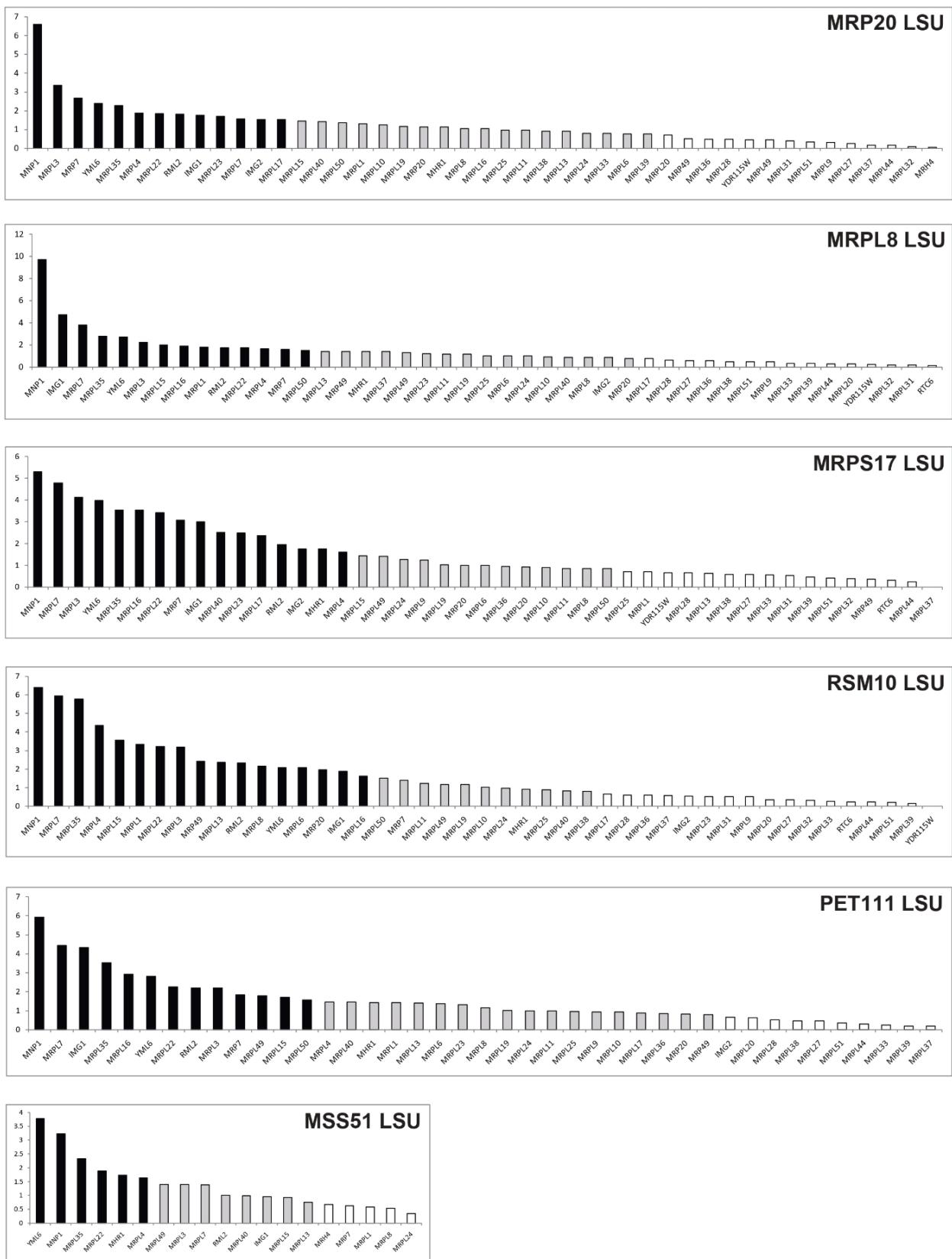


Рисунок 15 – Степень обогащения (fold enrichment) белков большой субъединицы. Указаны соответствующие названия генов. Значения для каждого отдельного белка были нормализованы на медианные значения, рассчитанные

для всех белков в образце, и отображены по оси ОY. Таким образом, эти значения показывают отношение каждого МРБ к «медианному» МРБ. Значения выше 1,5 обозначены чёрным цветом, от 0,75 до 1,5 – серым, менее 0,75 – белым.

Таблица 2. Соотношение медианы значения интенсивности наиболее представленных миторибосомальных белков в каждом ко-иммунопреципитате

	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		
Белки малой субъединицы	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

Таблица 3. Соотношение медианы значения интенсивности наименее представленных миторибосомальных белков в каждом ко-иммунопреципитате

	Наименование белков	Наименование ко-иммунопреципитата						кол-во молекул на клетку	кол-во а.к. остатков
		MRP20- НА	MRPL8- НА	MRPS17- НА	RSM10- НА	PET111- НА	MSS51- НА		
Белки малой субъедини- цы	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	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

* - Количество 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.

Для интерпретации этих данных можно предположить, что отношение, равное 1, указывает на присутствие 100 молекул данного белка в 100 миторибосомах, что свидетельствует о его структурной функции и наличии одной копии в каждой рибосоме. Значение 0,01 отражает присутствие белка лишь в 1% рибосом, что может свидетельствовать о его неструктурной роли или слабой ассоциации с рибосомным комплексом. Значения, превышающие 1,

могут свидетельствовать либо о наличии нескольких копий белка в рибосоме, либо о дополнительных взаимодействиях с компонентами коиммунопреципитата вне рибосомных комплексов, либо о более высокой эффективности детекции в масс-спектрометрии.

Анализируя распределение белков по степени обогащения в коиммунопреципитатах 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) (Рисунки 14 и 15). Примечательно, что полученные результаты были воспроизводимы между различными экспериментальными препаратами, а состав выделенных групп не зависел от белка-приманки с аффинным тегом. Исключение составил белок Mss51, для которого были идентифицированы исключительно переобогащённые белки, тогда как остальные не превышали пороговые значения и характеризовались нулевыми интенсивностями. В попытке объяснить наблюдаемые результаты была рассмотрена возможность преимущественного выявления крупных белков методом масс-спектрометрии. В таблицах 2 и 3 приведены данные о числе аминокислот в белках и их относительном содержании в клетках на основании глобального анализа экспрессии белков дрожжей, широко цитируемого в базе UniprotKB [119]. Отмечена выраженная, хотя и не абсолютная, тенденция к преимущественному выявлению в наших образцах крупных и высокоэкспрессируемых белков.

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

Для анализа рРНК и мРНК, осаждённых в комплексе с меченными белками на магнитных бусинах с конъюгированными специфическими антителами, был применён метод обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР (ОТ-кПЦР). В первую очередь был проведён анализ отрицательного контроля на основе 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. Во всех случаях в материале ко-иммунопреципитатов с меченными Mrp18, Mrp20, Mrps17 и Rsm10, были достоверно детектированы все митохондриальные рРНК и мРНК (Рисунок 16). Наиболее интенсивные сигналы в образцах MRP20 приходились на митохондриальные рРНК, а также на мРНК *COX2* и *ATP9*. Схожие результаты были получены для MRPS17-НА, за исключением мРНК *ATP9*, которая в данном случае не выявлялась. Примечательно, что при анализе штамма, содержащего MRPS17-НА, преимущественно преципитируется рРНК малой субъединицы (15S), тогда как в образцах MRPL8-НА рРНК обеих субъединиц — 15S и 21S — присутствуют в сопоставимых количествах.

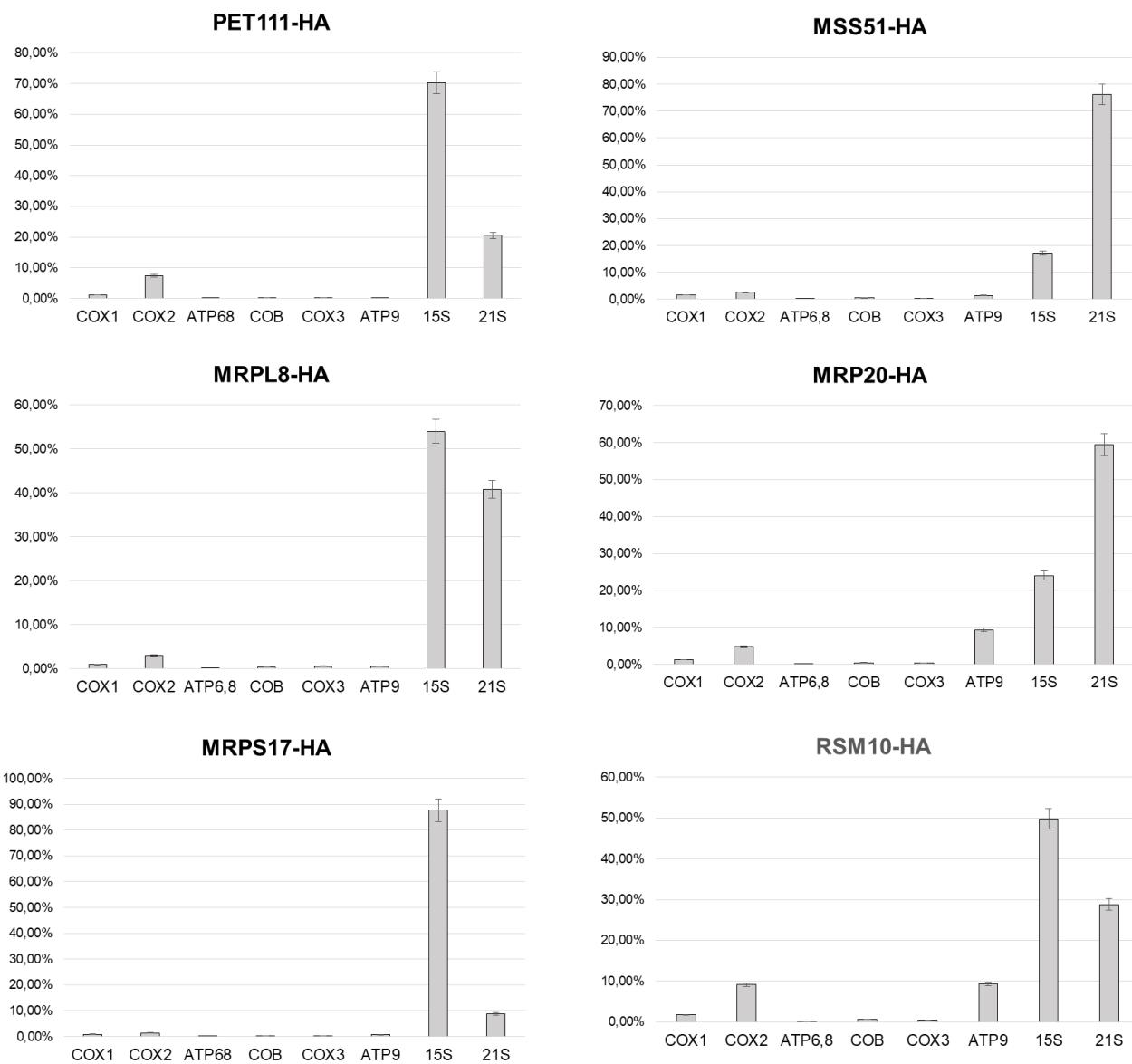


Рисунок 16 – Диаграммы соотношения митохондриальных рРНК и мРНК в различных ко-иммунопреципитатах. Количество РНК в образцах, полученных методом ко-иммунопреципитации, определялось по абсолютным значениям на основании индивидуальных калибровочных кривых, построенных для каждой пары праймеров. Погрешности оценки (error bars) рассчитывались по данным трёх независимых экспериментов по иммунопреципитации ($N=3$), каждый из которых анализировался в трёх технических повторах ($n=3$).

