

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Лаптев Иван Георгиевич

Новые метилтрансферазы митохондриальной рРНК

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва
2020

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель – Сергиев Пётр Владимирович
доктор химических наук, профессор РАН

Официальные оппоненты – Белогуров Алексей Анатольевич, доктор химических наук, профессор кафедры фармацевтической технологии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, главный научный сотрудник, заведующий Лабораторией белков гормональной регуляции, заместитель руководителя Центра национальной технологической инициативы ИБХ РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Карпова Галина Георгиевна, доктор химических наук, профессор, заведующая Лабораторией структуры и функции рибосом, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Зиновкин Роман Алексеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, отдел математических методов в биологии, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «26» января 2021 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/336051286/>.

Автореферат разослан «__» декабря 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.х.н., доцент



И.Г. Смирнова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рибосома, осуществляющая синтез белков, является одной из важнейших молекулярных машин. Её правильное функционирование и сборка жизненно необходимы для всех живых клеток. Обычно рРНК подвергается постраскрипционным модификациям, необходимым для правильного сворачивания её структуры. Для бактериальных рибосом известно более 30 модифицированных нуклеотидов, для эукариотических (цитоплазматических) – более 200. В митохондриальных же рибосомах млекопитающих подвергаются модификации всего 9-10 нуклеотидов, что по сравнению с другими рибосомами очень мало. Учитывая возможное происхождение митохондрий от бактериального предшественника, считается, что в миторибосомах в процессе эволюции остались только самые важные для функционирования рибосомы модификации.

В 16S рибосомной РНК *E. coli* присутствует уникальный модифицированный нуклеотид m^4C , за образование которого отвечают ферменты RsmH и RsmI, модифицирующие экзоциклическую аминогруппу и 2'-гидроксил, соответственно. В цитоплазматических рибосомных РНК млекопитающих эквивалентный нуклеотид 2'-O метилирован, но модификация аминогруппы отсутствует. 12S рРНК митохондрий, напротив, содержит модифицированный нуклеотид m^4C в позиции, эквивалентной таковой в *E. coli*. Митохондриальный белок млекопитающих METTL15 является гомологом белка RsmH *E. coli* и, как мы предположили, проводит модификацию митохондриальной рРНК.

Опираясь на известные данные о метилтрансферазах *E. coli* и *S. cerevisiae* и следуя аналогичным рассуждениям, мы также обнаружили вероятного кандидата на роль m^5U метилтрансферазы 12S мт-рРНК млекопитающих - белок TRMT2B. TRMT2B является гомологом белка Trm2 *S. cerevisiae*, который приводит к образованию m^5U54 тРНК поэтому TRMT2B также является кандидатом на роль m^5U54 метилтрансферазы мито-тРНК.

Степень разработанности темы

Почти для всех модификаций нуклеотидных остатков мт-рРНК млекопитающих найдены белки, ответственные за их наличие и практически для всех из них показано, что они важны для правильной сборки рибосомы, а их отсутствие приводит к проблемам с митохондриальной трансляцией. Исключение составляют m^5U429 и m^4C839 12S мито-рРНК, для которых формирующие их ферменты не были известны до 2019 г.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы стало изучение функций m^4C и m^5U метилирования мт-рРНК митохондрий млекопитающих.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- получить клеточные линии с инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b* с помощью системы CRISPR/Cas9;
- проверить наличие m^4C и m^5U метилирования в 12S мт-рРНК (и мт-тРНК для m^5U) в нокаутных линиях;

- если наши гипотезы окажутся верными, выяснить, к каким последствиям для клетки приводит отсутствие данных метилтрансфераз (влияние на количество рРНК, количество мт-ДНК, эффективность трансляции, активность комплексов дыхательной цепи, влияние на сборку миторибосомы).

Объект исследования

Метилирование РНК и его влияние на жизненные процессы клетки.

Предмет исследования

Функция m^4C и m^5U метилирования митохондриальной 12S рРНК мышцы.

Научная новизна исследования

Впервые для клеток мышцы была показана роль белков METTL15 и TRMT2B в модификации митохондриальной 12S рРНК; данная работа завершает полный список ферментов, ответственных за метилирование митохондриальных рРНК млекопитающих. Впервые созданы клеточные линии с инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b* и показано, к каким последствиям для клетки это приводит. Для мышечных мт-рРНК определены признаки, при наличии которых U54 в них метилируется белком TRMT2B.

Теоретическая значимость исследования

В представленной работе мы показали, что белок METTL15 ответственен за m^5U метилирование митохондриальной 12S рРНК, а TRMT2B – за m^4U метилирование митохондриальных 12S рРНК и некоторых тРНК. Также было продемонстрировано, что отсутствие TRMT2B немного снижает активность дыхательных комплексов, субъединицы которых закодированы в митохондриальном геноме, а METTL15 метилирует рРНК на поздней стадии сборки малой субчастицы миторибосомы и необходим для своевременной диссоциации белка RBFA и полноценного метилирования 12S рРНК белком NSUN4.

Практическая значимость исследования

Результаты данной работы помогают понять функциональную роль метилирования 12S рРНК митохондрий млекопитающих.

Методология диссертационного исследования

В данной работе использовались современные методы исследований, такие как инактивация генов с помощью CRISPR-Cas9, анализ РНК и белков с помощью масс-спектрометрии. Для анализа функции изучаемых белков было создано несколько клеточных линий: линии с инактивированными генами, линии с регулируемой экспрессией генов изучаемых белков, а также генов белков с довесками для иммунопреципитации. Для экзогенной экспрессии применялась система транспозонов Sleeping Beauty. Активность комплексов измерялась с помощью прибора Oxytherm (Hansatech instruments). Белковый состав фракций после разделения субчастиц рибосомы в градиенте сахарозы анализировали с помощью масс-спектрометрии.

Основные положения, выносимые на защиту

- Белки METTL15 и TRMT2B метилируют митохондриальную 12S рРНК

- TRMT2B метилирует мт-тРНК, последовательность Т-петли которых начинается с UU, за исключением мт-тРНК^{Ser} (AGC)
- Отсутствие TRMT2B снижает активность дыхательных комплексов, субъединицы которых закодированы в митохондриях
- METTL15 метилирует 12S рРНК на поздней стадии сборки 28S субчастицы

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании и с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на следующих научных мероприятиях и конференциях:

- Ribosomes and Translation, Россия, Петергоф, 13.05.2018–16.05.2019;
- Ribosome 2019, México, Mérida, 06.01.2019–10.01.2019.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 4 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключался в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении экспериментальных процедур, анализе и оформлении полученных результатов, в представлении результатов на научных мероприятиях.

Структура и объём диссертации

Текст диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, приложений, списка литературы, который включает 144 источника. Объём диссертации 110 страниц, материал иллюстрирован 30 рисунками и 20 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Постановка задачи

Митохондрии являются одной из отличительных черт эукариотической клетки. Одной из их основных функций является производство АТФ в ходе окислительного фосфорилирования. Митохондрии содержат свой геном, который кодирует 13 белков, 22 тРНК и 2 рРНК. Десять нуклеотидов рибосомных РНК митохондрий модифицируются посттранскрипционно. На момент начала данного исследования для двух модификаций – m^5U429 и m^4C839 (нумерация по человеческой 12S рРНК) – не были известны ферменты, ответственные за их метилирование.

Нуклеотид C1402 в 16S рРНК *E. coli* является эквивалентным C839 в 12S рРНК человека, при этом он тоже метилируется, но не только по гетероциклическому основанию, но и по рибозе, до m^4Cm . За метилирование по основанию отвечает белок RsmH, гомологом которого в млекопитающих является METTL15. Судя по опубликованным данным, METTL15 скорее всего локализуется в митохондриях, из чего мы сделали предположение, что именно этот белок ответственен за метилирование C839 в 12S рРНК млекопитающих.

Эквивалентный m^5U429 в 12S рРНК нуклеотид в 16S рРНК *E. coli* не модифицирован. Но U429 в 12S рРНК находится в петле, которая структурно напоминает Т-петлю тРНК (рис. 1). При сопоставлении структур этих петель, m^5U429 эквивалентен m^5U54 в тРНК, одному из самых консервативных остатков. Исходя из этого, мы сделали вывод о том, что может существовать белок, обладающий двойной специфичностью и метилирующий рРНК и тРНК митохондрий, тем более, что уже есть подобный пример – белок TRMT61B, отвечающий за образование m^1A947 16S рРНК и m^1A58 тРНК.

В бактериях и дрожжах известны белки, ответственные за модифицирование U54 в тРНК – TrmA и Trm2 соответственно, – причём последний метилирует и цитоплазматические, и митохондриальные тРНК. В млекопитающих же есть два гомолога Trm2 – TRMT2A и TRMT2B. Последний из них скорее всего является митохондриальным белком, так что мы

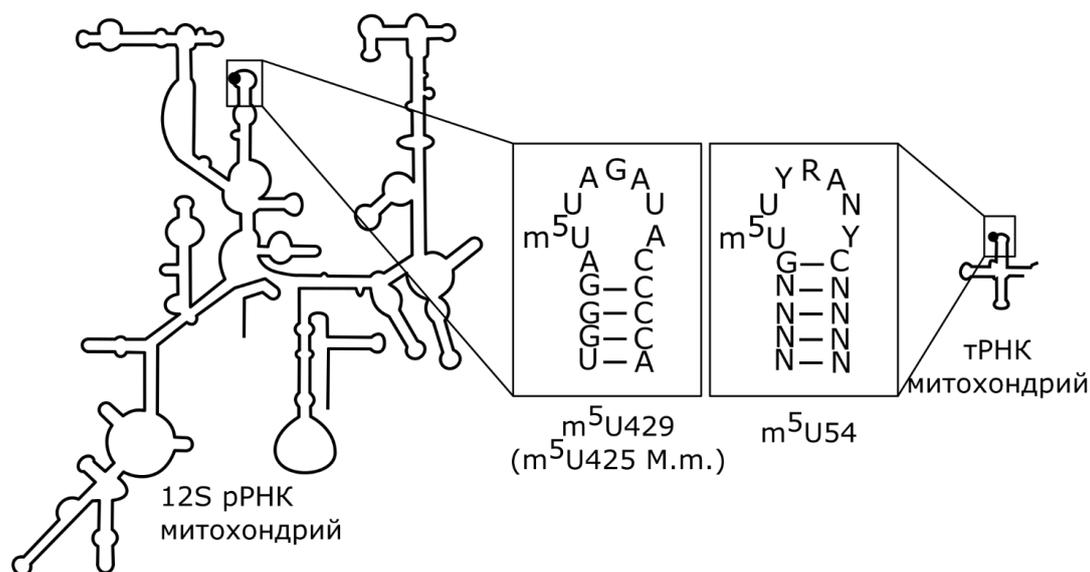


Рисунок 1. Схематическое изображение 12S рРНК митохондрий (слева) и мт-тРНК (справа). Выделена петля, содержащая m^5U429 и m^5U54 соответственно.

