

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Пиунова Ульяна Евгеньевна

**Изучение молекулярных механизмов инициации трансляции в
митохондриях**

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Сергей Алексеевич Левицкий

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 6 |
| 1. ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| 1.1. Актуальность темы исследования и степень ее разработанности..... | 7 |
| 1.2. Цель и задачи работы..... | 10 |
| 1.3. Научная новизна исследования..... | 10 |
| 1.4. Научная и практическая значимость..... | 11 |
| 1.5. Личный вклад автора..... | 12 |
| 1.6. Методология и методы исследования..... | 12 |
| 1.7. Положения, выносимые на защиту..... | 12 |
| 1.8. Степень достоверности и апробация результатов..... | 13 |
| 1.9. Структура и объем диссертации..... | 13 |
| 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 14 |
| 2.1. Морфология митохондрий..... | 14 |
| 2.2. Митохондриальные функции..... | 15 |
| 2.3. Геном митохондрий..... | 16 |
| 2.4. Митохондриальные рибосомы..... | 19 |
| 2.5. Транскрипция в митохондриях..... | 20 |
| 2.6. Трансляция в митохондриях..... | 20 |
| 2.7. Инициация трансляции в митохондриях..... | 21 |
| 2.8. Регуляция митохондриальной трансляции..... | 24 |
| 2.9. Трансляционные активаторы дрожжей..... | 24 |
| 2.10. PPR-белки..... | 26 |
| 2.11. PPR-белки человека..... | 26 |
| 2.12. LRPPRC и SLIRP..... | 27 |
| 2.13. PTCD2..... | 30 |
| 2.14. Трансляционные активаторы в митохондриях человека..... | 30 |
| 2.15. ZMYND17..... | 31 |
| 2.16. Митохондриальные заболевания..... | 32 |
| 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 35 |
| 3.1. Штаммы и линии клеток, среды для культивирования..... | 35 |
| 3.2. Плазмидные векторы..... | 35 |
| 3.3. Олигонуклеотиды..... | 36 |
| 3.4. Получение линий клеток с делецией в генах исследуемых белков..... | 37 |
| 3.4.1. Система редактирования генома..... | 37 |
| 3.4.2. Клонирование гРНК в составе плазмидного вектора pU6-gRNA..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.4.3. Получение генномодифицированных клеток | 39 |
| 3.4.4. Проверка трансфицированных клеток на наличие делеции | 39 |
| 3.4.5. Выделение ДНК из клеток человека | 40 |
| 3.5. Получение стабильных клеточных линий | 40 |
| 3.5.1. Клонирование кодирующей части гена <i>PTCD2</i> в составе плазмидного вектора pSBtet-Neo | 41 |
| 3.5.2. Получение генномодифицированных клеток | 42 |
| 3.5.3. Проверка трансфицированных клеток | 43 |
| 3.6. Получение клеточных линий с временной экспрессией белка <i>SLIRP</i> | 43 |
| 3.6.1. Клонирование кодирующей части гена <i>SLIRP</i> в составе плазмидного вектора pcDNA5/FRT/TO | 43 |
| 3.6.2. Получение генномодифицированных клеток | 44 |
| 3.7. Анализ пролиферативной активности клеток | 44 |
| 3.8. Иммуноблоттинг | 44 |
| 3.9. Анализ митохондриальной трансляции <i>in vivo</i> в клетках млекопитающих | 46 |
| 3.9.1. Мечение продуктов митохондриальной трансляции <i>in vivo</i> в клетках млекопитающих | 46 |
| 3.9.2. Подготовка радиоактивно меченых образцов клеток млекопитающих | 47 |
| 3.9.3. Подготовка HPG-меченых образцов клеток млекопитающих | 47 |
| 3.9.4. Клик-реакция | 47 |
| 3.9.5. Электрофоретическое разделение меченых полипептидов | 47 |
| 3.9.6. Визуализация радиоактивно меченых полипептидов | 48 |
| 3.9.7. Визуализация HPG-меченых полипептидов | 48 |
| 3.10. Измерение скорости поглощения кислорода | 48 |
| 3.11. Анализ клеточного метаболизма с помощью Seahorse XF HS MINI | 48 |
| 3.12. Выделение митохондрий из клеток человека [118] | 49 |
| 3.13. Измерение активности IV комплекса спектрофотометрически | 49 |
| 3.14. Солюбилизация мембран митохондрий, подготовка проб и постановка Blue-Native электрофореза [119] | 50 |
| 3.14.1. Анализ активности I комплекса в полиакриламидном геле | 51 |
| 3.14.2. Анализ активности IV комплекса в полиакриламидном геле | 51 |
| 3.14.3. Анализ активности V комплекса в полиакриламидном геле | 51 |
| 3.15. Фракционирование миторибосом | 51 |
| 3.16. Получение конструкций для гетерологичной экспрессии генов | 52 |
| 3.16.1. Выделение и очистка рекомбинантных белков | 53 |
| 3.17. Анализа электрофоретической подвижности комплексов | 54 |
| 3.18. Ко-иммунопреципитация, сравнительная протеомика и анализ данных | 55 |