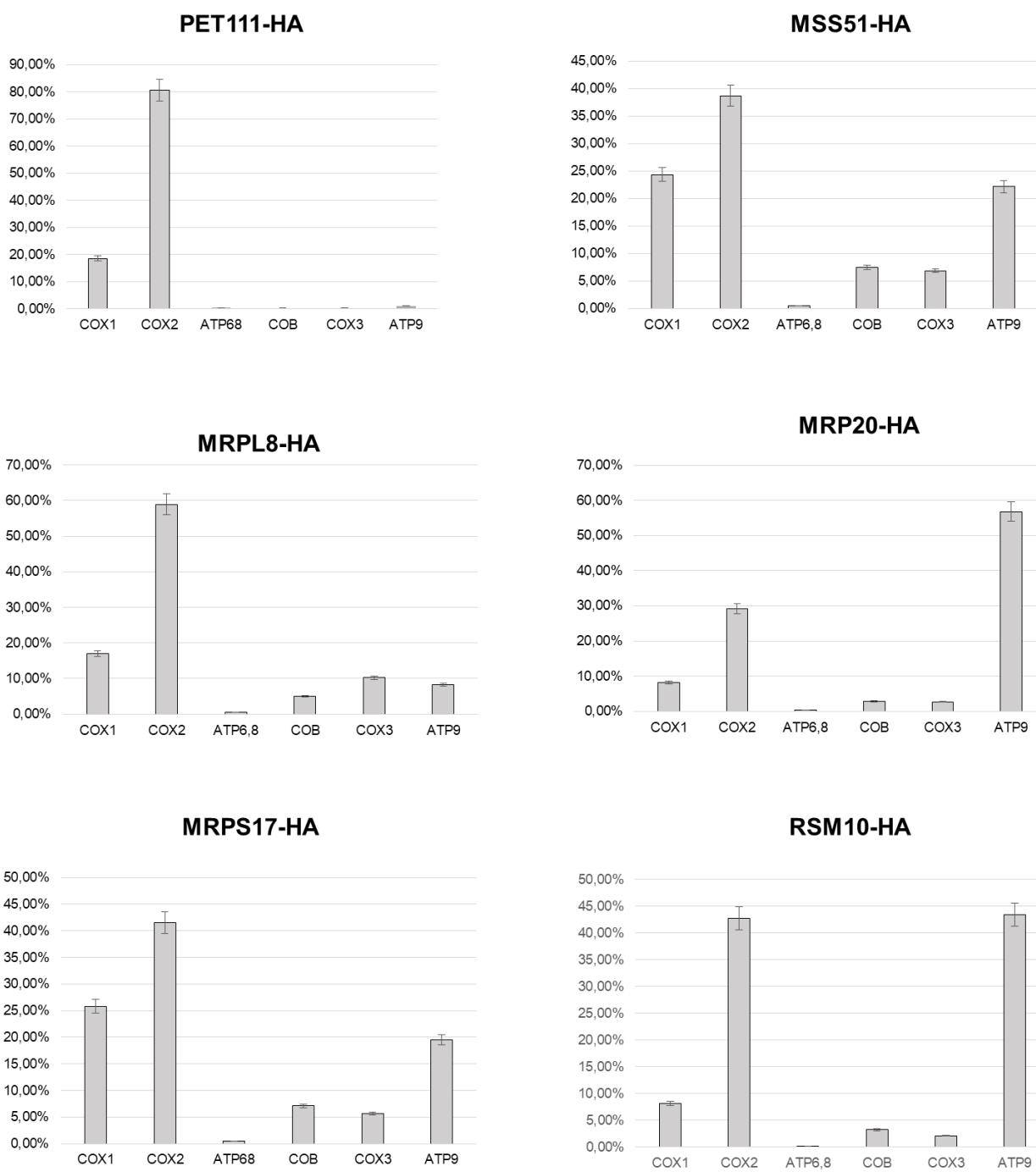


Рисунок 17 – Диаграммы соотношения митохондриальных мРНК в различных ко-иммунопреципитатах. Количество РНК в образцах, полученных методом ко-иммунопреципитации, определялось по абсолютным значениям на основании индивидуальных калибровочных кривых, построенных для каждой пары праймеров. Погрешности оценки (error bars) рассчитывались по данным трёх независимых экспериментов по иммунопреципитации ($N=3$), каждый из которых анализировался в трёх технических повторах ($n=3$).

Иммунопреципитация с использованием PET111-HA выявила иную картину: в соответствующих образцах были обнаружены только две мРНК — *COX1* и *COX2*, причём последняя преобладала по количеству (Рисунок 17). Известно, что Pet111 является специфическим активатором трансляции мРНК *COX2* и не регулирует экспрессию мРНК *COX1* [17]. Однако нельзя исключать, что обе популяции рибосом, 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 цитохромоксигеназы.

3.2 Гуманизация дрожжевого митохондриального фактора терминации трансляции

3.2.1 Гуманизация посредством внесения через шаттл-вектор генов человеческих гомологов Mrf1 (MTRF1 и MTRF1A) и человеческих факторов спасения миторибосомы (MRPL58 и MTRFR), феномен необратимой утраты респираторного фенотипа

В ходе проведённых исследований первоначально был получен штамм *Saccharomyces cerevisiae* KRA1 *MRF1* Δ (с делецией дрожжевого гена *MRF1*). Как и сообщалось ранее в литературе, данный мутантный штамм характеризовался отрицательным респираторным фенотипом [122]. В последующем была предпринята попытка восстановления респираторной функции посредством интродукции отсутствующей копии гена *MRF1* в составе плазмидного членочного вектора pRS416, в котором данный ген размещался между собственными регуляторными элементами — промотором и терминатором (см. раздел «Материалы и методы» и Рисунок 18), что имитировало его естественное положение в геноме. Помимо экспрессии эндогенного *MRF1*, была осуществлена экспрессия гетерогенных белков: факторов терминации трансляции митохондрий человека и человеческих митохондриальных факторов спасения рибосомы для оценки их способности

комплементировать делецию дрожжевого *MRF1* и, тем самым, способствовать восстановлению дыхательной функции митохондрий.

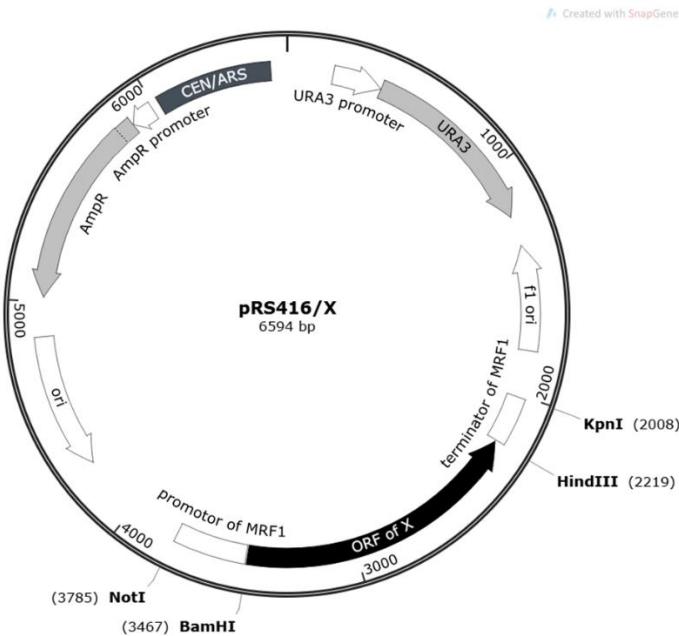


Рисунок 18 – Схема плазмид на основе челночного вектора pRS416, где X – кодирующая область генов: *MRF1*, *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, *MRPL58*

С этой целью штамм KRA1 трансформировали плазмидными векторами на основе pRS416. В результате получили рекомбинантные штаммы KRA2 – KRA6. (Приложение 1, таблица «штаммы *S. cerevisiae*»). Однако ни для одного из штаммов, экспрессировавших человеческие гены (KRA3–KRA6), не было отмечено восстановления способности к росту на респираторных средах; их фенотип оставался идентичным мутантному штамму KRA1. Неожиданно, даже возвращение нативного гена *MRF1* с его собственными регуляторными элементами в составе плазмидного вектора не привело к восстановлению респираторной функции (штамм KRA2). Таким образом, на данном этапе эксперимента не удалось получить необходимый положительный контроль (штамм KRA2), что не позволило сделать выводы о способности экспрессируемых человеческих генов *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR* и *MRPL58* комплементировать делецию *MRF1*.

3.2.2 Поиск оптимального способа редактирования генома дрожжей

Было выдвинуто предположение, что дрожжевые штаммы с делецией гена *MRF1* характеризуются фенотипом [ρ^0], вследствие чего введение плазмидного членочного вектора с исследуемыми генами не приводит к восстановлению респираторной функции. Для проверки данной гипотезы было произведено сравнение содержания 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 pMRF1 (KRA2).

№	Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Среднее значение Сq	Станд. откл. Сq	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> +pMRF1	мтДНК	29,11	8.09%	0,02
			яДНК	23,46	4.33%	

* - Представлены сокращенные генотипы штаммов, содержащие только необходимую информацию. Полные генотипы указаны в Приложении (таблица «штаммы *S. cerevisiae*»). pMRF1 – плазмида pRS416_pro_ter_ *MRF1*. Целевой участок ДНК — участок генома, на который отжигались праймеры в количественной ПЦР (см. «Материалы и методы» и таблицу «Олигонуклеотиды»). Отношение рассчитывали по формуле $2^{ΔCq}$. Эксперимент проводился три раза ($N = 3$) в трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Анализ данных, представленных в таблице 4, однозначно демонстрирует, что делеция гена *MRF1* приводит к значительной деплекции митохондриальной

ДНК по отношению к ядерной ДНК, а доставка дополнительной копии гена с использованием плазмидного вектора не способствует восстановлению данного соотношения. В нормальных условиях в клетках содержится множество копий митохондриальной ДНК, в то время как ядерная ДНК представлена одной копией (все штаммы являются гаплоидными). Сопоставление данных мутантного и дикого типа из таблицы 4 позволяет заключить, что при удалении гена *MRF1* уровень mtДНК снижается в 5000–7000 раз.

В целях демонстрации необратимой утраты mtДНК в штаммах с делецией *MRF1* было проведено скрещивание штамма-делетанта KRA1 с исходным штаммом противоположного типа спаривания DAU0, обладающим фенотипом [*MATa*, *MRF1*, *rho0*], из которого предварительно была удалена митохондриальная ДНК (посредством воздействия бромистого этидия, см. раздел «Материалы и методы»). Полученный диплоидный гибрид KRA1-1 [*MATa/MATa*, *MRF1/MRF1::HphB*] также демонстрировал отрицательный респираторный фенотип и крайне низкое соотношение mtДНК к ядерной ДНК. Таким образом, при продолжительном культивировании клеток без гена *MRF1* происходит утрата митохондриальной ДНК и необратимая деградация митохондрий.

В качестве альтернативного подхода была предложена интеграция исследуемых генов непосредственно в геном по локусу *MRF1*, 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 исключался, 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 *MRF1* интегрирована в соответствующий геномный локус, как реализовано на рисунке 19, панель 1 (штамм KRA11). Сохранение респираторной функции при таком редактировании генома обеспечивает возможность достоверной оценки

способности человеческих гомологов и факторов спасения миторибосомы комплементировать утрату гена *MRF1*.

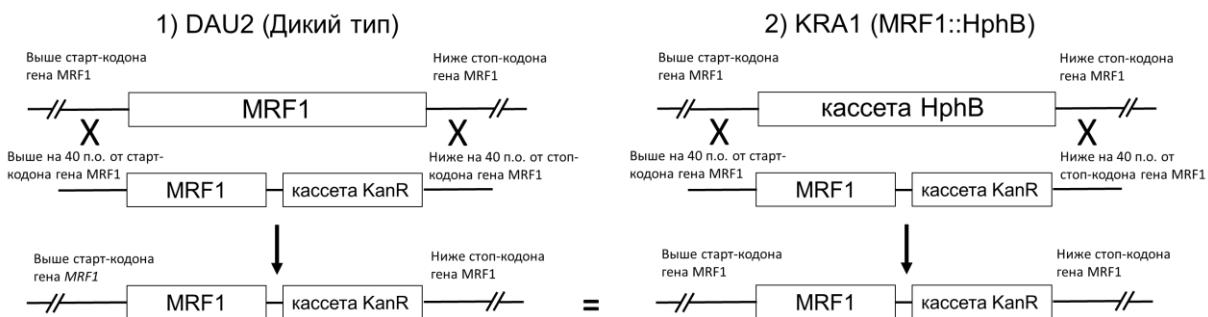


Рисунок 19 – Схема гомологичной рекомбинации в штамме дикого типа и в штамме с делецией гена *MRF1* после трансформации линейным фрагментом ДНК, несущим кодирующую последовательность гена *MRF1* и кассету устойчивости к G418.1 — схема получения штамма KRA11; 2 — схема получения штамма KRA12.