предположили, что TRMT2B ответственен за метилирование 12S рРНК и тРНК митохондрий, а TRMT2A – за метилирование цитоплазматических тРНК. Второе наше предположение в последствии было подтверждено другой научной группой.

Модельным организмом мы решили выбрать клеточные линии мыши, а не человека, т.к. при дальнейшем развитии данного исследования планируется создать линию мышей с инактивированными исследуемыми генами и посмотреть, к каким последствиям для организма это может привести. Для такого эксперимента предварительные результаты было бы надёжнее получить на клеточной линии того же вида.

Создание клеточных линий с инактивированными генами TRMT2B и METTL15

В нашей лаборатории было доступно несколько клеточных линий мыши. Чтобы убедиться, что исследуемые гены экспрессируются в них, мы сравнили уровень экспрессии *Mettl15* и *Trmt2b* с помощью количественного ПЦР с обратной транскрипцией (рис. 2А). Оказалось, что наибольший уровень экспрессии данных генов в клеточной линии NS0 (клетки миеломы), и все дальнейшие эксперименты мы ставили на этих клетках и их производных. Дополнительным достоинством этой клеточной линии является то, что она суспензионная, что упрощало нам задачу получения большого объёма клеточной массы, необходимой в дальнейших экспериментах.

Для создания клеточных линий с инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b* на основе NS0 мы использовали систему редактирования генома CRISPR-Cas9. Для доставки Cas9 в клетки мы использовали плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP. Она создана для экспрессии в эукариотических клетках генов самой нуклеазы Cas9 и основной части гидовой РНК, к которой методом генетической инженерии необходимо добавить часть, комплементарную целевому месту в геноме. С помощью сервиса Benchling CRISPR Designing Tool мы подобрали последовательности гидовых РНК, благодаря которым двуцепочечный разрез вносился бы в первый кодирующий экзон *Mettl15* и *Trmt2b* (рис. 2Б, В). После трансфекции клеток плазмидой, несущей гены Cas9 и гРНК, клетки были рассеяны до моноклонов, и с помощью секвенирования участка генома, где происходил двуцепочечный разрыв, были отобраны клетки, содержащие сдвиг открытой рамки считывания данных генов. Нам удалось найти по два моноклона с инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b*. Последовательности генов в месте разреза и белков, полученных в результате, показаны на рис. 2Г-Ж. Чтобы быть уверенными что эффекты, которые мы увидим при инактивации генов, не обусловлены неспецифической гибридизацией гРНК в других местах генома и соответственно, мутациями нецелевых участков, в полученных моноклонах мы проверили 5 наиболее вероятных таких мест, судя по Benchling CRISPR Designing Tool, с помощью секвенирования и не нашли отличий от клеток дикого типа.

TRMT2B и METTL15 метилируют 12S рРНК

Для проверки нашей гипотезы мы усовершенствовали подход, разработанный в нашей лаборатории ранее (рис. 3). Из клеток NS0 дикого типа, $\Delta Mettl15$ и $\Delta Trmt2b$ мы выделили суммарную РНК и гибридизовали с ней ~40-звенные биотинилированные на 5'-конце ДНК-олигонуклеотиды, комплементарные участкам митохондриальной рРНК с исследуемыми модифицированными нуклеотидами. Полученную смесь мы обработали РНКазой T1, чтобы целым остался только участок РНК, защищённый ДНК-олигонуклеотидом и необходимый для анализа. Этот фрагмент РНК выделяли с помощью аффинной хроматографии полученного РНК-ДНК дуплекса на иммобилизованном стрептавидине. Полученные в конечном итоге фрагменты РНК разделяли на денатурирующем полиакриламидном геле и вырезали фрагменты нужной длины. Для масс-спектрометрического анализа мы использовали гидролизат, полученный после обработки вырезанных кусочков геля с гуанилат-специфической РНКазой T1. Масс-спектры полученных фрагментов представлены на рис. 4. Из них видно, что оба наши предположения касательно гипотетических метилтрансфераз METTL15 и TRMT2B были верными и их мишенью является 12S рРНК митохондрий.

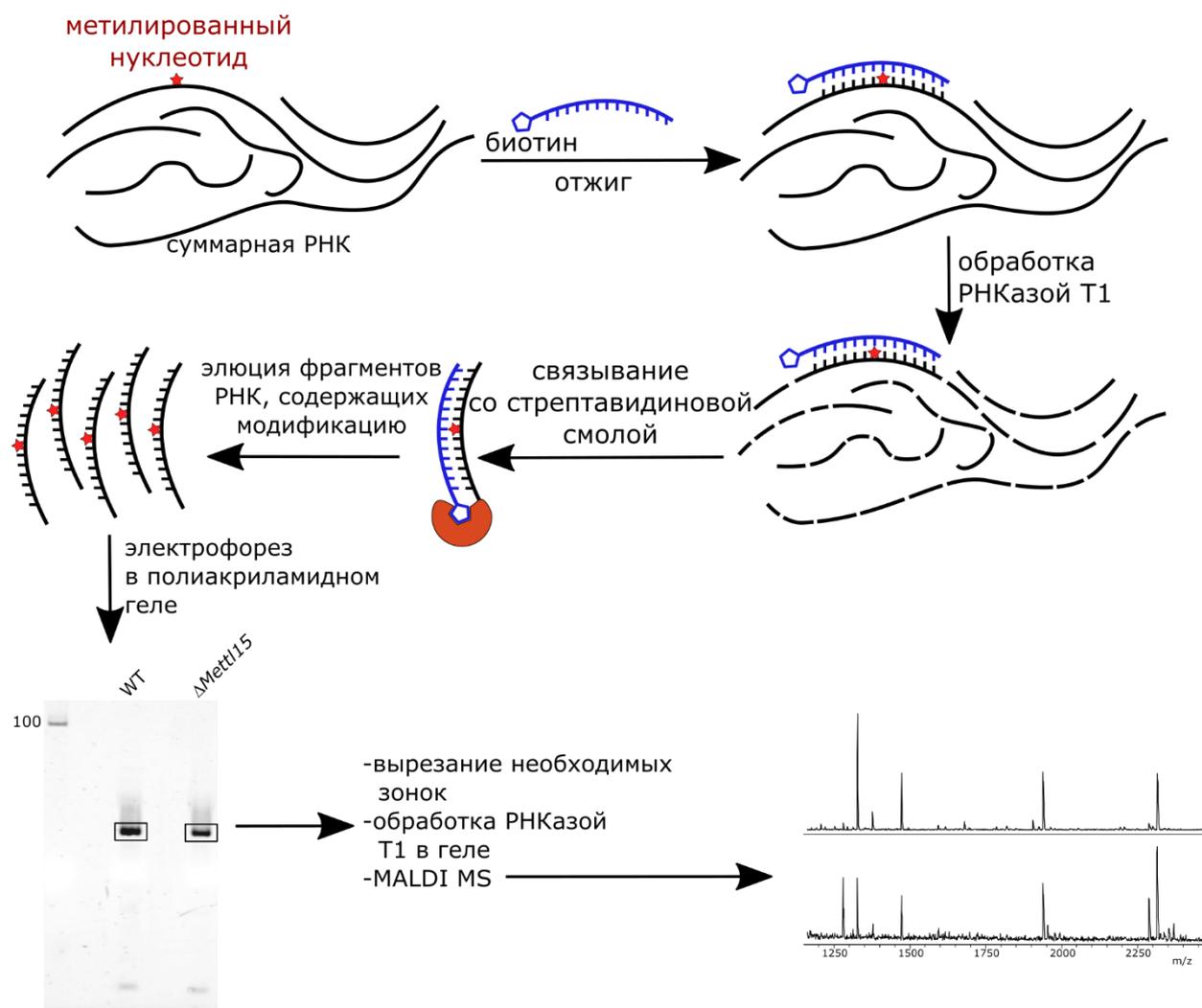


Рисунок 3. Схема эксперимента по выделению фрагментов 12S рРНК для анализа с помощью масс-спектрометрии.

При сравнении масс-спектров РНК из клеток дикого типа и $\Delta Trmt2b$ (рис. 4А) мы видим отличие масс одного из фрагментов РНК на 14 Да: 1648 Да и 1634 Да соответственно, что говорит об отсутствии метилирования данного фрагмента РНК в клетках $\Delta Trmt2b$. С клетками $\Delta Mettl15$ ситуация более интересная. На масс-спектре РНК из клеток дикого типа (рис. 4Б) пик в 1307 Да соответствует фрагменту РНК с двумя метильными группами – m^4C840 и m^5C842 . На масс-спектре из клеток $\Delta Mettl15$ мы видим пик в 1293 Да, соответствующий такому же фрагменту РНК, но без одной метильной группы (разница масс – 14 Да). В данном спектре присутствует ещё один пик – 1279 Да, что означает отсутствие двух метильных групп в данном фрагменте РНК. Второй метилированный нуклеотид на этом участке РНК появляется в результате активности белка NSUN4, что может говорить о влиянии METTL15 или m^4C840 на метилирующую активность NSUN4. Такое же снижение метилирования эквивалентного нуклеотида в митохондриях человека наблюдается и у других научных групп, которые занимались исследованием METTL15.