| | |
|---|-----|
| 3.18.1. Ко-иммунопреципитация рекомбинантного PTCD2..... | 55 |
| 3.18.2. Подготовка образцов для сравнительной протеомики..... | 56 |
| 3.18.3. Очистка пептидов и масс-спектрометрический анализ | 56 |
| 3.18.4. Анализ данных протеомики..... | 57 |
| 3.19. Количественная ПЦР в реальном времени | 58 |
| 3.20. Биоинформатический анализ эволюционной истории | 60 |
| 4. РЕЗУЛЬТАТЫ | 63 |
| 4.1. Получение линии клеток HeLa с делецией в гене <i>ZMYND17</i> | 63 |
| 4.2. Оценка эффективности митохондриальной трансляции в клетках человека с функциональной делецией в гене белка <i>ZMYND17</i> | 64 |
| 4.3. Анализ скорости поглощения кислорода и активности цитохром с оксидазы в клетках с делецией в гене <i>ZMYND17</i> | 65 |
| 4.4. Определение влияния делеции в гене <i>ZMYND17</i> на распределение активности НАДН-дегидрогеназы в суперкомплексах ЭТЦ различного порядка..... | 67 |
| 4.5. Анализ активности в геле АТФ-синтазы в митохондриях клеток нокаутной и исходной линий клеток HeLa | 68 |
| 4.6. Биоинформатический анализ эволюции белков Mss51 и <i>ZMYND17</i> | 68 |
| 4.7. Получение линии клеток HEK293T с делецией в гене <i>SLIRP</i> | 72 |
| 4.8. Анализ скорости поглощения кислорода, продукции АТФ и пролиферативной активности при функциональной делеции в гене <i>SLIRP</i> | 73 |
| 4.9. Оценка эффективности биосинтеза белка в митохондриях методом биоортогональной клик-химии | 77 |
| 4.10. Оценка количества и активности комплексов дыхательной цепи митохондрий в отсутствие белка <i>SLIRP</i> | 79 |
| 4.11. Сравнение количества митохондриальных транскриптов в клетках линий с нокаутом по гену <i>SLIRP</i> и дикого типа | 80 |
| 4.12. Анализ соосаждения белка <i>SLIRP</i> с миторибосомами | 82 |
| 4.13. Получение линии клеток HeLa с делецией в гене <i>PTCD2</i> | 84 |
| 4.14. Анализ эффективности митохондриальной трансляции <i>in vivo</i> в клетках с делецией в гене <i>PTCD2</i> | 85 |
| 4.15. Оценка влияния нокаута по гену <i>PTCD2</i> на митохондриальное дыхание и активность цитохром с оксидазы | 88 |
| 4.16. Распределение активности НАДН-дегидрогеназы в отсутствие белка <i>PTCD2</i> | 90 |
| 4.17. Анализ белковых взаимодействий <i>PTCD2</i> и ассоциации с миторибосомой..... | 91 |
| 5. ОБСУЖДЕНИЕ | 95 |
| 5.1. <i>ZMYND17</i> | 95 |
| 5.2. <i>SLIRP</i> | 100 |
| 5.3. <i>PTCD2</i> | 104 |
| 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 106 |

| | |
|---------------------------|-----|
| 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 109 |
|---------------------------|-----|

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АДФ – аденозиндифосфат

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид

ФАД – флавинадениндинуклеотид

SDS (аббр. от англ. Sodium dodecyl sulfate) – додецилсульфат натрия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

PBS (аббр. от англ. Phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

ПЦР – полимеразная цепная реакция

CRISPR (аббр. от англ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами

Cas9 (от англ. CRISPR-associated protein 9) – РНК-управляемая эндонуклеаза

PAM (аббр. от англ. Protospacer adjacent motif) – мотив, смежный с протоспейсером

EMSA (аббр. от англ. Electrophoretic mobility shift assay) – анализа электрофоретической подвижности комплексов

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Митохондрии – двумембранные органеллы большинства эукариотических клеток – согласно теории симбиогенеза произошли от свободноживущих предков современных пурпурных альфа-протеобактерий [1]. В процессе эволюции митохондрии утратили автономность, став облигатными эндосимбионтами большинства эукариотических клеток.