Учитывая специфику предыдущих результатов, на данном этапе эксперимента в первую очередь были сконструированы положительный и отрицательный контрольные штаммы. Для этого проводилась трансформация штамма дикого типа DAU2 и штамма KRA1 с делецией *MRF1* линейным фрагментом ДНК, содержащим кодирующую последовательность гена *MRF1* и кассету устойчивости к антибиотику G418 (Рисунок 19). Применение различных маркерных кассет позволило проводить селекцию трансформантов по экспрессии соответствующего маркерного гена.

В результате трансформации были получены штаммы KRA11 и KRA12, идентичные по последовательности в локусе *mrf1* (Рисунок 19). Анализ респираторного фенотипа выявил различия между штаммами (Рисунок 20): у штамма KRA11, полученного на основе штамма дикого типа, митохондриальная функция полностью сохранялась (Рисунок 19, А), тогда как у штамма KRA12, полученного из штамма с делецией *MRF1*, наблюдалась необратимая утрата митохондриальной функции (Рисунок 20, В). При этом оба

штамма являются изогенными по локусу *mrf1*. Анализ отношения митохондриальной ДНК к ядерной также выявил существенные различия: уровень mtДНК штамма KRA11 соответствовал уровню дикого типа, тогда как штамм KRA12 — уровню мутанта с делецией *MRF1* (Таблица 5).

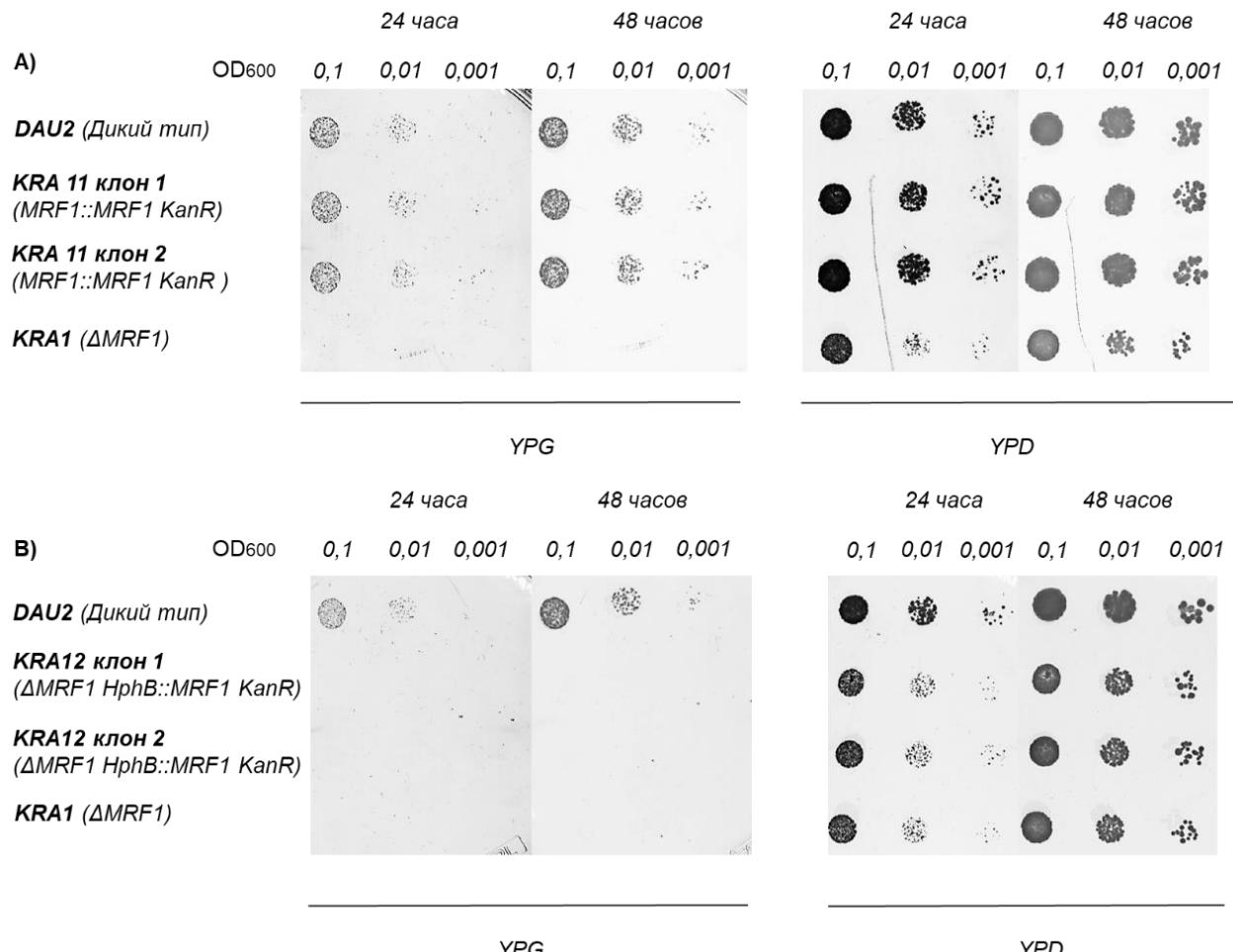


Рисунок 20 – Анализ респираторного фенотипа штаммов KRA11 (A) и KRA12 (B). Рост на YPD (среда с глюкозой) — контроль нанесения; рост на YPG (среда с глицерином) характеризует работу митохондрий.

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

№	Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Среднее значение Сq	Станд. Откл. Сq	мтДНК / яДНК
1	DAU2	<i>Дикий тип</i>	мтДНК	16,07	3.93%	144,32
			яДНК	23,24	4.87%	
2	KRA1	<i>MRF1::HphB</i>	мтДНК	28,15	2.36%	0,02
			яДНК	22,75	4.88%	
3	KRA11	<i>MRF1</i> → <i>MRF1-KanR</i>	мтДНК	16,20	5,56%	146,91
			яДНК	23,40	4.07%	
4	KRA12	<i>MRF1::HphB</i> → <i>MRF1-KanR</i>	мтДНК	26,38	6.91%	0,02
			яДНК	20,86	6.75%	

* - Представлены сокращенные генотипы штаммов, содержащие только необходимую информацию. Полные генотипы указаны в Приложении (таблица «штаммы *S. cerevisiae*»). Целевой участок ДНК — участок генома, на который отжигались праймеры в количественной ПЦР (праймеры на мтДНК и ген-ДНК см. «Материалы и методы» и таблицу “Олигонуклеотиды”). Отношение рассчитывали по формуле $2^{ΔCq}$. Эксперимент проводился три раза ($N = 3$) в трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что вне зависимости от выбранной стратегии восстановления, будь то доставка копии гена с помощью плазмидного вектора или интеграция линейного ДНК-фрагмента в геном, восстановление респираторного фенотипа не наблюдается при условии, что мутантный штамм существенное время функционировал без гена *MRF1*. По всей вероятности, это обусловлено необратимой деградацией митохондриальной ДНК.

3.2.3 Редактирование генома *S. cerevisiae* посредством гомологичной рекомбинации человеческих генов *MTRF1*, *MTRF1A*, *MRPL58*, *MTRFR*, анализ полученных гуманизированных линий пекарских дрожжей.

Редактирование генома посредством гомологичной рекомбинации линейной кассетой, содержащей исследуемый ген и селективный маркер, оказалось надёжным способом замены кодирующей последовательности гена *MRF1* на любую другую последовательность, позволяющим избежать стадии получения штамма-делетанта, на которой происходила потеря дыхательной функции. Эта технология позволяет исследовать комплементацию делеции *MRF1*, меняя кодирующую последовательность *MRF1* в кассете на любой другой интересующий ген, в частности на гомологи факторов терминации трансляции митохондрий человека: *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, *MRPL58* (Рисунок 16). С использованием данного подхода были получены штаммы-мутанты KRA7, KRA8, KRA9, KRA10 (Приложение 1, «штаммы *S. cerevisiae*»).

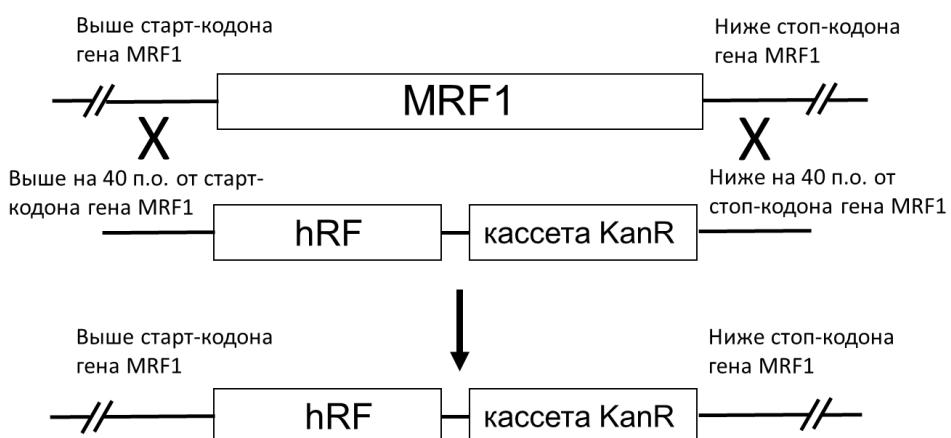


Рисунок 21 - Схема редактирования генома *Saccharomyces cerevisiae* посредством замены кодирующей последовательности гена *MRF1* линейным фрагментом ДНК с кодирующей последовательностью *hRF* – гомологи и факторы спасения рибосом из митохондрий человека.

Из указанных штаммов была выделена РНК для анализа экспрессии человеческих трансгенов *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, *MRPL58* методом обратной транскрипции и количественной ПЦР (Таблица 6). Данные, представленные в таблице 6, однозначно свидетельствуют о том, что все гены факторов

терминации трансляции митохондрий экспрессируются на уровне гена *MRF1* штамма дикого типа.

Таблица 6. Анализ экспрессии в гуманизированных штаммах гетерологических генов (человеческих митохондриальных факторов терминации и факторов спасения миторибосомы человека) с помощью ОТ кПЦР.

Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Тип матрицы	Среднее значение Сq	Станд. Откл. Сq	«RT+» / «RT —»
KRA8	<i>MRF1::hM</i>	<i>MTRF1A</i>	RT +	28,41	8.32%	80,38
	<i>TRF1A-KanMX6</i>		RT —	34,74	11.54%	
KRA7	<i>MRF1::hM</i>	<i>MTRF1</i>	RT +	26,34	7.88%	215,15
	<i>TRF1-KanMX6</i>		RT —	34,09	10.95%	
KRA9	<i>MRF1::hM</i>	<i>MTRFR</i>	RT +	23,99	5.21%	537,37
	<i>TRFR-KanMX6</i>		RT —	33,06	8.67%	
KRA10	<i>MRF1::hM</i>	<i>MRPL58</i>	RT +	28,31	6.02%	26,90
	<i>RPL58-KanMX6</i>		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. Полные генотипы указаны в Приложении (таблица «штаммы *S. cerevisiae*»). 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 Сq 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 $2^{ΔCq}$. Эксперимент проводился три раза ($N = 3$) в трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Анализ соотношения мтДНК к ядерной ДНК 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). По результатам анализа роста на среде с глицерином было показано, что респираторная функция у штаммов KRA7 — KRA10 отсутствует.

Таким образом, из данных, полученных в результате оценки отношения мтДНК к я-ДНК в штаммах KRA5 - KRA8 (Таблица 7), следует, что при замене *MRF1* на его человеческие белки, дрожжи не теряют митохондриальную ДНК настолько значительно, как штамм с делецией *MRF1*. Однако, несмотря на экспрессию человеческих гомологов в клетках дрожжей, дыхательный фенотип, характеризующий функцию митохондрий, всё равно не восстановился.

Таблица 7. Соотношение количества мтДНК к яДНК

№	Штамм	Генотип*	Целевой участок ДНК	Среднее значение Сq	Станд. Откл. Сq	мтДНК / яДНК
1	DAU2	<i>Дикий тип</i>	мтДНК	16,07	3.93%	144,32
			яДНК	23,24	4.87%	
2	KRA8	<i>MRF1::MTRF1-a-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::MRP58-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. Полные генотипы указаны в Приложении (таблица «штаммы *S. cerevisiae*»). Целевой участок ДНК — фрагмент ДНК, на который отжигались праймеры в количественной ПЦР. Отношение мтДНК к ядерной ДНК рассчитывали по формуле $2^{ΔCq}$. Эксперимент проводился в трёх биологических ($N = 3$) и трех технических повторностях ($n = 3$), и стандартное отклонение рассчитано по этим данным.