Чтобы быть уверенными, что отсутствие метилирования обусловлено именно инактивацией целевых генов, а не случайными изменениями генома, которые мы не смогли детектировать, или косвенным воздействием получившихся делеций в геноме использованных клеточных линий, мы решили комплементировать отсутствие исследуемых белков в клеточных линиях $\Delta Trmt2b$ и $\Delta Mettl15$ и проверить, будет ли восстанавливаться метилирование. Мы сделали суперэкспрессию данных белков в соответствующих клеточных линиях с помощью системы транспозонов Sleeping beauty. При таком способе клетки трансфецируются двумя плазмидами: одна с целевым геном для суперэкспрессии, а вторая – с геном транспозазы. Такой метод удобнее и быстрее, чем лентивирусная трансдукция, т.к. нет шага наработки вирусов. Используемые участки ITR (internal terminal repeats), между которыми закодирован целевой ген, короткие, так что встраивание происходит неспецифично. В нашем случае мы использовали систему с регулируемым промотором, чтобы индуцировать экспрессию целевых генов в нужный момент. Комплементация *Mettl15* и *Trmt2b* описанным способом в соответствующих клеточных линиях привела к частичному восстановлению метилирования 12S рРНК (рис. 4). Частичное метилирование может быть объяснено неоптимальной активностью белков после экспрессии с искусственно созданной конструкции и различным уровнем экспрессии в различных клетках.

Иногда присутствие каталитически неактивного белка может привести к более яркому фенотипу, чем его отсутствие, так что мы решили также создать линию с суперэкспрессией неактивного мутанта *Mettl15*. В структуре RsmH – гомолога METTL15 из *E. coli* – боковая карбоксильная группа консервативного остатка D101 сближена с положительно заряженными атомами азота и серы в S-аденозилметионине. Поэтому мы предположили, что замена эквивалентного остатка в METTL15 на положительно заряженный аргинин (замена D169R) скорее всего приведёт к неспособности связывать SAM и в итоге к неактивному белку. Мы суперэкспрессировали *Mettl15* с такой мутацией в нокаутной линии клеток. Проверку того, что данный вариант белка не способен метилировать C840 в 12S рРНК, мы провели с помощью масс-спектрометрии (рис. 4Б, нижняя панель). Из анализа полученной линии следует, что данный белок не является активным, т.к. метилирование C840 не восстанавливается.

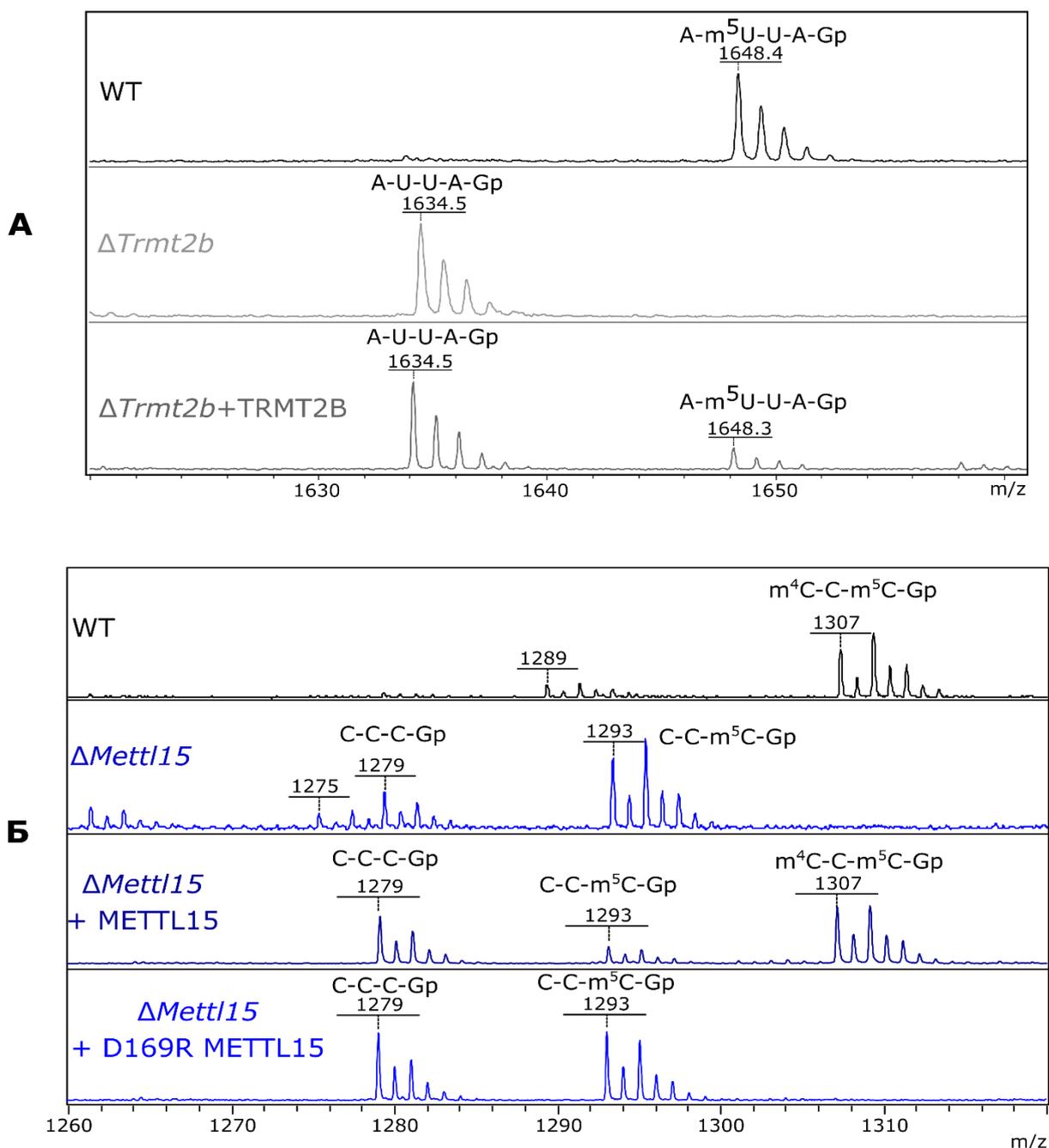


Рисунок 4. Масс-спектры фрагментов 12S рРНК, содержащих исследуемые модификации. А. Масс-спектр фрагмента 12S рРНК, содержащий U425. Верхняя панель – РНК из клеток дикого типа, средняя панель – РНК из клеток с инактивированным геном *Trmt2b*, нижняя – РНК из клеток с комплементацией TRMT2B. Б. Масс-спектр фрагмента 12S рРНК, содержащий C840. Верхняя панель – РНК из клеток дикого типа, средняя панель – РНК из клеток с инактивированным геном *Mettl15*, нижняя – РНК из клеток с комплементацией METTL15.

TRMT2B метилирует некоторые митохондриальные тРНК

Из-за структурного сходства TRMT2B и тРНК-специфичных метилтрансфераз семейства TrmA/Trm2, а также сходства Т-петли тРНК и участка 12S рРНК, содержащего нуклеотид m⁵U425 (рис. 1) мы предположили, что мишенями TRMT2B также могут быть митохондриальные тРНК. Чтобы проверить данную гипотезу, мы выделили тРНК^{Leu} из клеток

дикого типа, $\Delta Trmt2b$ и клеточной линии с комплементацией белка, и проанализировали их масс-спектрометрически. Методика отличалась от описанной выше для участков 12S рРНК лишь отсутствием одного шага – обработки РНКазой T1 после гибридизации олигонуклеотида на целевой РНК, т.к. тРНК являются достаточно короткими и анализ их гидролизатов не затрудняется большим количеством пиков на масс-спектрах. Результаты данной проверки представлены на рис. 5. Мы увидели, что метилирование нуклеотида U54 в клетках дикого типа (пик 1953 Да) пропадает при инактивации гена (пик 1939 Да) и частично восстанавливается при комплементации белка.

Мы также решили проверить пропадает ли метилирование U54 у других митохондриальных тРНК при инактивации гена *Trmt2b*. Первичная структура Т-петли митохондриальных тРНК менее консервативна по сравнению с цитоплазматическими или бактериальными. Только 4 из них имеют «каноничную» последовательность UUC на 5'-конце Т-петли – тРНК^{Ile}, тРНК^{Leu(UUA)}, тРНК^{Gln} и тРНК^{Ser(UCA)}, – в то время как остальные тРНК отличаются от данной последовательности вплоть до отсутствия U54. Суммарно мы