Ключевая роль митохондрий заключается в осуществлении финального этапа окисления питательных веществ и производстве универсального энергетического эквивалента, АТФ, в процессе окислительного фосфорилирования. Окислительное фосфорилирование опосредуется мультисубъединичными мембранными белковыми комплексами, располагающимися во внутренней митохондриальной мембране. Однако митохондриальные функции тесно взаимосвязаны с клеточным метаболизмом в целом и не ограничиваются обеспечением клетки энергией. Митохондрии участвуют в регуляции некоторых типов апоптоза, высвобождая цитохром c и активируя каспазы, контролируют внутриклеточный кальциевый баланс, в митохондриях проходят реакции синтеза метаболитов, таких как железо-серных кластеров, гема и фосфолипидов, а также реакции цикла Кребса, глюконеогенеза и цикла мочевины. Митохондрии влияют на окислительный статус клетки и продукцию активных форм кислорода, которые могут служить вторичными мессенджерами. Нарушения в этих процессах часто ведут к дисфункции органелл или серьезным метаболическим нарушениям на уровне клетки и организма в целом, что ассоциировано у человека с нейродегенеративными заболеваниями, метаболическими синдромами и старением.

В ходе эволюции митохондриальный геном претерпел значительную редукцию – у большинства эукариот он сохранил лишь небольшое количество генов, которое варьирует у разных видов. Остальные гены были либо утрачены, либо интегрированы в ядерный геном клетки-хозяина. Большинство митохондриальных белков (более 99%) кодируется ядерным геномом, синтезируется в цитоплазме и импортируется в митохондрии. В митохондриальной ДНК располагаются гены миторибосомных и транспортных РНК, а также белков, критически важных для выполнения ключевой функции органелл – окислительного фосфорилирования.

В органелле содержатся собственные аппараты для поддержания и репликации генома, транскрипции и трансляции. Несмотря на эволюционную и функциональную общность этих систем с бактериальными, молекулярные процессы в митохондриях обрели ряд уникальных черт, отражающих специализацию этих органелл как к производству энергии, так и участию в метаболических и сигнальных путях.

Корректность сборки, а следовательно и активность комплексов цепи окислительного фосфорилирования зависит от скоординированного синтеза отдельных субъединиц, кодируемых

как митохондриальным, так и ядерным геномами. Активность дыхательных комплексов требует не только точного количественного баланса всех компонентов, но и их посттрансляционной модификации, сборки в мультимерные структуры и интеграции с другими элементами электрон-транспортной цепи. Это создаёт необходимость в тонкой координации между митохондриальной трансляцией, ядерно-цитоплазматическим синтезом митохондриальных белков, а также системами контроля качества и стрессового ответа.

Регуляция экспрессии генов, сохранённых в митохондриальной ДНК, играет ключевую роль в функционировании органелл. В процессе транскрипции в митохондриях образуются два полицистронных транскрипта, которые затем подвергаются процессингу, в результате которого формируются зрелые мРНК. Таким образом, механизмы контроля транскрипции модулируют только интенсивность синтеза РНК в целом, но не отдельных транскриптов. Тонкая регуляция экспрессии осуществляется на посттранскрипционном уровне – через контроль стабильности индивидуальных мРНК, а также за счет регуляции митохондриальной трансляции.

Синтез белка в митохондриях осуществляется специализированными митохондриальными рибосомами (миторибосомами). Исследования последних лет позволили получить структуры высокого разрешения миторибосом млекопитающих и пекарских дрожжей и прояснили ряд особенностей их строения, адаптации к специализированным функциям органелл и особенностям транслируемых полипептидов [2,3]. Также были изучены некоторые механизмы адаптации сборки миторибосом к окислительному статусу клетки и модуляции митохондриальной трансляции [4,5].

Лимитирующей стадией синтеза белка в органелле является инициация, поэтому она подвергается наибольшему контролю. Баланс инициации трансляции индивидуальных митохондриально кодируемых полипептидов поддерживается различными трансляционными факторами, которые синтезируются в цитозоле, импортируются в митохондрии и регулируют трансляцию в органелле. В митохондриях млекопитающих и пекарских дрожжей обнаружено два фактора инициации трансляции – mtIF2 и mtIF3, аналоги бактериальный IF2 и IF3, соответственно. При этом их функции и строение отличается как от бактериальных ортологов, так и между эукариотическими организмами. Недавние биохимические исследования выявили механизм формирования инициаторного комплекса в митохондриях человека, а также функции и влияние на синтез белка в органелле митохондриальных факторов инициации трансляции человека и дрожжей [6–8].

Особенности процесса инициации трансляции, включая его адаптацию к динамичным энергетическим потребностям клетки и координацию с ядерно кодируемыми компонентами, остаются актуальным предметом исследований. Однако детальные механизмы остаются малоизученными, несмотря на возрастающий интерес, что обусловлено многоуровневыми

взаимодействиями между различными белковыми факторами и отсутствием полноценной системы митохондриальной трансляции *in vitro*.