Аналитическое скрещивание ранее гуманизированных штаммов дрожжей с контрольным штаммом DAU 0 (генотип: [*MATα, rho⁰*]) показало, что штаммы KRA7 (*MTRF1*) и KRA8 (*MTRF1A*) полностью не утратили митохондриальную функцию. В частности, полученные гибридные диплоидные линии оказались способны расти на средах с несбраживаемыми источниками углерода (крупные колонии на рисунке 22б и 22в), тогда как у гибридов полученных от штаммов KRA9 (*MTRFR*), 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* участвуют в поддержании мтДНК (Рисунок 22).

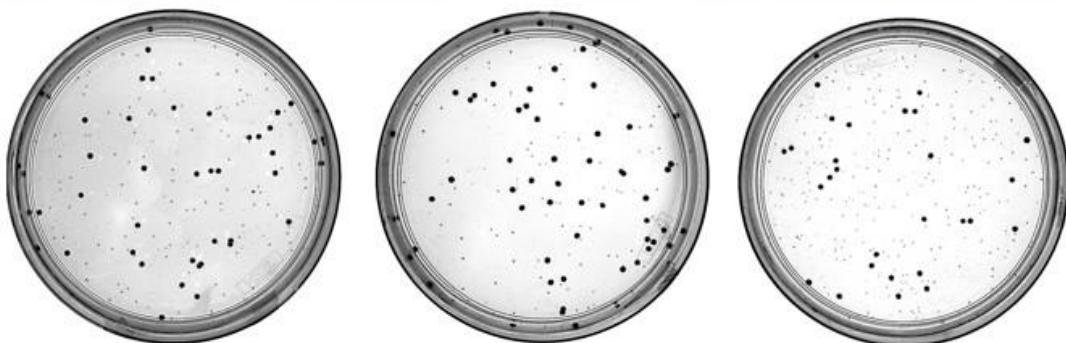
А)

KRA1 (*MAT α , MRF1::HphB*) * \times **DAU0** (*MAT α , MRF1, rho 0*) *



Б)

KRA7 (*MAT α , MRF1::hMTRF1 + KanMX*) * \times **DAU0** (*MAT α , MRF1, rho 0*) *



В)

KRA8 (*MAT α , MRF1::hMTRF1a + KanMX*) * \times **DAU0** (*MAT α , MRF1, rho 0*) *

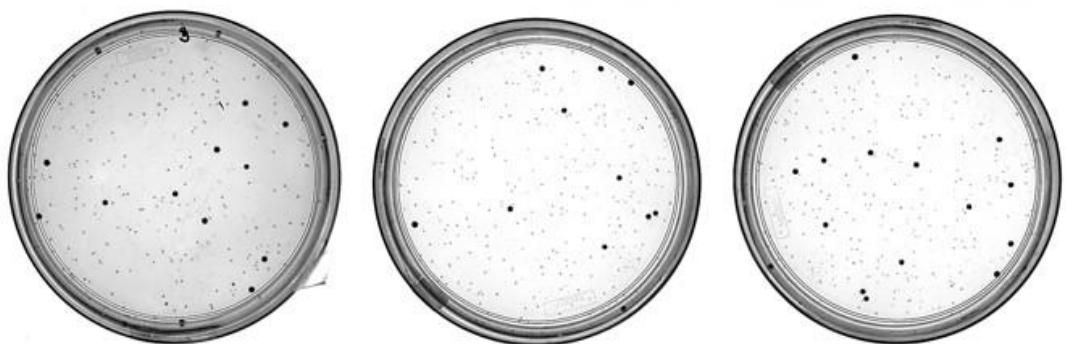


Рисунок 22 – Результаты аналитического скрещивания штаммов-мутантов с человеческими гомологами митохондриального фактора терминации с контрольным штаммом DAU0 с фенотипом *rho 0* .

А) – результаты скрещивания штамма KRA1 с контрольным штаммом DAU0; Б) – результаты скрещивания штамма KRA7 с контрольным штаммом DAU0; В) – результаты скрещивания штамма KRA8 с контрольным штаммом DAU0.

* Представлены сокращенные генотипы штаммов, содержащие только необходимую информацию. Полные генотипы указаны в Приложении (таблица «штаммы *S. cerevisiae*»).

Данные по результатам скрещивания штаммов KRA9 и KRA10 не представлены, в связи с их низкой информативностью (данные идентичны результатам скрещивания штамма KRA1).

Для доказательства экспрессии гетерологических генов (*hMTRF1A*, *hMTRF1*, *hMTRFR*, *hMRPL58*) на уровне белков и импорта соответствующих полипептидов в митохондрии дрожжей мы отредактировали геном штаммов KRA7 – KRA10 посредством добавления на 3'-конец каждого человеческого гена трех эпигенетиков гемагглютинина гриппа (НА) (Рисунок 23).

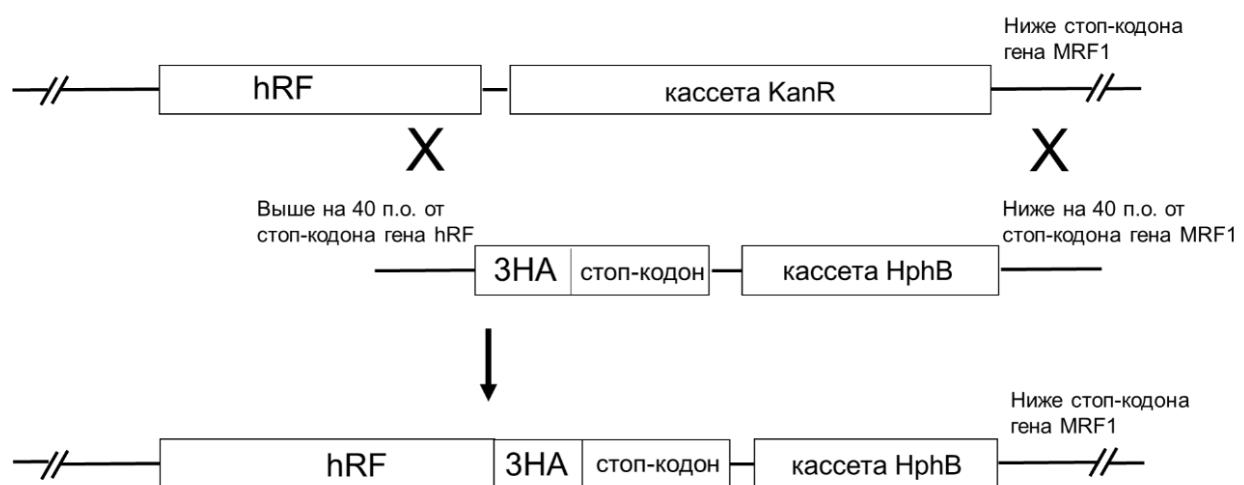


Рисунок 23 – Схема редактирования генома штаммов KRA7 – KRA10 посредством замены стоп-кодона генов *hRF* на последовательность кодирующую эпигенетическую метку – 3НА с кассетой устойчивости к гигромицину Б. «*hRF*» – кодирующая последовательность одного из генов *MTRF1A*, *MTRF1*, *MTRFR*, *MRPL58* человека.

В результате проведённой работы были получены новые штаммы *S.*

cerevisiae, обозначенные как KRA13 – KRA16 (см. таблицу «Штаммы *S. cerevisiae*»). Однако, из-за выраженного негативного респираторного фенотипа, наблюдавшегося у трансформированных штаммов, экспрессирующих гетерологичные (человеческие) белки, оказалось невозможным выделение митохондрий в количествах, пригодных для последующего анализа. Это обстоятельство не позволяло осуществить прямую оценку митохондриального импорта трансгенов. В связи с этим была проведена гибридизация изучаемых штаммов с штаммом DAU1 генотип: [MAT α , rho $^+$], в результате чего были получены диплоидные гибридные штаммы с сохранённой митохондриальной функцией, обеспечивающей возможность выделения митохондрий для их последующего анализа. Вестерн-блоттинг лизатов митохондрий, показал наличие продуктов экспрессии всех человеческих трансгенов (Рисунок 24).

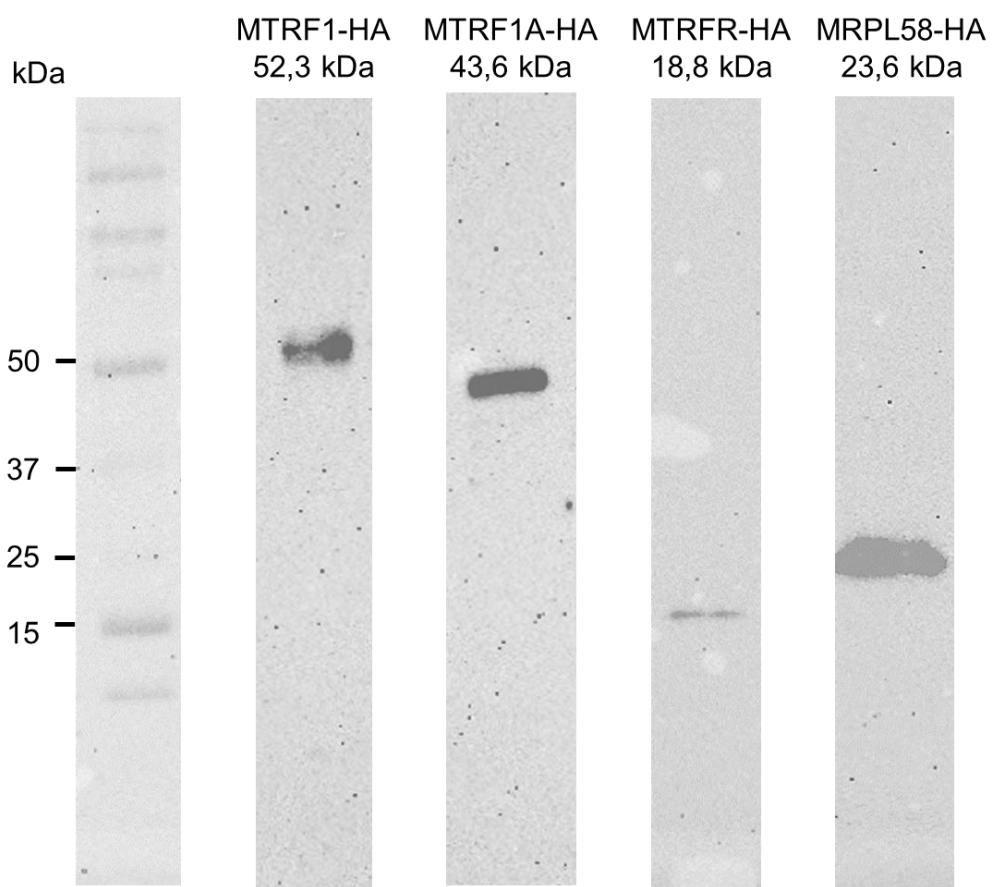


Рисунок 24 – Вестерн-блоттинг лизатов митохондрий гибридных штаммов-рекомбинантов производных от KRA13 — KRA16. На блоте видны сигналы для KRA13 (MTRF1-HA), KRA14 (MTRF1A-HA), KRA 15 (MTRFR-HA) и KRA16 (MRPL58-HA). Маркер (левая дорожка) приложен из скана

мембранны в белом свете; остальные дорожки – скан в режиме хемилюминисценции.

Важно отметить, что штаммы KRA13 – KRA16 и их диплодиные производные были получены исключительно для визуализации белковых продуктов и не использовались при изучении комплементации делеции гена *MRF1*, поскольку добавление 3-НА тега могло нарушить их функцию.