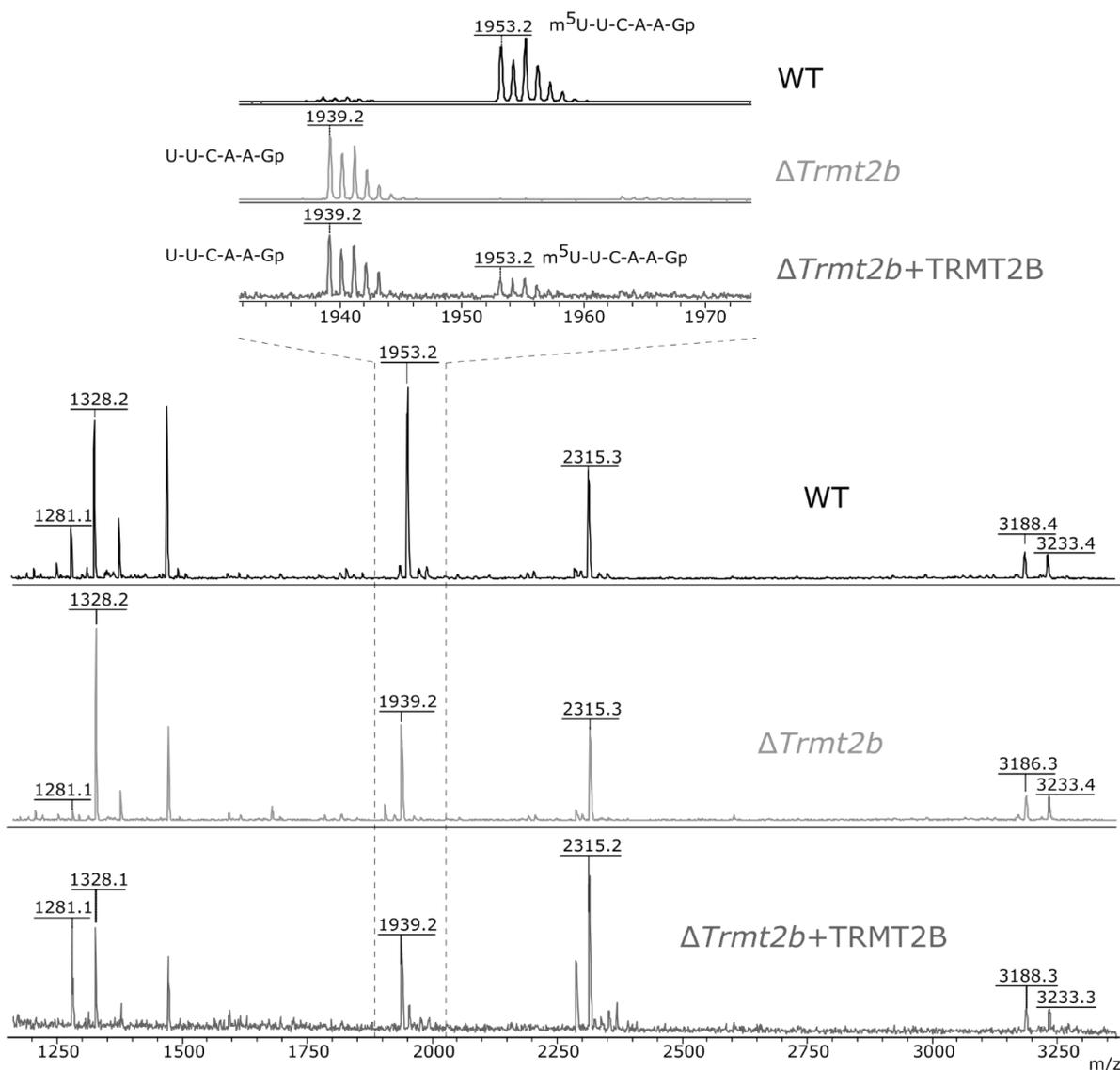


Рисунок 5. Масс-спектр митохондриальной тРНК^{Ile}. Пунктиром выделена пик, содержащий U54, сверху – увеличение данной области спектра.

Таблица 1. Список митохондриальных тРНК и их метилирование белком TRMT2B.

	Аминокислота тРНК	Т-петля	m ⁵ U54 метилирование TRMT2B
Т-петля начинается с UUC	Ile	UUCAAGC	+
	Gln	UUCAAUU	+
	Leu (UUA)	UUCAAAU	+
	Ser (UCA)	UUCGAUU	частичное
Т-петля начинается с UU, но третий нуклеотид - не С	Tyr	UUUAAAU	+
	Asn	UUUAAUU	+
	Met	UUUAAAU	+
	Ser (AGC)	UUUAAAAA	-
	Glu	UUGAAUG	не анализировали
Т-петля начинается с U, но следующий нуклеотид - не U	Thr	UCUUC	-
	Asp	UCAAUAA	-
	Arg	UGAUGU	не анализировали
	Leu (CUA)	UGCAAU	
Т-петля не начинается с U	Gly	AUAAAC	-
	Ala, Cys, His, Lys, Phe, Pro, Trp, Val		не анализировали

проверили 10 из 12 митохондриальных тРНК, содержащих U54 (табл. 1), т.к. остальные 2 тРНК проверить использованным методом не предоставляется возможным: имеющиеся в нашем доступе РНКазы гидролизуют их на слишком короткие фрагменты, которые невозможно детектировать с помощью MALDI-MS (в диапазоне m/z меньше 1000 Да производные матрицы создают большое загрязнение спектров). Также в качестве проверки, не метилирует ли TRMT2B другие нуклеотиды Т-петли мы проанализировали митохондриальную тРНК^{Gly}, не содержащую U54, и цитоплазматическую тРНК. Из полученных данных видно, что почти все тРНК, Т-петля которых начинается на UU, являются мишенями TRMT2B, а остальные тРНК (Т-петля которых начинается на UC или не содержит U54) – нет. Исключение составляют сериновые тРНК: для тРНК^{Ser(UCA)} наблюдалось лишь частичное метилирование, а для тРНК^{Ser(AGC)} метилирования не наблюдалось вовсе. Остальные проверенные нами тРНК не модифицируются TRMT2B.

Отсутствие TRMT2B влияет на активность комплексов цепи переноса электронов I, III и IV

Мы проанализировали влияние инактивации изучаемых нами генов на митохондрии разными способами.

При инактивации некоторых метилтрансфераз мт-тРНК происходит, по-видимому, компенсаторное повышение уровня транскрипции в митохондриях, что приводит к увеличению количества тРНК в них. Чтобы узнать, происходит ли это в нашем случае, мы сравнили количество митохондриальной тРНК в клетках дикого типа и в клеточных линиях с

инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b* с помощью количественного ПЦР с обратной транскрипцией. Результаты представлены на рис. 6А. Из них видно, что при отсутствии изучаемых нами белков не происходит изменения количества митохондриальных рРНК.

Так же в отсутствие некоторых метилтрансфераз происходит увеличение массы и количества митохондрий в клетке. Мы проверили это с помощью количественного ПЦР на митохондриальную ДНК и не увидели значимой разницы между изучаемыми линиями клеток (рис. 6Б).

Так же мы проверили влияние отсутствия метилирования 12S рРНК на эффективность трансляции в митохондриях (данный эксперимент проводился совместно с С.А. Левицким, лаборатория П.А. Каменского, Биологический факультет МГУ). Для этого мы ингибировали цитоплазматическую трансляцию с помощью циклогексимида и инкубировали клетки в среде в присутствии [³⁵S]-метионина, при этом радиоактивная аминокислота встраивается только в белки, синтезируемые в митохондриях. На рис. 6В (справа) представлена автордиография геля с продуктами трансляции митохондриальных мРНК в клетках, полученных в ходе данного эксперимента. На левой панели рис. 6В представлен контроль нанесения – тот же гель, окрашенный красителем суммарных белков кумасси. Как видно, между клеточными линиями нет значимой разницы, за исключением одного из моноклонов $\Delta Trmt2b$, но мы считаем, что это обусловлено не отсутствием функционального белка, а причинами, которых мы не можем выявить.

Не смотря на то, что эффективность трансляции в клеточных линиях $\Delta Mettl15$ и $\Delta Trmt2b$ не отличается от эффективности трансляции в клетках дикого типа, при отсутствии метилирования рРНК или тРНК может отличаться точность трансляции и тем самым будет снижена эффективность работы комплексов дыхательной цепи. Проверку эффективности работы комплексов цепи переноса электронов мы производили с помощью прибора Oxytherm (Hansatech), который измеряет концентрацию кислорода в ячейке. В данном методе мы пермеабелизуем мембрану клеток, помещаем их в ячейку прибора, и последовательно добавляем к суспензии клеток субстраты или их предшественники для дыхательных комплексов, а затем их ингибиторы. По разнице наклонов кривых поглощения кислорода после добавления субстрата и после добавления ингибитора мы получаем активность дыхательного комплекса. Таким образом, мы измерили активности всех четырёх комплексов цепи переноса электронов, результаты показаны на рис. 6Г. Из него видно, что активности комплексов в клетках $\Delta Mettl15$ не отличаются от таковых в клетках дикого типа. Для клеточной линии $\Delta Trmt2b$ наблюдается небольшое но статистически значимое уменьшение активностей комплексов I, III и IV, некоторые субъединицы которых закодированы в митохондриальном геноме и, соответственно, синтезируются миторибосомами. Не наблюдается такого уменьшения для комплекса II, все субъединицы которого закодированы в ядре.

МЕТТL15 взаимодействует с интермедиатом сборки митохондриальной рибосомы

Метилтрансферазы бактериальной и цитоплазматических рРНК могут взаимодействовать с ней на разных стадиях сборки рибосомы, начиная с «голой» РНК и заканчивая поздними комплексами сборки, а в некоторых случаях и после ассоциации

субчастиц рибосомы. Для некоторых метилтрансфераз строго необходима их ферментативная активность, а некоторые нужны в качестве контроля сборки рибосомы. Созревание митохондриальных рибосом пока гораздо менее изучено, чем созревание бактериальных рибосом или цитоплазматических рибосом эукариот.

Чтобы понять на какой стадии TRMT2B и METTL15 принимают участие в созревании митохондриальных рибосом мы ввели гены данных белков, тагированные последовательно 3xFLAG на С-конце белков и содержащие сайт разрезания HRV 3С протеазой между белком и тагом, в клеточные линии $\Delta Trmt2b$ и $\Delta Mettl15$ соответственно. В качестве отрицательного контроля мы суперэкспрессировали таким же образом люциферазу с такими же довесками. На рис. 7А и 7Б можно увидеть результат проверки суперэкспрессии генов данных белков с помощью вестерн блоттинга.