У пекарских дрожжей в качестве механизма сбалансированной и адаптивной трансляции выявлена и достаточно подробно исследована система трансляционных активаторов – белков, регулирующих инициацию, элонгацию и фолдинг индивидуальных митохондриально кодируемых полипептидов [9]. Как правило, трансляционные активаторы взаимодействуют с протяженными 5'-нетранслируемыми областями (5'-НТО) митохондриальных мРНК, способствуя адресации миторибосом к стартовому кодону. Митохондриальные мРНК человека не содержат 5'-НТО, что подразумевает отсутствие сходной с дрожжевой системы трансляционных активаторов. Тем не менее, для митохондрий человека было показано наличие как минимум одного трансляционного активатора: белок TACO1 селективно необходим для трансляции мРНК COI [10].

Несмотря на многочисленные исследования митохондриальных регуляторных белков, их непосредственное влияние на трансляцию остаётся предметом дискуссий. Многие регуляторные белки, изначально ассоциированные с другими этапами экспрессии генов, могут косвенно влиять на трансляцию через сложные взаимодействия, а также иметь более одной функции.

Функции гомологов дрожжевых трансляционных активаторов у человека также остаются недостаточно изученными. Несмотря на эволюционную консервативность отдельных доменов и мотивов, их роль в митохондриях человека может существенно отличаться из-за усложнения регуляторных сетей и появления новых белков и механизмов. Например, ZMYND17 у млекопитающих, гомолог белка Mss51 дрожжей, также локализуется в митохондриях, но является глобальным регулятором метаболизма у мышей и функционально не аналогичен трансляционному активатору Mss51. Однако, влияние ZMYND17 на трансляцию в клетках человека остается неисследованным [11–13].

Многие трансляционные активаторы дрожжей принадлежат к семейству белков, содержащих пентатрикопептидные домены. Представители этого семейства демонстрируют способность связываться с мРНК и рибосомами, поскольку пентатрикопептидные домены известны РНК-связывающей активностью. Для некоторых белков человека, содержащих пентатрикопептидные домены, были показаны роли в транскрипции и процессинге РНК, но не регуляции трансляции [14,15]. Известны два таких белка, входящие в состав миторибосомы человека [16]. Но влияние на синтез полипептидов в митохондриях еще двух белков (PTCD2 и LRPPRC), содержащих пентатрикопептидные домены, остается спорным. Например, функция PTCD2 в процессе инициации митохондриальной трансляции не определена, так как не было изучено фенотипа, характерного для его полного отсутствия [17]. Белки LRPPRC и SLIRP, участвующие в стабилизации мРНК, предположительно модулируют трансляцию через контроль

доступности матриц, однако конкретные механизмы их действия до конца не выяснены. Также, поскольку эти белки образуют комплекс, активность каждого из них по-отдельности остается малоизученной [18,19].

Таким образом, регуляция митохондриальной трансляции, особенно на этапе инициации, играет центральную роль в поддержании энергетического гомеостаза клетки. Нарушение синхронизации между синтезом митохондриально и ядерно кодируемых субъединиц ЭТЦ ведёт к дестабилизации дыхательных комплексов, накоплению повреждённых белков и генерации активных форм кислорода, что лежит в основе множества патологий. Изучение механизмов, обеспечивающих точность и адаптивность митохондриального белкового синтеза, остаётся ключевой задачей для понимания как фундаментальных принципов работы органелл, так и разработки терапии митохондриальных заболеваний.

1.2. Цель и задачи работы

Цель работы – выяснить, являются ли белки *ZMYND17*, *SLIRP* и *PTCD2* участниками механизмов тонкой регуляции трансляции в митохондриях клеток человека.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Получить линии клеток человека с делециями в генах *ZMYND17*, *SLIRP* и *PTCD2*, приводящими к отсутствию соответствующих функциональных белков.
- 2) Охарактеризовать полученные клеточные линии с точки зрения эффективности биосинтеза отдельных митохондриально кодируемых белков и функциональности митохондрий.

1.3. Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые установлена роль белка *ZMYND17* человека в регуляции посттрансляционных этапов сборки цитохром с оксидазы и АТФ-синтазы цепи окислительного фосфорилирования митохондрий. Описаны молекулярные нарушения, лежащие в основе патологического фенотипа, наблюдаемого на мышинной модели. Впервые проведен комплексный биоинформатический анализ эволюционной истории белков *ZMYND17* человека и *Mss51* пекарских дрожжей, объясняющий различия их функций в регуляции митохондриального метаболизма.

В работе впервые показана самостоятельная роль белка *SLIRP* в транскрипт-специфической регуляции инициации митохондриальной трансляции, что расширяет представления о его функциях за рамками вспомогательной роли в комплексе с *LRPPRC*. Впервые продемонстрирована специфическая разбалансировка синтеза митохондриально кодируемых полипептидов в отсутствие *SLIRP* на фоне неизменного уровня и стабильности мРНК. Биохимическими методами экспериментально подтверждена ассоциация белка *SLIRP* с

малой субъединицей миторибосомы, изначально выявленная только на основе данных микроскопии высокого разрешения.