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-меченные митохондриальные рибосомные белки (МРБ), с последующей изоляцией миторибосомных комплексов из этих штаммов посредством иммунопреципитации и с дальнейшем 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. Попарные 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 интерактомов 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 меченным Pet111 соосаждались 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 *rho⁰*. 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, приобретя 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 эквимолярных 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ott M., Amunts A., Brown A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis // *Annu. Rev. Biochem.* – 2016. – V. 2. – № 85. – P. 77-101.
2. Kummer E., Ban B. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2021. – V. 22. – № 5. – P. 307-325.
3. Sharma S.B., Nasir A., Prabhu K.M., Murthy P.S., Dev G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of Eugenia jambolana in alloxan-induced diabetic rabbits // *J. Ethnopharmacol.* – 2003. – V. 85. – № 2-3. – P. 201-206.
4. Levitskii S.A., Baleva M.V., Chicherin I.V., Krasheninnikov I.A., Kamenski P.A. Protein Biosynthesis in Mitochondria: Past Simple, Present Perfect, Future Indefinite // *Biochemistry (Mosc).* – 2020. – V. 85. – № 3. – P. 257-263.
5. Greber B.J., Ban N. Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome // *Annu. Rev. Biochem.* – 2016. – V. 2. – № 85. – P. 103-132.
6. Amunts A., Brown A., Bai X., Llacer J.L., Hussain T., Emsley P., Long F., Murshudov G., Scheres S.H.W., Ramakrishnan V. Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit // *Science.* – 2014. – V. 343. – № 6178. – P. 1485-1489.
7. Itoh Y., Andrell J., Choi A., Richter U., Maiti P., Best R.B., Barrientos A., Battersby B.J., Amunts A. Mechanism of membrane-tethered mitochondrial protein synthesis // *Science.* – 2021. – V. 371. – № 6531. – P. 846-849.
8. Kummer E., Leibundgut M., Rackham O., Lee R.G., Boehringer D., Filipovska A., Ban N. Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM // *Nature.* – 2018. – V. 560. – № 7717. – P. 263-267.
9. Desai R., East D.A., Hardy L., Faccenda D., et al. Mitochondria form contact sites with the nucleus to couple prosurvival retrograde response // *Sci. Adv.* – 2020. – V. 6. – № 51.

10. Itoh Y., Singh V., Khawaja A., Naschberger A., Nguyen M.D., Rorbach J., Amunts A. Structure of the mitoribosomal small subunit with streptomycin reveals Fe-S clusters and physiological molecules // *Elife*. – 2022. – V. 8. – № 11. e77460.
11. Rebelo-Guiomar P., Pellegrino S., et al. A late-stage assembly checkpoint of the human mitochondrial ribosome large subunit // *Nat. Commun.* – 2022. – V. 13. – № 1. – P.929.
12. Ferretti M.B., Karbstein K. Does functional specialization of ribosomes really exist? // *RNA*. – 2019. – V. 25. – № 5. – P. 521-538.
13. Tomal A., Kwasniak-Owczarek M., Janska H. An Update on Mitochondrial Ribosome Biology: The Plant Mitoribosome in the Spotlight // *Cells*. – 2019. – V. 8. – № 12. – P. 1562.
14. Desai N., Brown A., Amunts A., Ramakrishnan V. The structure of the yeast mitochondrial ribosome // *Science*. – 2017. – V. 355. – № 6324. – P. 528–531.
15. Antonicka H., Shoubridge E.A. Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis // *Cell Rep.* – 2015. – V. 10. – № 6. – P. 920-932.
16. Herrmann C.S., Rach S., Neuling T., Strüber D. Transcranial alternating current stimulation: a review of the underlying mechanisms and modulation of cognitive processes // *Front Hum. Neurosci.* – 2013. – V. 14. – № 7. – P. 279.
17. Mulero J.J., Fox T.D. PET111 acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial COX2 mRNA to promote its translation // *Genetics*. – 1993. – V. 133. – № 3. – P. 509-516.
18. Nadler F., Richter-Dennerlein R. Translation termination in human mitochondria - substrate specificity of mitochondrial release factors // *Biol. Chem.* – 2023. – V. 404. – № 8-9. – P. 769-779.
19. Nadler F., Lavdovskaia E., Krempler A., Cruz-Zaragoza L.D., Dennerlein S., Richter-Dennerlein R. Human mtRF1 terminates COX1 translation and its ablation induces mitochondrial ribosome-associated quality control // *Nat. Commun.* – 2022. – V. 13. – № 1. – P. 6406.

20. Krüger A., Kovalchuk D., Shiriaev D., Rorbach J. Decoding the Enigma: Translation Termination in Human Mitochondria // *Hum. Mol. Genet.* – 2024. – V. 33. – № R1. – P. R42-R46.
21. 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 // *Front Mol. Biosci.* – 2021. V. 16. – № 8. – P. 716885.
22. Ernster L., Schatz G. Mitochondria: a historical review // *J. Cell Biol.* – 1981. – V. 91. – № 3 Pt. 2. – P. 227s-255s.
23. Palade G.E. The fine structure of mitochondria // *Anat. Rec.* – 1952. – V. 114. – № 3. – P. 427-451.
24. Clark-Walker G. D., Linnane A.W. In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1966. – V. 25. – № 1. – P. 8-13.
25. Casanova A., Wevers A., Navarro-Ledesma S., Pruimboom L. Mitochondria: It is all about energy // *Front. Physiol.* – 2023. – V. 25. – № 14. – P. 1114231.
26. Sagan L. On the origin of mitosing cells // *J. Theor. Biol.* – 1967. – V. 14. – № 3. – P. 255-274.
27. Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., et al. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // *Nature*. – 2017. – V. 541. – № 7637. – P. 353-358.
28. Roger A.J., Muñoz-Gómez S.A., Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria // *Curr. Biol.* – 2017. – V. 27. – № 21. – P. R1177-R1192.
29. Каменский П.А. Импорт РНК в митохондрии и митохондриальная трансляция: механизмы и взаимосвязь // Диссер., на соиск., уч., степени д., б., н., по спец., 03.01.03 – молекулярная биология. – 2017. – Москва.
30. Malina C., Larsson C., Nielsen J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology // *FEMS Yeast Res.* – 2018. – V. 18. – № 5.

31. Gonczarowska-Jorge H., Zahedi R.P., Sickmann A. The proteome of baker's yeast mitochondria // *Mitochondrion*. – 2017. – V. 33. – P. 15-21.
32. Remes C., Khawaja A., et al. Translation initiation of leaderless and polycistronic transcripts in mammalian mitochondria // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – № 2. – P. 891-907.
33. Khawaja A., Itoh Y., Remes C, Spähr H., Yukhnovets O., Höfig H., Amunts A., Rorbach J. Distinct pre-initiation steps in human mitochondrial translation // *Nat Commun.* – 2020. – V. 11. – № 1. – P. 2932.
34. Wang F., Zhang D., Zhang D., Li P., Gao Y. Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. – V. 1. – № 9. – P. 675465.
35. Ayyub S.A., Varshney U. Translation initiation in mammalian mitochondria- a prokaryotic perspective // *RNA Biol.* – 2020. – V. 17. – № 2. – P. 165-175.
36. Amunts A., Brown A., Toots J., Scheres S.H.W., Ramakrishnan V. The structure of the human mitochondrial ribosome // *Science*. – 2015. – V. 348. – № 6230. – P. 95–98.
37. Williams E.H., Butler C.A., Bonnefoy N., Fox T.D. Translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: functional interactions among mitochondrial ribosomal protein Rsm28p, initiation factor 2, methionyl-tRNA-formyltransferase and novel protein Rmd9p // *Genetics*. – 2007. – V. 175. – № 3. – P. 1117-1126.
38. Chicherin I., Levitskii S., Baleva M.V., Krasheninnikov I.A., Patrushev M.V., Kamenski P. Yeast Mitochondrial Translation Initiation Factor 3 Interacts with Pet111p to Promote COX2 mRNA Translation // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 10. – P. 3414.
39. Hubble K.A., Henry M.F. DPC29 promotes post-initiation mitochondrial translation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – № 3. – P. 1260-1276.

40. Christian B.E., Spremulli L.L. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1819. – № 9-10. – P. 1035-1054.
41. Kummer E., Ban N. Structural insights into mammalian mitochondrial translation elongation catalyzed by mtEFG1 // *EMBO J.* – 2020. – V. 39. – № 15. – P. e104820.
42. Smits P., Smeitink J.A.M., Heuvel L.P., Huynen M.A., Ettema T.J.G. Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – № 14. – P. 4686–4703.
43. Gao Y., Bai X., et al. Mammalian elongation factor 4 regulates mitochondrial translation essential for spermatogenesis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2016. – V. 23. – № 5. – P. 441-449.
44. Chiron S., Suleau A., Bonnefoy N. Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast // *Genetics.* – 2005. – V. 169. – № 4. – P. 1891-1901.
45. Rosenthal L.P., Bodley J.W. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial elongation factor Tu // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – № 23. – P. 10955-10959.
46. Geng J., Li S., Li Y., Wu Zh., Bhurtel S., Rimal S., Khan D., Ohja R., Brandman O., Lu B. Stalled translation by mitochondrial stress upregulates a CNOT4-ZNF598 ribosomal quality control pathway important for tissue homeostasis // *Nat. Commun.* – 2024. – V. 15. – № 1. – P. 1637.
47. Кузьменко А.В., Левицкий С.А., Виноградова Е.Н., Аткинсон Д., Гаврилюк В., Зенкин Н., Каменский П.А. Биосинтез белка в митохондриях // – Т. 78. – № 8. – Стр. 1093 – 1107.
48. Kummer E., Schubert K.N., Schoenhet T., Scaiola A., Ban N. Structural basis of translation termination, rescue, and recycling in mammalian mitochondria // *Mol. Cell.* – 2021. – V. 81. - № 12. – P. 2566-2582.

49. Krüger A., Remes C. Human mitochondria require mtRF1 for translation termination at non-canonical stop codons // *Nat. Commun.* – 2023. – V. 14. – № 1. – P. 30.
50. Lavdovskaia E., Denks K., Nadler F., Steube E., Linden A., Urlaub H., Rodnina M.V., Richter-Dennerlein R. Dual function of GTPBP6 in biogenesis and recycling of human mitochondrial ribosomes // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. - № 22. – P. 12929-12942.
51. Koripella R.K., Sharma M.R., Risteff P., Keshavan P., Agrawal R.K. Structural insights into unique features of the human mitochondrial ribosome recycling // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2019. – V. 116. - № 17. – P. 8283-8288.
52. Rorbach J., Richter R., Wessels H.J., Wydro M., Pekalski M., Farhoud M., Kühl I., Gaisne M., Bonnefoy N., Smeitink J.A., Lightowlers R.N., Chrzanowska-Lightowlers Z.M.A. The human mitochondrial ribosome recycling factor is essential for cell viability // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36. – № 18. – P. 5787-5799.
53. Koripella R.K., Deep A., Agrawal E.K., Keshavan P., Banavali N.K., Agrawal R.K. Distinct mechanisms of the human mitoribosome recycling and antibiotic resistance // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 3607.
54. Seely S.M., Gagnon M.G. Mechanisms of ribosome recycling in bacteria and mitochondria: a structural perspective // *RNA Biol.* – V. 19. – № 1. – P. 662-677.
55. Towpik J., Chacińska A., Ciesla M., Ginalski K., Boguta M. Mutations in the yeast mrf1 gene encoding mitochondrial release factor inhibit translation on mitochondrial ribosomes // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 14. – P. 14096-140103.
56. Hoshino S., Kanemura R., Kurita D., Soutome Y., Himeno H., Takaine M., Watanabe M., Nameki N. A stalled-ribosome rescue factor Pth3 is required for mitochondrial translation against antibiotics in *Saccharomyces cerevisiae* // *Commun. Biol.* – 2921. – V. 4. – № 1. – P. 300.

57. Teyssier E., Hirokawa G., Tretiakova A., Jameson B., Kaji A., Kaji H. Temperature-sensitive mutation in yeast mitochondrial ribosome recycling factor (RRF) // Nucleic Acids Res. – 2003. – V. 31. – № 14. – P. 4218–4226.
58. Ostojić J, Panizzo C., Bourand-Plantefol A., Herbert C.J., Dujardin G., Bonnefoy N. Ribosome recycling defects modify the balance between the synthesis and assembly of specific subunits of the oxidative phosphorylation complexes in yeast mitochondria // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – № 12. – P. 5785-5797.
59. Kuzmenko A., Derbikova K., Salvatori R., Tankov S., Atkinson G.C., Tenson T., Ott M., Kamenski P., Hauryliuk V. Aim-less translation: loss of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation initiation factor mIF3/Aim23 leads to unbalanced protein synthesis // Sci. Rep. – 2016. – V. 5. – № 6. – P. 18749.
60. Chicherin I.V., Zinina V.V., Levitskiy S.A., Serebryakova M.V., Kamenski P.A. Aim23p Interacts with the Yeast Mitochondrial Ribosomal Small Subunit // Biochemistry (Mosc). – 2019. – V. 84. – № 1. – P. 40-46.
61. Naithani S., Saracco S.A., Butler C.A., Fox T.D. Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific Translational Activator Proteins on the Inner Surface of the Mitochondrial Inner Membrane of *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Biol. Cell. – 2003. – V. 14. – № 1. – P. 324–333.
62. Zamudio-Ochoa A., Camacho-Villasana Y., García-Guerrero A.E., Perez-Martinez X. The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast // RNA Biol. – 2014. – V. 11. – № 7. – P. 953–967.
63. Herrmann J.M., Woellhaf M.W., Bonnefoy N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – V. 1833. – № 2. – P. 286-294.
64. Roloff G.A., Henry M.F. Mam33 promotes cytochrome c oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria // Mol. Biol. Cell. – 2015. – V. 26. – № 16. – P. 2885-2894.