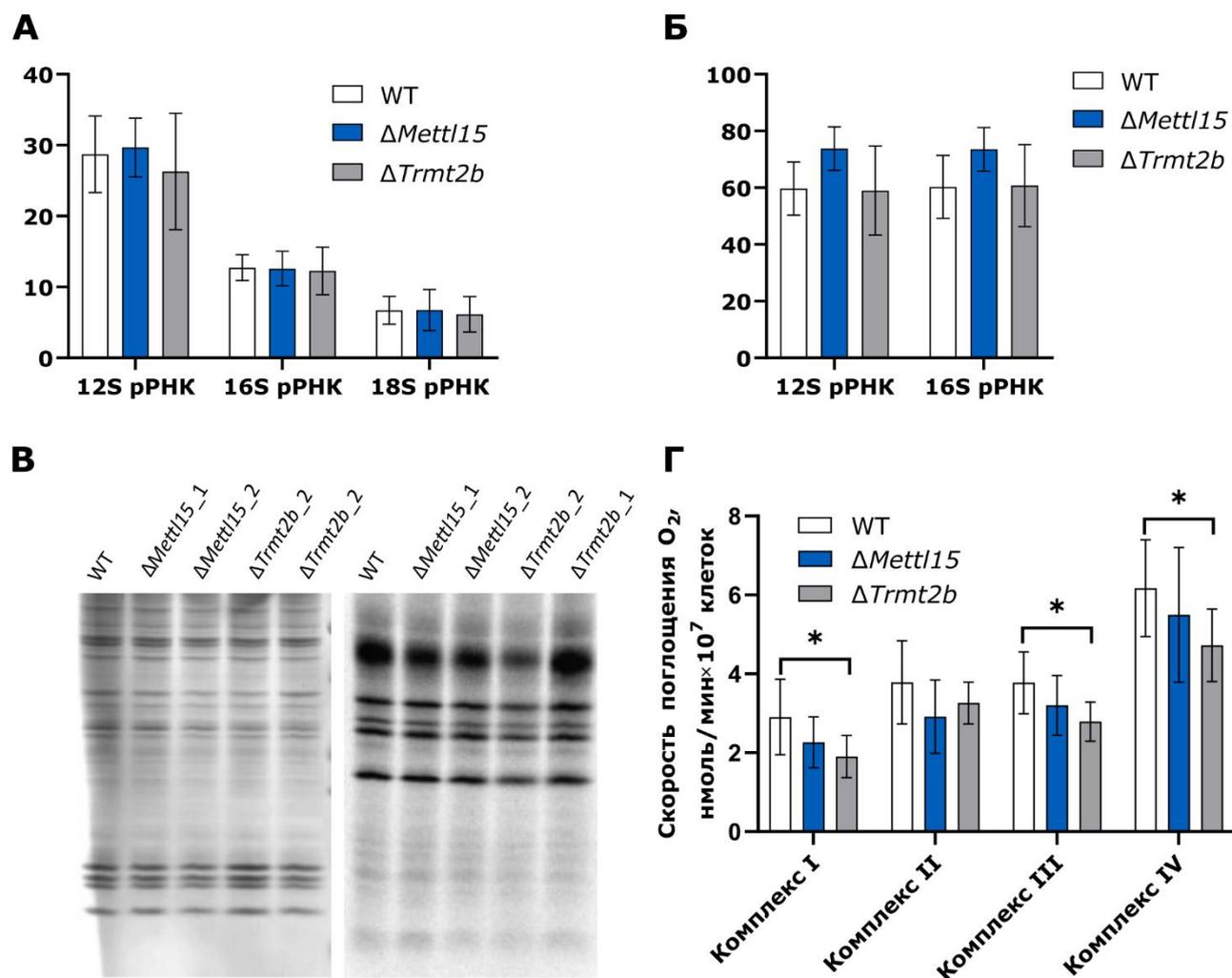


Рисунок 6. Сравнение фенотипов клеток дикого типа и клеток с инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b*. **А.** Сравнение количества рРНК в клетках дикого типа и нокаутах (WT – n=10, $\Delta Mettl15$ – n=4, $\Delta Trmt2b$ – n=10). Нормализация на *Gapdh*. **Б.** Сравнение количества мт-ДНК в клетках дикого типа и нокаутах (для всех типов клеток n=4). **В.** Оценка эффективности митохондриальной трансляции дикого типа и нокаутах. Слева – окрашивание геля красителем кумасси G-250, справа – автордиография. Эксперимент проводился 4 раза, представлен наиболее репрезентативный из них. **Г.** Измерение активности дыхательных комплексов в клетках дикого типа и нокаутах (WT – n=10, $\Delta Mettl15$ – n=4, $\Delta Trmt2b$ – n=10). Звёздочкой отмечены образцы с достоверной разницей в значениях (P-value<0,05; для комплекса I – 0,0237; для комплекса III – 0,0139; для комплекса IV – 0,0237).

С полученными клеточными линиями мы провели иммунопреципитацию белков на смоле с пришитыми антителами на FLAG эпитоп и проанализировали элюции на содержание различных рРНК с помощью количественного ПЦР с обратной транскрипцией. Результаты представлены на рис. 7В. Из них видно, что в случае иммунопреципитации METTL15 специфически выделяется 12S рРНК, но не 16S рРНК, чего нельзя сказать в случае иммунопреципитации TRMT2B.

Белки в элюции после иммунопреципитации METTL15 мы также решили проанализировать масс-спектрометрически (данный эксперимент сделан совместно с В. Г. Згодой, ИБМХ), чтобы понять, какой именно комплекс белков связан с 12S рРНК в момент ее модификации метилтрансферазой METTL15. Результаты представлены в табл. 2. Оказалось, что с 12S рРНК совыделяется практически полный комплекс белков малой субчастицы митохондриальной рибосомы за исключением mS37, mS38 и mS39. Белков большой субчастицы в элюциях не оказалось. В дополнение к рибосомным белкам, в

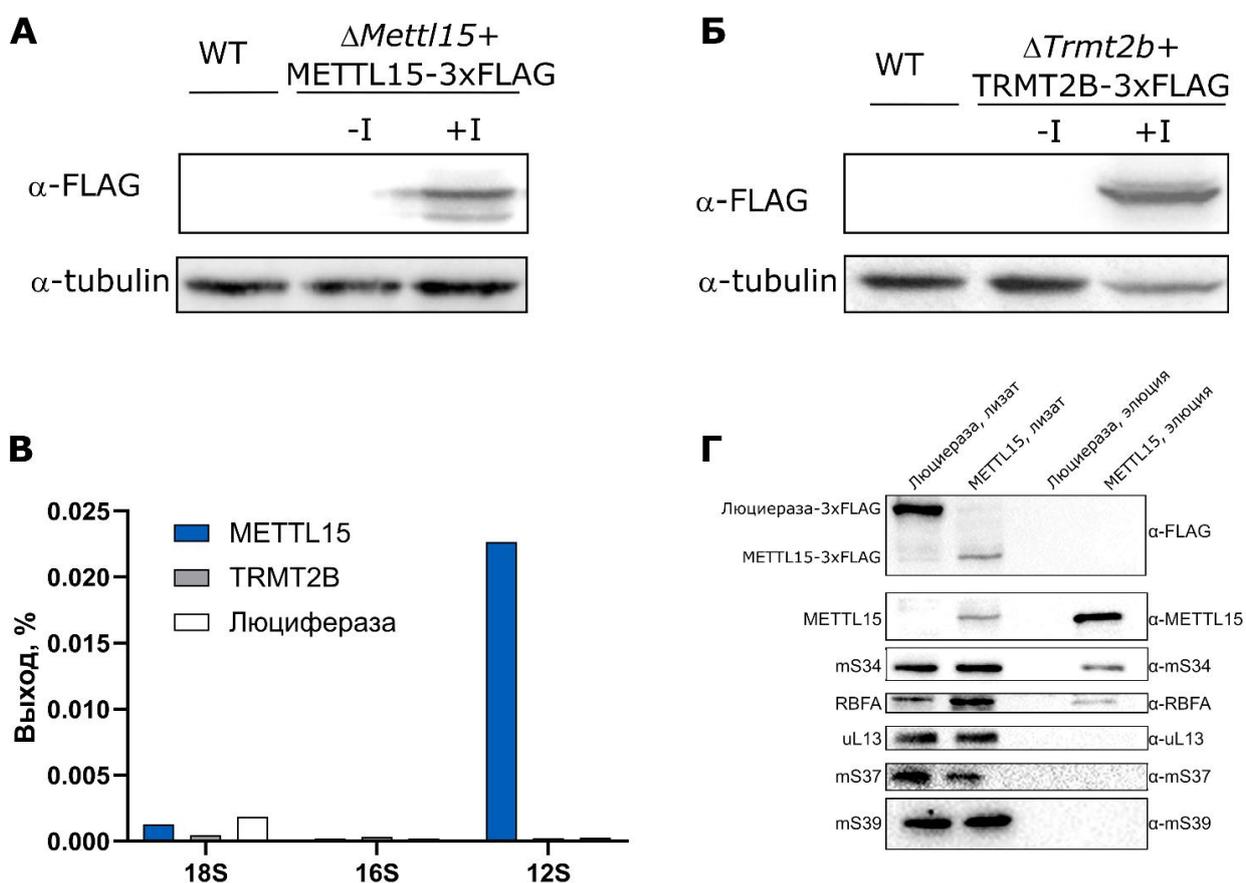


Рисунок 7. **А.** Вестерн-блот для проверки суперэкспрессии METTL15-3xFLAG. Сверху указаны клеточные линии, слева – антитела, которыми окрашивали мембраны, I – доксициклин, индуктор. **Б.** Вестерн-блот для проверки суперэкспрессии TRMT2B-3xFLAG. Сверху указаны клеточные линии, слева – антитела, которыми окрашивали мембраны, I – доксициклин, индуктор. **В.** Анализ элюций после иммунопреципитации с помощью количественного ПЦР с обратной транскрипцией. Показано количество различных рРНК относительно исходных лизатов клеток до связывания со смолой. **Г.** Анализ лизатов клеток и элюций для иммунопреципитации METTL15 методом вестерн-блоттинга.

выделенном комплексе обнаружались два фактора сборки рибосомы – TFB1M (другая метилтрансфераза митохондриальной 12S рРНК) и RBFA (фактор сборки малой субчастицы миторибосомы). Из полученных данных следует, что наиболее вероятной мишенью METTL15 является интермедиат сборки малой субчастицы рибосомы. Наличие в элюате некоторых из белков, совыделивших с METTL15, было также подтверждено методом вестерн-блоттинга (рис. 7Г).