Впервые была получена линия клеток человека с делецией в гене *PTCD2*, приводящая к полному отсутствию соответствующего белка. Установлено, что нокаут *PTCD2* приводит к резкому снижению эффективности синтеза и уменьшению стабильного уровня СОIII, что влечет за собой нарушение функционирования и сборки дыхательной цепи. Кроме того, впервые биохимически подтверждено взаимодействие *PTCD2* с ассоциированной митохондриальной рибосомой, что указывает на его прямое участие в модуляции работы трансляционного аппарата. Полученные данные позволяют классифицировать *PTCD2* как второй известный у млекопитающих (после *TACO1*) транскрипт-специфичный регулятор трансляции.

1.4. Научная и практическая значимость

Биосинтез белка в митохондриях представляет собой фундаментальный процесс, определяющий не только функциональное состояние самих органелл, но и в значительной степени влияющий на жизнеспособность клетки и организма в целом. Нарушения митохондриальной трансляции могут приводить к критическим дисфункциям энергетического метаболизма, что ассоциировано с широким спектром патологических состояний: от тяжелых заболеваний в постнатальном периоде, вплоть до летального исхода на ранних этапах внутриутробного развития.

Полученные в данном исследовании результаты существенно расширяют современные представления о механизмах регуляции экспрессии митохондриальных генов. Выявленные закономерности могут послужить основой для целого ряда дальнейших исследований в области молекулярной биологии митохондрий с использованием методов молекулярной биологии, биохимии и современных структурных подходов.

Помимо этого, полученные данные подчеркивают исключительную сложность системы регуляции митохондриальной трансляции, которая представляет собой многокомпонентную сеть взаимодействий между специализированными белками-регуляторами, нуклеиновыми кислотами и компонентами трансляционного аппарата. Детальное изучение функций каждого участника этой сети и механизмов их координированного действия является необходимым условием для понимания принципов организации системы экспрессии генов в митохондриях. Проведенное исследование вносит значительный вклад в формирование целостной картины регуляторных взаимодействий, приближая научное сообщество к пониманию того, как тонкая настройка биосинтеза белка интегрирована в более глобальные клеточные процессы, такие как поддержание энергетического гомеостаза.

Практическая значимость исследования обусловлена тем, что нарушения митохондриальной трансляции являются причиной широкого спектра тяжелых заболеваний

человека. Полученные результаты углубляют понимание молекулярных основ патогенеза митохондриальных болезней, открывают новые потенциальные мишени для терапевтического вмешательства и создают основу для разработки стратегий генной и клеточной терапии, а также методов диагностики патологий.

1.5. Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен анализ литературных данных, разработан дизайн и выполнены эксперименты, проанализированы и интерпретированы полученные результаты. Подготовка публикаций и написание диссертационной работы также осуществлены автором. Участие соавторов в отдельных этапах исследования надлежащим образом отражено в публикациях.

1.6. Методология и методы исследования

Работа выполнена с применением современных методов молекулярной биологии, биохимии, биоэнергетики и биоинформатики. Для редактирования генома клеток человека линий HeLa и HEK293T применяли систему CRISPR-Cas9. Анализ митохондриальной трансляции *in vivo* проводили методом радиоизотопного мечения и биоортогональной клик-химии. Эффективность митохондриального дыхания оценивали полярографически с помощью электрода Кларка и биоанализатора Seahorse XF. Взаимодействие белков анализировали методом ко-иммунопреципитации с последующим масс-спектрометрическим анализом, а их ассоциацию с рибосомами при помощи ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Структуру и активность дыхательных комплексов исследовали с помощью нативного электрофореза, иммуноблоттинга и постановки качественных реакций, а также спектрофотометрически. Биоинформатический анализ филогении ортологичных белков проводили с использованием стандартных биоинформатических подходов и программных пакетов.

1.7. Положения, выносимые на защиту

1) Нокаут гена белка человека ZMYND17 не приводит к нарушениям общего профиля митохондриальной трансляции, но вызывает дефекты функционирования цепи окислительного фосфорилирования. Человеческий белок ZMYND17 и его дрожжевой ортолог Mss51 имеют общее эволюционное происхождение, однако в ходе специализации приобрели функционально различные роли.

2) Белок человека SLIRP ассоциирован с малой субъединицей митохондриальной рибосомы. Отсутствие белка SLIRP подавляет трансляцию митохондриальных мРНК, кодирующих субъединицы цитохром с оксидазы.

3) Белок человека PTCD2 взаимодействует с ассоциированной митохондриальной рибосомой. Отсутствие белка PTCD2 приводит к угнетению дыхательной активности митохондрий и нарушению функций IV комплекса вследствие специфического снижения эффективности трансляции мРНК, кодирующей субъединицу COIII цитохром с оксидазы.