65. Jones J.L., Hofmann K.B., Cowan A.T., Temiakov D., Cramer P., Anikin M. Yeast mitochondrial protein Pet111p binds directly to two distinct targets in COX2 mRNA, suggesting a mechanism of translational activation // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294. – № 18. – P. 7528-7536.
66. Green-Willms N.S., Butler C.A., Dunstan H.M., Fox T.D. Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2 // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – № 9. – P. 6392-6397.
67. McMullin T.W., Fox T.D. COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 16. – P. 11737-11741.
68. Brown N.G., Costanzo M.C., Fox T.D. Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell Biol.* – 1994. – V. 14. – № 2. – P. 1045–1053.
69. Mayorga J.P., Camacho-Villasana Y., Shingu-Vazquez M., Garcia-Villegas R., Zamudio-Ochoa A., Garcia-Guerrero A.E., Hernandez G., Perez-Martinez X. A Novel Function of Pet54 in Regulation of Cox1 Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291. – № 17. – P. 9343-9355.
70. Haffter P., McMullin T.W., Fox T.D. Functional interactions among two yeast mitochondrial ribosomal proteins and an mRNA-specific translational activator // *Genetics*. – 1991. – V. 127. – № 2. – P. 319-326.
71. Costanzo M.C., Fox T.D. Suppression of a defect in the 5' untranslated leader of mitochondrial COX3 mRNA by a mutation affecting an mRNA-specific translational activator protein // *Mol. Cell Biol.* – 1993. – V. 13. – № 8. – P. 4806-4813.
72. Ohmen J.D., Kloeckener-Gruissem D., McEwen J.E. Molecular cloning and nucleotide sequence of the nuclear PET122 gene required for expression of the

- mitochondrial COX3 gene in *S. cerevisiae* // Nucleic Acids Res. – 1988. – V. 16. – № 22. – P. 10783-10802.
73. Costanzo M.C., Fox T.D. Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene PET494 activates translation of a specific mitochondrial mRNA // Mol. Cell Biol. – 1986. – V. 6. – № 11. – P. 3694-3703.
74. Su C. H., McStay G.P., Tzagoloff A. The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase // Mol. Biol. Cell. – 2014. – V. 25. – № 7. – P. 965–976.
75. Krause-Buchholz U., Schöbel K., Lauffer S., Rödel G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes // Biol. Chem. – 2005. – V. 386. – № 5. – P. 407-415.
76. Wu D., Zhu G., Zhang Y., Wu Y., Zhang C., Shi J., Zhu X., Yuan X. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a mitochondrial membrane-associated protein Cbs2 from *Saccharomyces cerevisiae* // PeerJ. – 2021. – V. 17. – № 9. – P. e10901.
77. Krause-Buchholz U., Barth K., Dombrowski C., Rödel G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes // Curr. Genet. – 2004. – V. 46. – № 1. – P. 20-28.
78. Mittelmeier T.M., Dieckmann C.L. CBP1 function is required for stability of a hybrid cob-oli1 transcript in yeast mitochondria // Curr. Genet. – V. 18. – № 5. – P. 421-428.
79. Gruschke S., Römplер K., Hildenbeutel M., Kehrein K., Kühl I., Bonnefoy N., Ott M. The Cbp3–Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc1 complex assembly in yeast mitochondria // J. Cell Biol. – 2012. – V. 199. – № 1. – P. 137–150.
80. Zeng X., Hourset A., Tzagoloff A. The *Saccharomyces cerevisiae* ATP22 Gene Codes for the Mitochondrial ATPase Subunit 6-Specific Translation Factor // Genetics. – 2007. – V. 175. – № 1. – P. 55–63.
81. Rak M., Su C.H., Xu J.T., Azpiroz R., Singh A.M., Tzagoloff A. Regulation of mitochondrial translation of the ATP8/ATP6 mRNA by Smt1p // Mol. Biol. Cell. – 2016. – V. 27. – № 6. – P. 919–929.

82. Rak M., Tzagoloff A. F1-dependent translation of mitochondrialy encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – V. 106. – № 44. – P. 18509-18514.
83. Zeng X., Barros M.H., Shulman T., Tzagoloff A. ATP25, a new nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for expression and assembly of the Atp9p subunit of mitochondrial ATPase // Mol. Biol. Cell. – 2008. – V. 19. – № 4. – P. 1366-1377.
84. Lipinski K.A., Puchta O., Surendranath V., Kudla M., Golik P. Revisiting the yeast PPR proteins--application of an Iterative Hidden Markov Model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family // Mol. Biol. Evol. – 2011. – V. 28. – № 10. – P. 2935-2948.
85. Seshadri S.R., Banarjee C., Barros M.H., Fontanesi F. The translational activator Sov1 coordinates mitochondrial gene expression with mitoribosome biogenesis // Nucleic Acids Res. – 2020. – V. 48. – № 12. – P. 6759-6774.
86. Brischigliaro M., Krüger A., Moran J.C., Antonicka H., Ahn A., Shoubridge E.A., Rorbach J., Barrientos A. The human mitochondrial translation factor TACO1 alleviates mitoribosome stalling at polyproline stretches // Nucleic Acids Res. – 2024. – V. 52. – № 16. – P. 9710-9726.
87. Richman T.R., Spåhr H., at al., Loss of the RNA-binding protein TACO1 causes late-onset mitochondrial dysfunction in mice // Nat. Commun. – 2016. – V. 20. – № 7. – P. 11884.
88. Weraarpachai W., Antonicka H., Sasarman F., Seeger J., Schrank B., Kolesar J.E., Lochmüller H., Chevrette M., Kaufman B.A., Horvath R., Shoubridge E.A. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome // Nat. Genet. – 2009. – V. 41. – № 7. – P. 833-837.
89. Singh V., Moran J.C., Itoh Y., Soto I.C., Fontanesi F., Couvillion M., Huynen M.A., Churchman L.S., Barrientos A., Amunts A. Structural basis of LRPPRC-SLIRP-dependent translation by the mitoribosome // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2024. – V. 31. – № 12. – P. 1838-1847.

90. Spåhr H., Rozanska A., Li X., Atanassov I., Lightowers R.N., Chrzanowska-Lightowers Z.M.A., Rackham O., Larsson N. SLIRP stabilizes LRPPRC via an RRM-PPR protein interface // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – № 14. – P. 6868-6882.
91. Graack H.R., Wittmann-Liebold B. Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast // Biochem. J. – 1998. – V. 329. – № Pt 3. – P. 433-448.
92. Pfeffer M.A., Claggett B., Diaz R., et al. Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome // N. Engl. J. Med. – 2015. – V. 373. – № 23. – P. 2247-2257.
93. Hillman G.A., Henry M.F. The yeast protein Mam33 functions in the assembly of the mitochondrial ribosome // J. Biol. Chem. – 2019. – V. 294. – № 25. – P. 9813-9829.
94. Kitagawa H., Tsutsumi K., Ujikawa M., Goto F., Tamura J., Neumann K.W., Ogawa T., Sugahara K. Regulation of chondroitin sulfate biosynthesis by specific sulfation: acceptor specificity of serum beta-GalNAc transferase revealed by structurally defined oligosaccharides // Glycobiology. – 1997. – V. 7. – № 4. – P. 531-537.
95. Möller-Herdt B.V., Carlström A., Stephan K., Imhof A., Ott M. The ribosome receptors Mrx15 and Mba1 jointly organize cotranslational insertion and protein biogenesis in mitochondria // Mol. Biol. Cell. – V. 29. – № 20. – P. 2386-2396.
96. Preuss M., Leonhard K., Hell K., Stuart R.A., Neupert W., Herrmann J.M. Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J. Cell Biol. – 2001. V. 153. – № 5. – P. 1085-1096.
97. Englmeier R., Pfeffer S., Förster F. Structure of the Human Mitochondrial Ribosome Studied In Situ by Cryoelectron Tomography // Structure. – 2017. – V. 25. – № 10. – P. 1574-1581.

98. Kachroo A.H., Vandeloo M., Greco B.M., Abdullah M. Humanized yeast to model human biology, disease and evolution // *Dis. Model Mech.* – 2022. – V. 15. – № 6. – P. 049309.
99. Kachroo A.H., Laurent J.M., Yellman C.M., Meyer A.G., Wilke C.O., Marcotte E.M. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity // *Science*. – 2015. – V. 348. – № 6237. – P. 921–925.
100. Laurent J.M., Garge R.K., Teufel A.I., Wilke C.O., Kachroo A.H., Marcotte E.M. Humanization of yeast genes with multiple human orthologs reveals functional divergence between paralogs // *PLoS Biol.* – 2020. – V. 18. – № 5. – P. e3000627.
101. Boonekamp F., Knibbe E., et al. Full humanization of the glycolytic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell Rep.* – 2022. – V. 39. – № 13. – P. 111010.
102. Qian Y., Kachroo A.H., Yellman C.M., Marcotte E.M., Johnson K.A. Yeast cells expressing the human mitochondrial DNA polymerase reveal correlations between polymerase fidelity and human disease progression // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V. 289. – № 9. – P. 5970-85.
103. Parisi M.A., Xu B., Clayton D.A. A human mitochondrial transcriptional activator can functionally replace a yeast mitochondrial HMG-box protein both in vivo and in vitro // *Mol. Cell Biol.* – 1993. – V. 13. – № 3. – P. 1951-61.
104. Derbikova K., Kuzmenko A., Levitskii S., Klimontova M., Chicherin I., Baleva M.V., Krasheninnikov I.A., Kamenski P. Biological and Evolutionary Significance of Terminal Extensions of Mitochondrial Translation Initiation Factor 3 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – № 12. – P. 3861.
105. Costanzo M.C., Fox T.D. Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1988. – V. 85. – № 8. – P. 2677-2681.
106. Lasserre J.P., Dautant A., et al. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies // *Dis. Model Mech.* – 2015. – V. 8. – № 6. – P. 509–526.

107. Dirick L., Bendris W., Loubiere V., Gostan T., Gueydon E., Schwob E. Metabolic and environmental conditions determine nuclear genomic instability in budding yeast lacking mitochondrial DNA // *G3*. (Bethesda). – 2014. – V. 4. – № 3. – P. 411-423.
108. Garcia E.J., Jonge J.J., Liao P., Stivison E., Sing, C.N., Higuchi-Sanabria R., Boldogh I.R., Pon L.A. Reciprocal interactions between mtDNA and lifespan control in budding yeast // *Mol. Biol. Cell.* – V. 30. – № 24. – P. 2943-2952.
109. Sherman F. Getting started with yeast // *Methods Enzymol.* – V. 350. – P. 3-41.
110. Knop M., Siegers K., Pereira G., Zachariae W., Winsor B., Nasmyth K., Schiebel E. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines // *Yeast*. – 1999. – V. 15. – № 10B. – P. 963-972.
111. Hentges P., Van Driessche B., Tafforeau L., Vandenhoute J., Carr A.M. Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe* // *Yeast*. – 2005. – V. 22. – № 13. – P. 1013-1009.
112. Gietz R.D., Schiestl R.H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method // *Nat. Protoc.* – 2007. – V. 2. – № 1. – P. 31-4.
113. Swaminathan A., Beilharz T.H. Epitope-tagged yeast strains reveal promoter driven changes to 3'-end formation and convergent antisense-transcription from common 3' UTRs // *Nucleic. Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 1. – P. 377-386.
114. Baleva M.V., Chicherin I., Piunova U., Zgoda V., Patrushev M.V., Levitskii S., Kamenski P. Pentatricopeptide Protein PTCD2 Regulates COIII Translation in Mitochondria of the HeLa Cell Line // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – № 22. – P. 14241.
115. Glick B.S., Pon L.A. Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae* // *Methods Enzymol.* – 1995. – V. 260. – P. 213-23.