Отсутствие METTL15 влияет на состав митохондриальных рибосом

В то время как отсутствие METLL15 может иметь слабое влияние на эффективность синтеза белков уже собранными миторибосомами, оно может сказаться на эффективности и скорости сборки миторибосом. Чтобы это проверить мы провели ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы экстрактов четырёх клеточных линий: исходной NS0, с инактивированным геном *Mettl15* и линий с суперэкспрессией интактного и мутантного *Mettl15* (рис. 8). Количество субчастиц рибосом в линиях дикого типа и нокауте практически не различимы, в то время как в линиях с суперэкспрессией белков заметно меняется

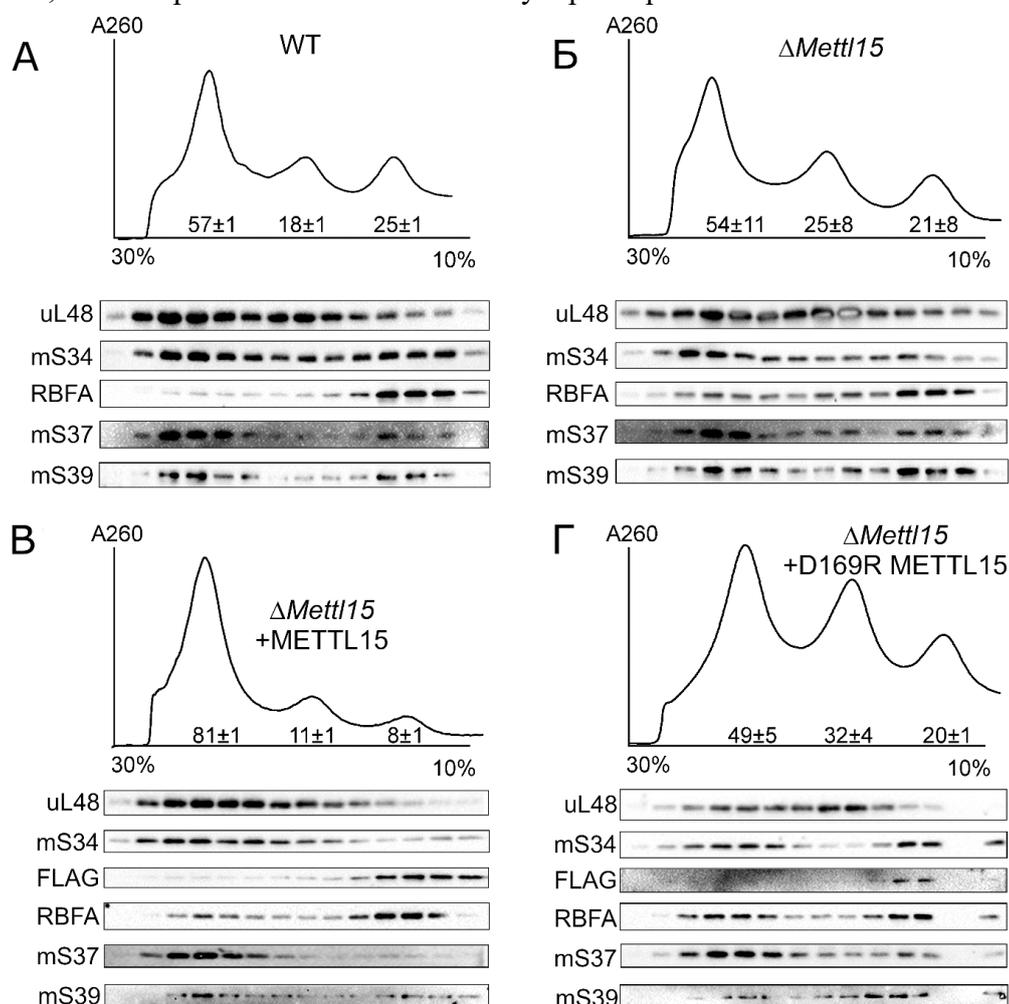


Рисунок 8. Влияние METTL15 на сборку митохондриальных рибосом. А-Г. Профили градиентов сахарозы (верхние панели) и вестерн блот анализ фракций градиентов (нижние панели, белки указаны слева) митохондриальных экстрактов из клеток: А) дикого типа NS0, Б) Δ *Mettl15*, В) Δ *Mettl15* с суперэкспрессией *Mettl15*, Г) Δ *Mettl15* с суперэкспрессией D169R *Mettl15*. Под каждым пиком указан процент его площади по отношению к суммарной площади пиков для каждого градиента (основано на 2-4 биологических репликах).

соотношение целых рибосом и субчастиц. Так при суперэкспрессии интактного *Mettl15* возрастает количество 55S рибосом, а количество 39S и 28S субчастиц уменьшается (рис. 8B), в то время как при суперэкспрессии D169R мутанта *Mettl15* наоборот – становится больше свободных субчастиц (рис. 8Г).

Для проверки влияния METTL15 на белковый состав субчастиц миторибосомы мы провели полуколичественный протеомный анализ фракций сахарозных градиентов (рис. 8, панели под графиками градиентов, эксперимент сделан совместно с В. Г. Згодой, ИБМХ). Фактор сборки RBFA в клетках дикого типа по большей части находится во фракции свободных 28S субчастиц (рис. 8А), но с инактивацией *Mettl15* его становится заметно больше в 55S рибосомах (рис. 8Б), что также было подтверждено методом вестерн блот. Ещё большее количество RBFA в 55S рибосомах наблюдается при суперэкспрессии мутантного (D169R) METTL15 (рис. 8Г). Также мы заметили подобную ситуацию и для белка NSUN4, являющегося 12S рРНК метилтрансферазой.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы создали клеточные линии с инактивированными генами *Trmt2b* и *Mettl15* и попытались определить к каким последствиям для клетки приводит отсутствие данных метилтрансфераз. Было продемонстрировано, что изучаемые нами белки являются мт-рРНК метилтрансферазами, а TRMT2B обладает специфичностью ещё и к мт-тРНК. Хотя инактивация обоих генов не приводит к яркому фенотипу, мы нашли некоторые отличия в клетках нокауты.

Эффект отсутствия белка TRMT2B не настолько ярок, чем для некоторых других рРНК-метилтрансфераз митохондрий. Несмотря на то, что эффективность митохондриальной трансляции не снижается, что согласуется с результатами другой научной группы, достоверно снижается активность дыхательных комплексов, субъединицы которых закодированы в митохондриях. Это может быть объяснено тем, что, возможно, в отсутствие такого метилирования тРНК или рРНК снижается точность трансляции, что при нынешнем развитии методов не предоставляется технически возможным проверить.

Также мы не можем сказать, чем в большей степени обусловлен увиденный нами эффект: отсутствием модификации рРНК или тРНК. Метилирование Т-петли тРНК может быть важно для их стабильности, как минимум при комбинации с мутациями тРНК, уменьшающими их шансы свернуться в необходимую структуру. Интересно, что в мт-тРНК быка U54 не модифицируется. Не известно, содержит ли 12S рРНК быка m^5U , но в геноме присутствует по всей видимости функциональный ген *Trmt2b*, который может её метилировать. Среди человеческих мт-тРНК известно, что тРНК^{Leu (UAA)}, тРНК^{Pro}, тРНК^{Asn} и тРНК^{Gln} содержат метилированный m^5U54 . Это 4 из 9 мт-тРНК человека, подходящих под выведенное нами правило (TRMT2B метилирует тРНК, на 5'-конце Т-петли которых содержится последовательность UU), что может говорить о том, что для человеческого белка оно тоже выполняется.

Таблица 2. Белки малой 28S субчастицы и её факторы сборки после иммунопреципитации. Для белков указаны их идентификатор в базе данных UniProt, их название и представленность в образце. В качестве оценки количества белков использован параметр LFQ intensity. Указаны две технические реплики иммунопреципитации: M1, M2 – иммунопреципитация METTL15; J1, J2 – иммунопреципитация люциферазы (контрольный эксперимент).