1.8. Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Результаты были представлены на всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 24-28 июля 2022 г.) и международной научной конференции «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Москва, 20-22 февраля 2025 г.), а также неоднократно обсуждались в ходе заседаний кафедры молекулярной биологии.

1.9. Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Список литературы. Рукопись содержит 10 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 146 источников.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Морфология митохондрий

Митохондрии представляют собой двумембранные органоиды клеток эукариот. Морфология митохондрий варьирует в зависимости от организма, типа клеток и их физиологического состояния. В одних клетках они представлены мелкими бобовидными структурами, хаотично распределенными в цитоплазме, в других — формируют удлиненные трубочки или единую разветвленную сеть, митохондриальный ретикулум. Кроме того, морфология митохондрий динамически меняется в зависимости от стадии клеточного цикла и в ответ на условия окружающей среды [20,21].

Митохондрии окружены двумя мембранами: наружной и внутренней, которые имеют различный состав и функции. Наружная мембрана имеет толщину около 70 Å и выполняет барьерную функцию. За счет наличия потенциал-зависимых анионных каналов (VDAC), также называемых поринами, через наружную мембрану возможна пассивная диффузия низкомолекулярных метаболитов массой менее ~5 кДа. Транспорт более крупных молекул требует активных механизмов и опосредуется разнообразными белками-транспортёрами широкой специфичности [22]. Наружная митохондриальная мембрана также формирует интерфейс для образования контактов с другими клеточными структурами, такими как эндоплазматический ретикулум, лизосомы, пероксисомы [23].

Внутренняя мембрана располагается на расстоянии 100–200 Å от наружной и ограничивает внутреннее пространство органеллы – митохондриальный матрикс. В некоторых участках наружная мембрана образует контакты с внутренней. В этих зонах взаимодействия происходит транспорт метаболитов и белков, закодированных в ядерной ДНК, также в них располагаются белки, регулирующие динамику митохондрий – слияние и деление [24].

Внутренняя мембрана проницаема для молекул O_2 , CO_2 , NH_3 и обладает высокой избирательной проницаемостью для некоторых других низкомолекулярных веществ. Для переноса других соединений, включая белки, необходимы специализированные транспортные системы. Поверхность внутренней мембраны увеличена за счет складчатых выступов – крист, имеющих трубчатую, пластинчатую и даже треугольную форму. На кристах располагаются комплексы, необходимые для осуществления митохондриального дыхания: цепь переноса электронов и АТФ-синтаза [25].

В матриксе протекают реакции репликации митохондриальной ДНК, транскрипции, биосинтеза белка и многочисленные ферментативные реакции [10].

2.2. Митохондриальные функции

Во внутренней мембране митохондрий локализована дыхательная цепь переноса электронов или электрон-транспортная цепь (ЭТЦ). ЭТЦ сформирована макромолекулярными трансмембранными белковыми комплексами, состоящими из множества субъединиц, и обеспечивает протекание окислительного фосфорилирования. Этот процесс обеспечивает полное окисление питательных веществ до конечных продуктов катаболизма: H_2O , NH_3 и CO_2 , сопровождаемое запасанием выделенной энергии в виде молекул АТФ. Электроны, перенесенные на восстановительные эквиваленты в процессе протекания гликолиза и цикла Кребса (НАДН и ФАДН₂), передаются по дыхательной цепи на финальный акцептор, атомарный кислород, восстанавливая его до воды [26].

У млекопитающих окислительные реакции осуществляются тремя комплексами. Комплекс I – НАДН-дегидрогеназа – катализирует перенос электронов с НАДН на убихинон. Комплекс III – цитохром-оксидоредуктаза – осуществляет окисление убихинола до убихинона, сопряженное с восстановлением цитохрома c. Комплекс IV – цитохром c оксидаза – обеспечивает финальную стадию окислительного процесса, опосредует перенос электронов с восстановленного цитохрома c на молекулярный кислород. За счет описанных реакций формируется протонный градиент на внутренней мембране митохондрий. Комплекс V – АТФ-синтетаза – использует мембранный потенциал для катализа синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Комплекс II – сукцинатдегидрогеназа – катализирует окисление сукцината до фумарата и восстановление убихинона до убихинола и не участвует в формировании градиента протонов [27].

АТФ-синтаза состоит из двух мультисубъединичных структурных элементов – F_1 , расположенного в митохондриальном матриксе, и F_o , локализованного во внутренней митохондриальной мембране. F_1 катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, что обеспечивается движением протонов через F_o из межмембранного пространства в матрикс [28].