116. Cox J., Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification // Nat. Biotechnol. – 2008. – V. 26. – № 12. – P. 1367-1372.
117. Cox J., Neuhauser N., Michalski A., Scheltema R.A., Olsen J.V., Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment // J. Proteome Res. – 2011. – V. 10. – № 4. – P. 1794-1805.
118. Rath S., Sharma R., et al. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations // Nucleic Acids Res. – 2021. – V. 49. – № D1. – P. D1541-D1547.
119. Kehrein K., Schilling R., Möller-Hergt B.V., Wurm C.A., Jakobs S., Lamkemeyer T., Langer T., Ott M. Organization of Mitochondrial Gene Expression in Two Distinct Ribosome-Containing Assemblies // Cell Rep. – 2015. – V. 10. – № 6. – P. 843-853.
120. Ghaemmaghami S., Huh W.K., Bower K., Howson R.W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E.K., Weissman J.S. Global analysis of protein expression in yeast // Nature. – 2003. – V. 425. – № 6959. – P. 737-741.
121. Szyrach G., Ott M., Bonnefoy N., Neupert W., Herrmann J.M. Ribosome binding to the Oxal complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria // EMBO J. – 2003. – V. 22. – № 24. – P. 6448-6457.
122. Pel H.J., Maat C., Rep M., Grivell L.A. The yeast nuclear gene MRF1 encodes a mitochondrial peptide chain release factor and cures several mitochondrial RNA splicing defects // Nucleic Acids Res. – 1992. – V. 20. – № 23. – P. 6339-46.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Использованные в работе штаммы *S. cerevisiae*

Наименование штамма	Генотип	Источник
DAU2	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁺]</i>	Получен ранее другими авторами [105]
DAU 1	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁺]</i>	Получен ранее другими авторами [105]
DAU 0	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰]</i>	Получен из DAU1 путём элиминации мтДНК EtBr
MRPL8-HA	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, MRPL8::(MRPL8-3HA-tADH1-HphMX6, [rho⁺])</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MRPL8-3HA+HphB</i>
MRP20-HA	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, MRP20::(MRP20-3HA-tADH1-HphMX6)</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MRP20-3HA+HphB</i>
PET111-HA	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, PET111::(PET111-3HA-tADH1-HphMX6)</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>PET111-3HA+HphB</i>
RSM10-HA	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, RSM10::(RSM10-3HA-tADH1-HphMX6)</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>RSM10-3HA+HphB</i>
MRPS17-HA	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, MRPS17::(MRPS17-3HA-tADH1-HphMX6)</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MRPS17-3HA+HphB</i>
KRA1	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::HphB</i>	Получен из DAU2 путём удаления <i>MRF1</i>
KRA 1-1	<i>MATa/MATa, MRF1::HphB, ade2, ura3Δ0, [rho⁰]</i>	Получен из KRA1 путём скрещивания со штаммом DAU0
KRA2	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::HphB, pRS416-MRF1</i>	Получен из KRA1 путём трансформации плазмидой <i>pRS416-MRF1</i>
KRA3	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::HphB, pRS416-hMTRF1A</i>	Получен из KRA1 путём трансформации плазмидой <i>pRS416-hMTRF1A</i>
KRA4	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::HphB, pRS416-hMTRF1</i>	Получен из KRA1 путём трансформации плазмидой <i>pRS416-hMTRF1</i>
KRA5	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::HphB, pRS416-hMRPL58</i>	Получен из KRA1 путём трансформации плазмидой <i>pRS416-MRPL58</i>

KRA6	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::HphB, pRS416-hMTRFR</i>	Получен из KRA1 путём трансформации плазмидой <i>pRS416-MTRFR</i>
KRA7	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho-], MRF1::MTRF1+KanMX6</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MTRF1+KanMX6</i>
KRA8	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho-], MRF1::MTRF1A+KanMX6</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MTRF1A+KanMX6</i>
KRA9	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::MTRFR+KanMX6</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>hMTRFR+KanMX6</i>
KRA10	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::MRPL58+KanMX6</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MRPL58+KanMX6</i>
KRA11	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho+], MRF1::MRF1+KanMX6</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MRF1+KanMX6</i>
KRA12	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1::HphB→MRF1+KanMX6</i>	Получен из KRA1 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MRF1+KanMX6</i>
KRA13	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho-], MRF1→MTRF1-3HA+HphB</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MTRF1-3HA+HphB</i>
KRA14	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho-], MRF1→MTRF1A-3HA+HphB</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MTRF1A-3HA+HphB</i>
KRA15	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1→MTRFR-3HA+HphB</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MTRFR-3HA+HphB</i>
KRA16	<i>MATa, ade2, ura3Δ0, [rho⁰], MRF1→MRPL58-3HA+HphB</i>	Получен из DAU2 путём трансформации линейной бицистронной ДНК <i>MRPL58-3HA+HphB</i>

Приложение 2. Использованные в работе олигонуклеотиды

Наименование	Нуклеотидная последовательность	Описание
MRPS17_F	aagaaagcacgtcatgatggatatgcacaaacca agccagTACCCATACGATGTTCC	Прямой праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRPS17</i>
MRPS17_R	gttgagaaaatatgacactcggtttccctttttta tTAATACGACTCACTATAAGGG	Обратный праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRPS17</i>
MRP20_F	taaactaattgccctgaacaggtaatagaagatct acatTACCCATACGATGTTCC	Прямой праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRP20</i>
MRP20_R	tttgcgtgtgggttaacgaagggtggaaatggaa accttTAATACGACTCACTATAAGG G	Обратный праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRP20</i>
PET111_F	gaaaatgaagctttgaagagaataaaaaggagg aggagTACCCATACGATGTTCC	Прямой праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>PET111</i>
PET111_R	atttacacgtgagagaaaggtaataactga aaagaTAATACGACTCACTATAAG GG	Обратный праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>PET111</i>
MRPL8_F	gacgaagaaaccctccctatgtcatggcccag acctTACCCATACGATGTTCC	Прямой праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRPL8</i>
MRPL8_R	tctatataattacaaggaaatacacaaaatcctggtt ttTAATACGACTCACTATAAGGG	Обратный праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена

		<i>MRPL8</i>
RSM10_F	attggatagccccgattttaaaaaacattggaaaa gaagTAACCATACGATGTTCC	Прямой праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>RSM10</i>
RSM10_R	tcccaagaaccagcgtaattataggattgccatcat cttTAATACGACTCACTATAAGGG	Обратный праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>RSM10</i>
MRPL6_F	taacgatgaaacaataaagctaaaggacaagaaa atcaaTAACCATACGATGTTCC	Прямой праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRPL6</i>
MRPL6_R	aattacgaaaatgagtacgaaaataactgaaatcct gaagTAATACGACTCACTATAAGG G	Обратный праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRPL6</i>
MRP1_F	gttacctcaacgtactaagatccaaggcattcaacac gttaTAACCATACGATGTTCC	Прямой праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRP1</i>
MRP1-R	acttatatcaaaggaaaaattcccattaccagtt catTAATACGACTCACTATAAGGG	Обратный праймер для амплификации кассеты 3xHA-stop-tADH1-HphMX6 с 40-нт гомологичными участками для С-концевого тегирования гена <i>MRP1</i>
MRPS17_C	CAGTTAGACATCTCTGGATTGG	Прямой праймер для ПЦР-валидации штамма MRPS17-HA
MRPS17_D	CTTCGATATCACTTGCCTG	Обратный праймер для ПЦР-валидации штамма MRPS17-HA
MRP20_C	TCCGGACGAAAACTCCTTC	Прямой праймер для ПЦР-валидации штамма MRP20-HA
MRP20_D	GAAGGGGATGCCATCATC	Обратный праймер для ПЦР-валидации штамма MRP20-HA
PET111_C	GGCTTGAGAATATGAGAA	Прямой праймер для ПЦР-валидации штамма PET111-HA
PET111_D	GCCAATCAAGTACTGCC	Обратный праймер для ПЦР-валидации штамма PET111-HA
MRPL8_C	CAAGCAGGTCTTACTCAAGG	Прямой праймер для ПЦР-валидации штамма MRPL8-HA

MRPL8_D	CTATCCTGACGCTATTCTCTCTTG	Обратный праймер для ПЦР-валидации штамма MRPL8-НА
RSM10_C	CAATGGCCTCGAAAAATCACTAAG	Прямой праймер для ПЦР-валидации штамма RSM10-НА
RSM10_D	GGCCGCAATATTAGTACAAAAATTG	Обратный праймер для ПЦР-валидации штамма RSM10-НА
MRPL6_C	GGACGTTCCCTGAAGGTATTG	Прямой праймер для ПЦР-валидации штамма MRPL6-НА
MRPL6_D	CAAGAACACGTCACCGC	Обратный праймер для ПЦР-валидации штамма MRPL6-НА
MRP1_C	GAGATGACTGCCAAGCAAG	Прямой праймер для ПЦР-валидации штамма MRP1-НА
MRP1_D	GGGCAGCAAATTACTGAGC	Обратный праймер для ПЦР-валидации штамма MRP1-НА
Hph_B	GATCGAAAAGTTCGACAGCGTC	Обратный праймер для ПЦР-скрининга клонов, устойчивых к гигромицину В
Hph_C	ACTCGCCGATAGTGGAAACCG	Прямой праймер для ПЦР-скрининга клонов, устойчивых к гигромицину В
COX1_F	CTTCATTCTTGAAGTATCAGGAGG	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена <i>COX1</i> у дрожжей
COX1_R	CTCTAAGATCTGCATCTAACCTAC	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена <i>COX1</i> у дрожжей
COX2_F	GTGGTGAAACTGTTGAATTGATCA	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена <i>COX2</i> у дрожжей
COX2_R	GCTCCATAGAAGACACCTTCTCTTG	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена <i>COX2</i> у дрожжей
ATP68_F	CTCATTGCATTATCAGCTATTAGTA	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена ATP8/ATP6 у дрожжей
ATP68_R	TAACCATTAAATAATGACCAAGCTAAGAT	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена ATP8/ATP6 у дрожжей
COB_F	GGTGGGTTCTCAGTATCTAACCTCTC	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена <i>COB</i> у дрожжей
COB_R	TCATTCAGGTACAATAGATGCTGGTG	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК

		гена <i>COB</i> у дрожжей
COX3_F	GCTGGTTATTCTGAGCTTATT TCCA	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена <i>COX3</i> у дрожжей
COX3_R	CACCATCAGAGATA GTGAATG CAGC	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена <i>COX3</i> у дрожжей
ATP9_F	GCAGCTAAATATATTGGAGCA GGTATC	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена ATP9 у дрожжей
ATP9_R	AATAAACCTGTAGCTTCTGATA AGGCG	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания мРНК гена ATP9 у дрожжей
15SRNA_F	GACTAATATTGTGCCAGCAGT CGC	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания 15S рРНК у дрожжей
15SRNA_R	TAGAACTACACGGGTATCGAA TCCG	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания 15S рРНК у дрожжей
21SRNA_F	AGGGAAGGAACTCGGCAAAGA	Прямой праймер для количественной ПЦР определения содержания 21S рРНК у дрожжей
21SRNA_R	GC GGGACCTCAATTATAGGCC	Обратный праймер для количественной ПЦР определения содержания 21S рРНК у дрожжей
d_mrf1_f	aagttcgtagagcagaacaatataattcattggcga agcTACCCATACGATGTTCC	Праймеры для удаление гена <i>MRF1</i>
d_mrf1_r	atacgatatgatatttacaagaaacgaaaagtacg ttcgTAATACGACTCACTATAAGG G	
pr_mrf1_f	aattGCGGCCGCAATTGTGTATT CTTCACTTATCAGTTAC	Праймеры для клонирования в pRS416 промотора гена <i>MRF1</i> с сайтами <i>NotI</i> и <i>BamHI</i>
pr_mrf1_r	aattGGATCCGCTTGACCAATG AAATATATTGTTTC	
tr_mrf1_f	aattAAGCTTCGAACGTAAC TTTT CGTTTCTTG	Праймеры для клонирования в pRS416 терминатор гена <i>MRF1</i> с сайтами <i>HidIII</i> и <i>KpnI</i>
tr_mrf1_r	aattGGTACCC TTGAGCAAAACA CGGTTCG	
mtrf1_pRS416_f	aattGGATCCATGAATCGTCACCT GTGTGTTTG	Праймеры для клонирования pRS416 кодирующую последовательность гена <i>MTRF1</i>
mtrf1_pRS416_r	aattAAGCTTTATTTGCTGATT TAAGGTGTTCATCC	
mtrf1a_prs416_f	aattGGATCCATGCGGTCCCCGGG	Праймеры для клонирования в