UniProt ID	Название	LFQ intensity×10 ⁻⁸			
		M1	J1	M2	J1
P08659	Luciferase	0,11	55,28	2,07	102,89
Q9DCL4	METTL15, Probable methyltransferase-like protein 15	39,09	0,40	94,50	2,11
Q3UKZ0	RBFA, Putative ribosome-binding factor A, mitochondrial	1,22	0,00	2,43	0,00
Q8JZM0	TFB1M, Dimethyladenosine transferase 1, mitochondrial	0,13	0,00	0,34	0,00
Q9CY16	bS1, 28S ribosomal protein S28, mitochondrial	1,84	0,00	3,13	0,00
Q924T2	uS2, 28S ribosomal protein S2, mitochondrial	2,79	0,00	8,89	0,00
Q9CQV5	uS3, 28S ribosomal protein S24, mitochondrial	0,79	0,00	2,06	0,00
Q99N87	uS5, 28S ribosomal protein S5, mitochondrial	2,83	0,00	3,67	0,00
Q3TLQ4	bS6, 28S ribosomal protein S6, mitochondrial	0,73	0,00	1,08	0,00
Q80X85	uS7, 28S ribosomal protein S7, mitochondrial	3,50	0,00	6,05	0,00
Q9D7N3	bS9, 28S ribosomal protein S9, mitochondrial	4,33	0,00	6,82	0,00
Q80ZK0	uS10, 28S ribosomal protein S10, mitochondrial	1,90	0,00	2,75	0,65
Q3U8Y1	uS11, 28S ribosomal protein S11, mitochondrial	0,97	0,00	2,65	0,00
E9PUY1	uS12, 28S ribosomal protein S12, mitochondrial	0,22	0,00	1,32	0,00
D3Z2K2	uS14, 28S ribosomal protein S14, mitochondrial	0,71	0,00	1,74	0,00
Q9DC71	uS15, 28S ribosomal protein S15, mitochondrial	2,80	0,00	5,90	0,00
Q9CPX7	bS16, 28S ribosomal protein S16, mitochondrial	0,90	0,00	2,05	0,00
D3Z198	uS17, 28S ribosomal protein S17, mitochondrial	1,46	0,00	1,35	0,00
G3UYQ9	mS18b, 28S ribosomal protein S18b, mitochondrial	0,43	0,00	0,23	0,00
Q8R2L5	bS18c, 28S ribosomal protein S18c, mitochondrial	0,33	0,00	0,42	0,00
P58059	bS21, 28S ribosomal protein S21, mitochondrial	1,48	0,00	0,72	0,00
Q9CXW2	uS22, 28S ribosomal protein S22, mitochondrial	5,02	0,00	15,02	0,00
Q8VE22	uS23, 28S ribosomal protein S23, mitochondrial	5,66	0,00	10,58	0,00
Q9D125	mS25, 28S ribosomal protein S25, mitochondrial	1,98	0,00	3,51	0,21
Q80ZS3	mS26, 28S ribosomal protein S26, mitochondrial	1,61	0,00	3,29	0,00
Q8BK72	mS27, 28S ribosomal protein S27, mitochondrial	2,32	0,00	4,42	0,00
Q9ER88	mS29, 28S ribosomal protein S29, mitochondrial	5,93	0,00	12,75	0,00
Q61733	mS31, 28S ribosomal protein S31, mitochondrial	1,68	0,00	1,78	0,00
Q9D2R8	mS33, 28S ribosomal protein S33, mitochondrial	1,19	0,00	3,69	0,00
Q9JIK9	mS34, 28S ribosomal protein S34, mitochondrial	7,22	0,00	17,72	0,17
Q8BJZ4	mS35, 28S ribosomal protein S35, mitochondrial	1,91	0,00	7,86	0,00
Q9CQX8	mS36, 28S ribosomal protein S36, mitochondrial	0,00	0,00	0,00	0,00
Q9CQA6	mS37, 28S ribosomal protein S37, mitochondrial	0,00	0,00	0,00	0,00
Q9DCJ7	mS38, 28S ribosomal protein S38, mitochondrial Aurora kinase A-interacting protein	0,09	0,00	0,00	0,00
Q14C51	mS39, 28S ribosomal protein S39, mitochondrial, Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	0,00	0,00	1,34	0,00
Q14C51	mS39, 28S ribosomal protein S39, mitochondrial Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	0,00	0,00	1,34	0,00

Двойная специфичность TRMT2B может быть объяснена сходством петли 24 в 12S рРНК и Т-петли тРНК (рис. 1). Тем не менее, маловероятно, чтобы модификация m^5U425 была случайным побочным явлением. В то время как нуклеотид m^1A947 , модифицируемый другой рРНК/тРНК метилтрансферазой TRMT61B, не консервативен, наличие U в данном месте рРНК (эквивалентном U425 в 12S рРНК мыши) высоко консервативно, он находится в петле 24, контактирующей с мРНК и формирующей мостик между антикодонами тРНК в Р- и Е-сайтах. Т.к. метильная группа m^5U425 напрямую не контактирует с лигандами рибосомы, скорее всего она нужна для лучшей стабильности структуры петли 24. С этой идеей согласуется то, что в цитоплазматических рибосомах эквивалентный уридин превращается в псевдоуридин, известный тем, что стабилизирует структуру за счёт стэкинга.

METTL15 принадлежит к консервативному семейству белков, которые есть в бактериях и эукариотах. Как было продемонстрировано в данной работе, METTL15 ответственен за метилирование нуклеотида C840 в 12S рРНК по атому N4, причём такое модифицирование не характерно для цитоплазматических рибосом. Таким образом, принимая во внимание возможное бактериальное происхождение митохондрий, можно предположить, что METTL15 и его гомолог RsmH могут узнавать бактериальную рибосому, но не рибосому архей или эукариот. Отсутствие METTL15 в дрожжах может отражать утрату данного гена в этой линии развития живого.

Возможное объяснение отсутствия модификаций m^4C1402/m^4C840 вне бактерий/митохондрий заключается в его функциональном замещении другим модифицированным нуклеотидом, m^6A1832 в 18S рРНК (нумерация для цитоплазматической рибосомы человека) в архейных и эукариотических цитоплазматических рибосомах. m^6A1832 в 18S рРНК образует неканоническую пару с Cm1703 таким образом, что метильная группа РНК спирали 44 (рис. 9) оказывается в прямом контакте с фосфатной группой, связывающей нуклеотиды в позициях +2 и +3 кодона мРНК, находящегося в Р-сайте. Роль m^6A и m^4C в данном месте может быть схожа, как было предположено для нескольких других сайтов в рибосоме, различные модификации нуклеотидов, которые при сравнении трёхмерных структур находятся близко, наблюдаются в различных ветвях эволюции живого. С другой

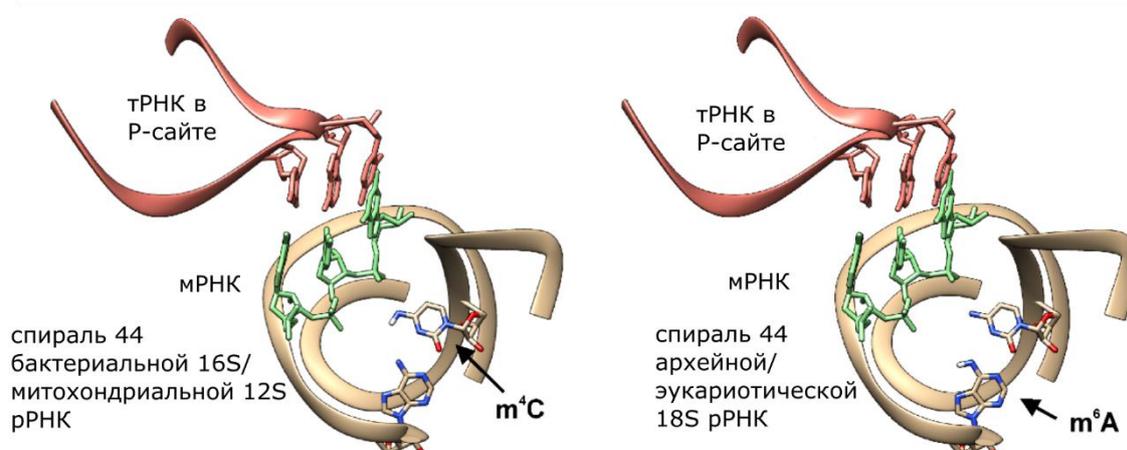


Рисунок 9. Структурное сравнение модификаций неканонической С·А пары в спирали 44 в бактериальной/митохондриальной рибосомах (слева) и архейной/эукариотической (цитоплазматической) рибосомах (справа).

стороны роль данных m^6A и m^4C может отличаться и быть специально адаптированной к механизмам инициации трансляции, которые схожи для бактериальных и митохондриальных рибосом и отличаются от таковых для цитоплазматических и архейных рибосом. Такое предположение находится в соответствии с данными по сниженной эффективности инициации трансляции у *E. coli* с отсутствующим метилированием C1402. Т.к. метод, позволяющий оценить эффективность инициации трансляции в митохондриях пока еще не разработан, роль m^4C в данном процессе остаётся на уровне предположения. Более того, вряд ли можно ожидать яркий фенотип из-за неправильного прочтения кодонов миторибосомой в линии с инактивированным *Mettl15*, т.к. яркого фенотипа не наблюдается и в клеточной линии с миторибосомами, для которых была показана повышенная частота ошибочного включения аминокислот. Мы не обнаружили заметного влияния отсутствия METTL15 на синтез белка в митохондриях, хотя двум другим научным группам это удалось. Точной причины, почему так вышло мы не знаем, но предположительно данное свойство может зависеть от вида (другие научные группы использовали клетки человека, а не мыши) или обусловлено другой клеточной линией (в других работах использовали клеточную линию HAP1 – адгезивную, с гаплоидным генотипом).

Из результатов иммунопреципитации следует, что скорее всего мишенью METTL15 является интермедиат сборки малой субчастицы рибосомы. Полученные результаты согласуются с данными по RsmH, для которого была показана неспособность модификации ни «голой» 16S рРНК, ни 70S рибосомы, в то время как активность белка на 30S субчастице почти оптимальна. В данной работе продемонстрировано, что METTL15 взаимодействует с 12S рРНК в комплексе почти со всеми белками малой субчастицы, но белков большой субчастицы в элюате не находится. Метилтрансфераза TFB1M, также совыделяющаяся в данном комплексе, модифицирует 12S рРНК на поздних стадиях сборки. Отсутствие взаимодействия METTL15 с 39S субчастицей также подтверждается результатами вестерн-блота (рис. 8Б, 7Г) и масс-спектрометрии фракций градиентов сахарозы. Белок mS38, который недопредставлен в комплексе, совыделяющимся с METTL15, – ближайший белок к сайту модификации. В одной из последних работ было показано, что содержание данного белка в малой субчастице уменьшается при инактивации *METTL15* в линии клеток HAP1. На линии клеток NS0 мы такого эффекта не наблюдаем, причиной чего может быть видовые отличия или отличия клеточных линий в скорости созревания миторибосом. Белок mS37 не преципитируется в комплексе с METTL15. В структуре малой субчастицы он располагается на задней стороне, связывая голову и тело и может быть заменой 3'-области в бактериальной 16S рРНК, взаимодействующей с сайтом связывания рибосомы в мРНК. Также мы обнаружили, что в элюате присутствует белок RBFA, гомолог бактериального фактора сборки рибосомы RbfA. Таким образом, мишенью METTL15 скорее всего является поздний интермедиат сборки 28S субчастицы, в котором нет mS37 и почти нет mS38 и mS39, и в то же время содержащий RBFA.