Комплексы дыхательной цепи могут формировать структуры более высокого порядка, называемые суперкомплексами. Эти надмолекулярные структуры образованы комплексами I, III и IV различной стехиометрии. Содержащий все три перечисленных комплекса суперкомплекс называют респиромой, так как он является самостоятельной функциональной единицей ЭТЦ и обеспечивает транспорт электрона от донора до конечного акцептора, при этом формируя трансмембранный потенциал [29]. Наиболее часто обнаруживаемые суперкомплексы митохондрий человека имеют следующий состав: $\text{CI} + \text{CIII}_2 + \text{CIV}_n$, содержащие около половины всех НАДН-дегидрогеназных комплексов, и $\text{CI} + \text{CIII}_2$. Суперкомплексы также могут быть образованы без участия комплекса I ($\text{CIII}_2 + \text{CIV}_2$ или $\text{CIII}_2 + \text{CIV}$). Такие конфигурации

встречаются как у млекопитающих, так и пекарских дрожжей, у которых комплекс I отсутствует вовсе [30]. Функциональная роль суперкомплексов, предположительно, заключается в оптимизации активности отдельных комплексов за счет эффекта туннелирования субстрата. Эта гипотеза подразумевает непосредственный перенос электрона через убихинон и цитохром с между комплексами одной респирасомы без обмена переносчиков [30]. Формирование суперкомплексов также может минимизировать образование активных форм кислорода [31].

АТФ-синтаза не входит в состав суперкомплексов, однако часто образует димеры и олигомеры более высокого порядка, что обуславливается взаимодействием между двумя мономерами АТФ-синтазы через сектор F_o -субчастицы. Формирование ди- и олигомеров АТФ-синтазы обеспечивает более стабильную ассоциацию между структурными единицами (F_1 и F_o), по сравнению с мономером V комплекса [28]. Также олигомеризация комплекса V облегчает синтез АТФ и обеспечивает формирование крист. Димеризация АТФ-синтаз происходит под углом, относительно друг друга, за счет чего внутренняя мембрана митохондрий изгибается и инициируется образование выступа – кристы. На поверхности инвагинации, при этом, плотность заряда выше, чем на поверхности ровной мембраны при сохранении того же потенциала. Локально повышенная концентрация протонов обуславливает более эффективный синтез АТФ на вершине митохондриальных крист [32].

Таким образом, комплексы цепи переноса электронов образуют суперкомплексы различного порядка и локализуются на прямых участках митохондриальных крист, в то время как олигомеры АТФ-синтазы располагаются на их вершинах.

В результате окислительного фосфорилирования, проходящего на внутренней митохондриальной мембране у млекопитающих образуется более 80% всех энергетических эквивалентов, молекул АТФ [26]. Но производством энергии роль митохондрий не ограничивается. Митохондрии участвуют в метаболизме азота, метаболизируя глутамат, используемый в реакциях трансаминирования, и глутамин, служащий для переноса азота по всему организму. Также в этом компартменте протекает половина реакций цикла мочевины. Митохондрии необходимы для синтеза гема и железо-серных кластеров и поддержании гомеостаза кальция [33]. Митохондрии также необходимы для процессов программируемой клеточной гибели, активации врожденного иммунитета [34], детерминации стволовых клеток [35] и многих других.

2.3. Геном митохондрий

Митохондриальный геном претерпел значительную редукцию в сравнении со свободно живущим предком: часть генов бывшего эндосимбионта была утрачена, часть – перенесена в ядерный геном. Более того, некоторые гены, обеспечивающие поддержание митохондриальной репликации и транскрипции, имеют вирусное происхождение и кодируются ядерным геномом

[36]. Размеры и структура генома митохондрий варьируются в зависимости от организма и могут значительно различаться даже внутри филогенетической группы.

Геном митохондрий располагается в матриксе и может быть представлен как кольцевыми молекулами или линейными хромосомами, так и их комбинацией. Также геном может быть фрагментирован и состоять из гетерогенного набора хромосом и плазмидоподобных молекул различного размера и архитектуры [37].

В геноме митохондрий закодированы в основном белки, являющиеся субъединицами комплексов цепи окислительного фосфорилирования, рибосомные РНК и транспортные РНК. Реже мтДНК кодирует белки, вовлеченные в процессы импорта и созревания белков, процессинга тРНК, сборки комплексов ЭТЦ и некоторые другие [38].

Размер генома митохондрий варьируется от 6 тпн у некоторых представителей группы Apicomplexa до 11 мпн у цветковых растений.

При этом, число генов и белок кодирующих генов, в частности, в митохондриальной ДНК не всегда коррелирует с размером генома. Увеличение размеров мтДНК зачастую связано с наличием протяженных интронов, многочисленных межгенных некодирующих и повторяющихся последовательностей. Так, например, геномы митохондрий цветковых растений имеют длину более 200 тпн, при этом несут порядка 60-70 генов, из которых всего 25-40 кодируют белки [39,40]. У представителей группы Jakobid, при значительно меньшем размере генома митохондрий (порядка 69-100 тпн), обнаруживается вплоть до 68 белок-кодирующих генов [38] и до 100 функциональных генов всего (у *Andalucia godoyi*). Наименьшее количество генов в мтДНК характерно для представителей групп Apicomplexa и Dinoflagellata. Митохондриальные геномы этих организмов содержат 3 белок-кодирующих гена (*cox1*, *cox3* и *cob*) и 2 гена рРНК. Геном *Chromera velia* (Apicomplexa) претерпел еще большую редукцию в связи с утратой гена белка *cob* [41]. Размер митохондриального генома Dinoflagellata, при этом, составляет порядка 300 тпн, а Apicomplexa, в среднем, менее 12 тпн [42].