	TTC	pRS416 кодирующую последовательность гена <i>MTRF1A</i>
mtrf1a_prs416_r	aattAAGCTTTAAACTTTTGGG AAATAATTCTACTAAAG	
mtrfr_pRS416_f	aattGGATCCATGAGCACCGTGG GTTTATTTC	Праймеры для клонирования в pRS416 кодирующую последовательность гена <i>MTRFR</i>
mtrfr_pRS416_r	aattAAGCTTCAGTGGACCTTT TACTTGACTC	
mtict1_pRS416_f	aattGGATCCATGGCGGCCACCA G	Праймеры для клонирования в pRS416 кодирующую последовательность гена <i>MRPL58</i>
mtict1_pRS416_r	aattAAGCTTCAGTCCATGTCGA CCCTC	
mrf1_pRS416_f	aattGGATCCATGTGGCTTCAAA GTTCCAGTCC	Праймеры для клонирования в pRS416 кодирующую последовательность гена <i>MRF1</i>
mrf1_pRS416_r	aattAAGCTTCAGTTACTCTCCA ATAATTCTTTGCC	
mtrf1a_pJet_f	aagttcgtagagcagaacaatataatttcattggtgca agcATGCGGTCCC GG GTCTG	Праймеры для амплификации кодирующей последовательность гена <i>MTRF1A</i> по кДНК
mtrf1a_pJet_r	GCTAGCgtcaGGTACCTTAAACT TTTGGGAAATAATTCTACTA AAG	
mtrf1_pJet_f	aagttcgtagagcagaacaatataatttcattggtgca agcATGAATCGTCACCTGTGTGT TTGG	Праймеры для амплификации кодирующей последовательность гена <i>MTRF1</i> по кДНК
mtrf1_pJet_r	GCTAGCgtcaGGTACCTTATTGG CTGATTAAAGGTGTTCATCC	
ict1_pJet_f	aagttcgtagagcagaacaatataatttcattggtgca agcATGGCGGCCACCAGGTGC	Праймеры для амплификации кодирующей последовательность гена <i>MRPL58</i> по кДНК
ict1_pJet_r	GCTAGCgtcaGGTACCTCAGTCC ATGTCGACCCCTCC	
mtrfr_pJet_f	aagttcgtagagcagaacaatataatttcattggtgca agc ATGAGCACCGTGGGTTATTTC	Праймеры для амплификации кодирующей последовательность гена <i>MTRFR</i> по кДНК
mtrfr_pJet_r	GCTAGCgtcaGGTACCTCAGTGG ACCTTTTACTTGACTCC	
mrf1_pJet_f	aagttcgtagagcagaacaatataatttcattggtgca agcATGTGGCTTCAAAGTTCCA GTTCC	Праймеры для амплификации кодирующей последовательность гена <i>MRF1</i> по ген-ДНК
mrf1_pJet_r	GCTAGCgtcaGGTACCTCAGTTA CTCTCCAATAATTCTTTGCC	
kanmx6-pJet f	gatcGGTACCCGTACGCTGCAGG TCGACGG	Праймер для кассеты KanR с сайтом <i>KpnI</i>
kanmx6-pJet r	gatcGCTAGCatacgatatgatattacaagaa acgaaaagttaacgttgc ATCGATGAATT CGAGCTCG	Праймер для кассеты KanR с сайтом <i>NheI</i>
kanMX6_end_r	atacgatatgatattacaagaaacgaaaagttag ttcgATCGATGAATT CGAGCTCG	Обратный праймер для амплификации кассеты RF+KanR
mrf1_a	CTCGTTGTGCCATCTGTAC	Праймеры для ПЦР скрининга
mrf1_b	CACGTAAAATGAATGCCGC	
mrf1_c	GAGCGAGACTTGCAGAGAAGG	
mrf1_d	GACATCTTGAGCAAAACACGG	

mtrf1a-b	CTCGTTCAGCAGTTGATCACC	
mtrf1-b	GCTTCCAGAGCATCTGGTGTC	
mrpl58-b	GAGGGATGTCACTGTCGGC	
mtrfr-b	GTTGCTGGTTGTTGGTTGC	
kanR_b	CAACGCGTCTGTGAGGGGAGC GTTTCCC	
kanR_c	GGTATTGATAATCCTGATATG	
Hph_b	GGATCGGATTCCCTAGAATC	
Hph_c	AATTGGGAGAGTTAATTCCCA ATGAG	
mtrf1a_tagHA_f	cgattatgaatcttttagtagaaattttcccaaaaag ttTACCCATACGATGTTCC	Праймеры для получения кассеты-теггированя эпипом ЗНА С-концов рекомбинантных факторов
mtrf1_tagHA_f	cattgctgaactttggatgaacaccccaaattcagca aaaTACCCATACGATGTTCC	
ict1_tagHA_f	tcattctgtgtaaagacaaggcaggagggtcgaca tggacTACCCATACGATGTTCC	
mtrfr_tagHA_f	gctacttaaagaactgtgggagtcaagtaaaaagg tccacTACCCATACGATGTTCC	
uni_tagHA_r	atacgatatgtatattacaagaaacgaaaagttacg ttcgTAATACGACTCACTATAGG G	
15s_f	GACTAATATTGTGCCAGCAGT CGC	Праймеры на участок мтДНК для РТ-ПЦР
15s_r	TAGAACTACACGGGTATCGAA TCCG	
ifm1_f	GTAGTGTCTGTCGATAACG	Праймеры на геномную ДНК для РТ-ПЦР
ifm1_r	GGTGCAGGTAGTTAGAGG	
act1_f	CTATGTTACGTCGCCCTTGGACT TCG	Праймеры для ОТ РТ-ПЦР мРНК актина-бета
act1_r	CTGGAGGAGCAATGATCTTGA CC	
mtrf1a_mRNA_f	CAAAC TGCTGAA CGAGAAGGA GC	Праймеры для ОТ РТ-ПЦР мРНК с гена <i>MTRF1A</i>
mtrf1a_mRNA_r	GCTGGCAGATGCATGTCTAAG GC	
ict1_mRNA_f	GCTGCACAAGCAGAAAGACGG C	Праймеры для ОТ РТ-ПЦР мРНК с гена <i>MRPL58</i>
ict1_mRNA_r	GCGGCTGCTCTCAGAGGTGAG G	
mtrfr_mRNA_f	CCTACACCACTGACCCGAATAT GC	Праймеры для ОТ РТ-ПЦР мРНК с гена <i>MTRFR</i>
mtrfr_mRNA_r	CTCTTGTAGGATTTCCGAGCT AGC	
mtrf1-mRNA f	GGTTACCTCCAGTGTACATCC AGC	Праймеры для ОТ РТ-ПЦР мРНК с гена <i>MTRF1</i>
mtrf1-mRNA r	GGTAAATGGCTGCAAGAGGTG CC	
mrf1-mRNA f	CCCCTCGAGGTCCATCTTAAG GG	Праймеры для ОТ РТ-ПЦР мРНК с гена <i>MRF1</i>

Приложение 3. Использованные в работе плазмидные конструкции

Наименование	Описание	Источник
pFA6-HphMX6	Вектор, содержащий кассету устойчивости к гигромицину Б	[111]
pFA6a-KanMX6	Вектор, содержащий кассету устойчивости к G418	https://www.addgene.org/39296/
pRS416	Дрожжевой центрометрный шаттлевектор с селективным маркером URA3	ATCC-87521
pRS416_pro	PRS416 с промотором гена <i>MRF1</i>	Получен из pRS416 после вставки промотора гена <i>MRF1</i> по сайтам <i>NotI</i> и <i>BamHI</i>
pRS416_pro_ter	PRS416 с промотором и терминатором транскрипции гена <i>MRF1</i>	Получен из pRS416_pro после вставки терминатора транскрипции гена <i>MRF1</i> по сайтам <i>HindIII</i> и <i>KpnI</i>
pRS416_pro_ter_yMRF1	pRS416_pro_ter с кодирующей последовательностью <i>MRF1</i>	Получен из pRS416_pro_ter после вставки кодирующей последовательности <i>MRF1</i> по сайтам <i>BamHI</i> и <i>HindIII</i>
pRS416_pro_ter_hMTRF1A	pRS416_pro_ter с кодирующей последовательностью <i>MTRF1A</i>	Получен из pRS416_pro_ter после вставки кодирующей последовательности <i>MTRF1A</i> по сайтам <i>BamHI</i> и <i>HindIII</i>
pRS416_pro_ter_hMTRF1	pRS416_pro_ter с кодирующей последовательностью <i>MTRF1</i>	Получен из pRS416_pro_ter после вставки кодирующей последовательности <i>MTRF1</i> по сайтам <i>BamHI</i> и <i>HindIII</i>
pRS416_pro_ter_hMTRFR	pRS416_pro_ter с кодирующей последовательностью <i>MTRFR</i>	Получен из pRS416_pro_ter после вставки кодирующей последовательности <i>MTRFR</i> по сайтам <i>BamHI</i> и <i>HindIII</i>
pRS416_pro_ter_hMRPL58	pRS416_pro_ter с кодирующей последовательностью <i>MRPL58</i>	Получен из pRS416_pro_ter после вставки кодирующей последовательности <i>MRPL58</i> по сайтам <i>BamHI</i> и <i>HindIII</i>

pJet1.2/blunt	Вектор для клонирования продуктов ПЦР по тупым концам	Набор реактивов CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США)
pJet1.2_hMTRF1A	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MTRF1A</i>	Получен путём лигирования ПЦР-продукта <i>MTRF1A</i> в pJet1.2/blunt по тупым концам
pJet1.2_hMTRF1	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MTRF1</i>	Получен путём лигирования ПЦР-продукта <i>MTRF1</i> в pJet1.2/blunt по тупым концам
pJet1.2_hMTRFR	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MTRFR</i>	Получен путём лигирования ПЦР-продукта <i>MTRFR</i> в pJet1.2/blunt по тупым концам
pJet1.2_hMRPL58	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MRPL58</i>	Получен путём лигирования ПЦР-продукта <i>MRPL58</i> в pJet1.2/blunt по тупым концам
pJet1.2_MTRF1A_TE_F_KanMX6	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MTRF1A</i> , терминатор транскрипции TEF и селективный маркер KanMX6	Получен из вектора pJet1.2_MTRF1A путём вставки фрагмента TEF_KanMX6 по сайтам <i>NheI</i> и <i>KpnI</i>
pJet1.2_hMTRF1_TEF_KanMX6	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MTRF1</i> , терминатор транскрипции TEF и селективный маркер KanMX6	Получен из вектора pJet1.2_hMTRF1 путём вставки фрагмента TEF_KanMX6 по сайтам <i>NheI</i> и <i>KpnI</i>
pJet1.2_hMTRFR_TEF_KanMX6	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MTRFR</i> , терминатор транскрипции TEF и селективный маркер KanMX6	Получен из вектора pJet1.2_MTRFR путём вставки фрагмента TEF_KanMX6 по сайтам <i>NheI</i> и <i>KpnI</i>
pJet1.2_MRPL58_TEF_KanMX6	Вектор pJet1.2, содержащий кодирующую последовательность <i>MRPL58</i> , терминатор транскрипции TEF и селективный маркер KanMX6	Получен из вектора pJet1.2_MRPL58 путём вставки фрагмента TEF_KanMX6 по сайтам <i>NheI</i> и <i>KpnI</i>

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь, выражаю благодарность своему научному руководителю, Петру Андреевичу Каменскому, за помощь в постановке задач и подборе материалов для исследования, за всестороннюю поддержку, а также за возможность работать на кафедре молекулярной биологии биологического факультета МГУ.

Особую благодарность хочу выразить своему однокурснику и коллеге, Чичерину Ивану Владимировичу, за наставничество и помощь в постановке и проведении экспериментов.

Отдельную признательность выражаю коллективу группы молекулярной биологии митохондрий кафедре молекулярной биологии биологического факультета МГУ за поддержку и дружескую атмосферу.

Хочу отдельно поблагодарить Кнорре Дмитрия Алексеевича, Кушнирова Виталия Владимира и Замятнина Андрея Александровича за согласие выступить в роли официальных оппонентов данной диссертации.

Также выражаю благодарность Московскому государственному университету имени М.В.Ломоносова за возможность пройти обучение в аспирантуре и АО «Центр международных программ» (Казахстан) за предоставленную мне стипендию «Болашак», давшую мне возможность проходит обучение в аспирантуре МГУ.