Несмотря на то, что METTL15, по-видимому, участвует в сборке 28S субчастицы, при инактивации его гена мы видим лишь незначительное увеличение количества рибосомных субчастиц, хотя у других научных групп данный эффект более выражен. Тем не менее мы

видим увеличение количества рибосомных субчастиц в клетках с суперэкспрессией каталитически неактивного METTL15 с заменой D169R. Экспрессия каталитически неактивных рРНК метилтрансфераз может приводить к двум последствиям. Например, в случае с Dim1, WBSR22 и NEP1, мутантные метилтрансферазы могут частично компенсировать отсутствие соответствующего природного гена. Но в случае с METTL15 мы наблюдаем усиленный эффект, что характерно, например, для метилтрансферазы RsmA. В первых случаях связывание метилтрансферазы может быть более важно для завершения сборки, в последних же случаях для дальнейшей судьбы рибосомы скорее всего важна диссоциация посткаталитического комплекса.

Согласно нашим результатам, вместе с METTL15 и 28S субчастицей совыделяется белок RBFA, гомолог бактериального RbfA. В бактериях этот фактор был идентифицирован как высококопийный супрессор мутаций 16S рРНК, чувствительных к пониженным температурам. Инактивация бактериального гена *rbfa* приводит к повышенной чувствительности к пониженным температурам и накоплению 17S рРНК предшественника РНК-компонента малой субчастицы рибосом. Бактериальный RbfA связывается с 30S субчастицей в районе шеи, приводя к довольно большому сдвигу спирали 45 и верхней части спирали 44 на 25 Å. Функциональная связь между бактериальным RbfA и модифицированием 16S рРНК была показана в случае метилтрансферазы RsmA. Из этих данных можно предположить, что перемещение части спирали 44, содержащей сайт модификации RsmH, с помощью RbfA создаёт субстрат для данной метилтрансферазы. Несмотря на то, что для митохондрий процесс сборки рибосомы менее изучен, чем для бактерий, роль RBFA в сборке 28S субчастицы уже была показана. Нокдаун RBFA в клетке приводит к уменьшению диметилирования нуклеотидов A936 и A937 12S рРНК, находящихся в спирали 45. На основании наших результатов мы можем предположить схожую кооперативность связывания RBFA и метилирования C840 в 12S рРНК. Данная гипотеза согласуется с тем, что в дрожжах при отсутствии модификации m⁴C также отсутствует и гомолог RbfA.

В клетках дикого типа RBFA по большей части находится во фракции малой субчастицы, как и METTL15, и его почти нет в 55S рибосомах. При инактивации *Mettl15* RBFA больше связывается с целой рибосомой. Из полученных данных мы предположили, что модифицирование 12S рРНК с последующими заключительными стадиями сборки 28S субчастицы приводят к замене RBFA и METTL15 на оставшиеся рибосомные белки и включение малой субчастицы в трансляцию (рис. 10). Без METTL15 этот процесс скорее всего проходит менее организованно и малые субчастицы, содержащие RBFA, могут ошибочно ассоциировать с 39S субчастицами. Наше предположение также подтверждается увеличением соотношения NSUN4 между фракциями собранной рибосомы и фракциями малой субчастицы в пользу 55S при инактивации *Mettl15*. А уменьшение количества NSUN4 в 28S субчастице может объяснить снижение эффективности метилирования m⁵C841 в 12S рРНК в нокаутной линии.

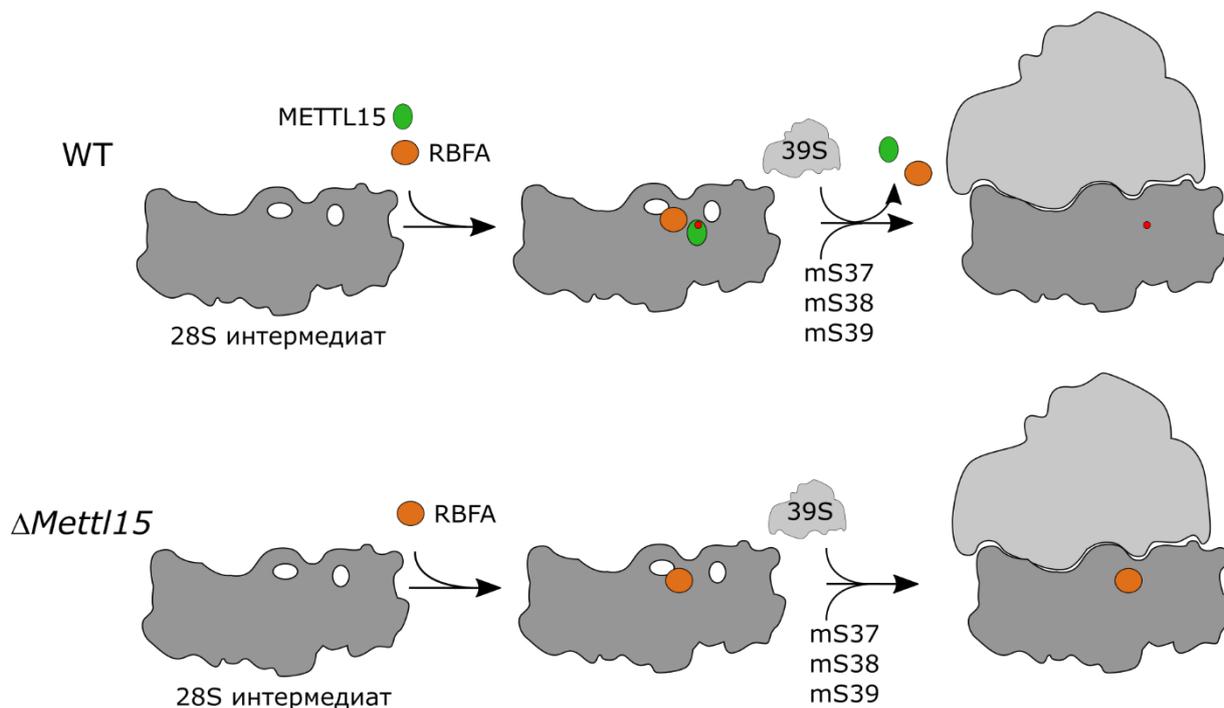


Рисунок 10. Схема участия METTL15 в поздних стадиях сборки малой субчастицы митохондриальной рибосомы. Верхняя панель показывает сборку 28S субчастицы в клетках дикого типа, нижняя – в клетках $\Delta Mettl15$. Белки METTL15, RBFA, рибосомные обозначены и подписаны на рисунке. Схема составлена на основе анализа белков, совыделяющихся с METTL15, а также анализа белков фракций 28S и 55S субчастиц из клеток дикого типа и $\Delta Mettl15$.

ВЫВОДЫ

1. Белок METTL15 отвечает за метилирование нуклеотида C840 по атому N4 в 12S митохондриальной рРНК.
2. Белок TRMT2B отвечает за метилирование по атому C5 нуклеотидов U425 в 12S митохондриальной рРНК и U54 в некоторых митохондриальных тРНК, содержащих UU на 5'-конце Т-петли.
3. Модификация перечисленных выше нуклеотидов не влияет на количество 12S рРНК и мт-ДНК, эффективность синтеза белков в митохондриях.
4. Отсутствие функционального белка TRMT2B и, как следствие, метилирования нуклеотидов U425 12S мт-рРНК и U54 некоторых мт-тРНК снижает эффективность работы дыхательной цепи.
5. Метилирование нуклеотида C840 12S мт-рРНК не влияет на эффективность работы дыхательной цепи.
6. Отсутствие каталитически активного белка METTL15 в клетке приводит к снижению эффективности ассоциации субчастиц митохондриальной рибосомы.
7. Белок METTL15 метилирует нуклеотид C840 в 12S рРНК на поздней стадии сборки 28S субчастицы. После этого комплекс предшественника малой субчастицы и белков METTL15 и RBFA диссоциирует, а сборка 28S субчастицы завершается.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.02.03 по специальности 02.00.10 — биорганическая химия (химические науки):

1. **Laptev I.**, Shvetsova E., Levitskii S., Serebryakova M., Rubtsova M., Zgoda V., Bogdanov A., Kamenski P, Sergiev P. and Dontsova O. METTL15 interacts with the assembly intermediate of murine mitochondrial small ribosomal subunit to form m⁴C840 12S rRNA residue // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 14. P. 8022–8034, IF 11,502 (Web of Science).
2. **Laptev I.**, Shvetsova E., Levitskii S., Serebryakova M., Rubtsova M., Bogdanov A., Kamenski P, Sergiev P. and Dontsova O. Mouse Trmt2B protein is a dual specific mitochondrial methyltransferase responsible for m⁵U formation in both tRNA and rRNA // *RNA Biology.* 2020. Vol. 17, № 4. P. 441–450, IF 5,350 (Web of Science).
3. **Laptev I.**, Dontsova O., Sergiev P. Epitranscriptomics of Mammalian Mitochondrial Ribosomal RNA // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 10. P. 2181, IF 4,366 (Web of Science).

Тезисы докладов и материалы конференций:

- Sergiev P.V., Dontsova O.A., Golovina A.Ya, Averina O.A., Permyakov O.A., Sergeeva O.V., Nesterchuk M.V., Rubtsova M.P., Deykin A.V., Chugunova A.A., **Laptev I.G.**, Pletnev P.I., Navalayeu T.I., Petryukov K.S., Shvetsova E.T., Loseva E.M., Bogdanov A.A., Polikanov Yu S., Osterman I.A. Modification of translation apparatus: in a search for a functional role – доклад (представлялся Сергиевым П. В.), *Ribosomes and Translation*, Россия, Петергоф, 13.05.2018–16.05.2019
- **Laptev I.G.**, Shvetsova E.T., Serebryakova M.V., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Unraveling the functions of mitochondrial putative methyltransferases TRMT2B and METTL15 – постерная сессия, *Ribosomes and Translation*, Россия, Петергоф, 13.05.2018–16.05.2019;
- Sergiev Petr V., Osterman I., Pletnev P., Petriukov K., Shvetsova E., **Laptev I.**, Averina O., Permyakov O., Popov V.S., Deykin A., Serebryakova M., Rubsova M., Bogdanov A.A., Dontsova O. Searching for unknown mammalian RNA methyltransferases – доклад (представлялся Сергиевым П. В.), *Ribosome 2019 México, Mérida*, 06.01.2019–10.01.2019.