Ключевая роль митохондрий заключается в обеспечении клетки энергией посредством кислородного дыхания. Поэтому митохондрии организмов, живущих в анаэробных или микроаэрофильных условиях, часто преобразуются в различные митохондрия-подобные структуры, что сопровождается экстремальной редукцией митохондриального генома или его полной утратой. Такие митохондрия-подобные структуры описаны для некоторых протистов и грибов [43], а также для паразитического животного *Henneguya salminicola* (Cnidaria)[44].

По всей видимости, среди аэробных эукариот не существует примера организма, утратившего митохондриальный геном или митохондрии полностью. В 2019 году было выдвинуто предположение о том, что у паразитического простейшего, способного осуществлять митохондриальное дыхание, *Amoebophrya* sp. штамм AT5 (Syndiniales, Dinoflagellates),

отсутствует митохондриальная ДНК [45]. Однако, данное утверждение является спорным и существующие данные скорее свидетельствуют в пользу наличия крайне редуцированного генома [46].

Представители группы простейших *Oxymonadida* населяют исключительно бескислородные среды - желудочно-кишечный тракт многоклеточных организмов. По крайней мере некоторые представители данной группы утратили митохондрии и митохондрия-подобные структуры в процессе эволюции. Возможно, это характерно для всего таксона, но такое утверждение нуждается в дополнительных генетических исследованиях [47].

Существуют две гипотезы, ограничивающие полный перенос митохондриальных генов в ядерных геном при сохранении функциональной ЭТЦ. Согласно первой, транспорт митохондриальных белков между компартментами был бы осложнён их высокой гидрофобностью и необходимостью специфического фолдинга внутри мембраны органеллы. Вторая гипотеза предполагает необходимость быстрой адаптации синтеза компонентов ЭТЦ к изменяющимся условиям, в частности для предотвращения формирования активных форм кислорода [48].

У позвоночных животных митохондриальный геном отличается низкой вариабельностью в сравнении с другими таксономическими группами [49]. мтДНК представлена кольцевой молекулой, средняя длина которой составляет 14-20 тпн, и содержит 13 белок-кодирующих генов, 2 гена рРНК и 22 гена тРНК и 2 некодирующих элемента, участвующих в регуляции транскрипции и репликации. Более того, не только генный состав, но и порядок расположения кодирующих элементов чрезвычайно консервативен среди позвоночных, лишь с небольшим числом исключений (например, среди птиц, крокодилов и ящериц).

Различия в размере геномов митохондрий в основном связаны с размерами некодирующих регуляторных областей, а перестановки генов, относительно «стандарного» расположения происходят рядом с контрольными регионами и чаще касаются генов тРНК [50,51].

Геном митохондрий человека имеет длину 16569 пн и стандартный для позвоночных набор кодирующих и регуляторных элементов. Гены не содержат интронов. 13 митохондриально-закодированных белков транслируются с 11 мРНК. В мтДНК человека кодируются субъединицы всех комплексов ЭТЦ: 7 субъединиц НАДН-дегидрогеназы, комплекса I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), компонент цитохром с редуктазы, комплекса III (Cob1), 3 субъединицы цитохром с оксидазы, комплекса IV (COI, COII, COIII), и 2 субъединицы АТФ-синтазы, комплекса V (Atp6, Atp8). При этом, 9 транскриптов являются моноцистронными и 2 – бицистронными (мРНК ND4L/ND4 и ATP8/ATP6) с перекрывающимися открытыми рамками считывания [8].

Остальные 77 белков комплексов цепи окислительного фосфорилирования и другие необходимые для функционирования органеллы белки закодированы ядерным геномом, синтезируются в цитозоле клетки и транспортируются в митохондрию [52].

2.4. Митохондриальные рибосомы

Трансляционный аппарат митохондрий представлен миторибосомами, произошедшими от бактериальных рибосом предкового организма. Подобно другим рибосомам, митохондриальные рибосомы человека состоят из большой (39S) и малой (28S) субъединиц. Коэффициент седиментации митохондриальных мономеров человека – 55S. Длины рРНК малой и большой субъединиц миторибосомы человека составляют 954 (12S рРНК) и 1559 нт (16S рРНК), соответственно. Структурной частью большой субъединицы миторибосомы человека, замещающей отсутствующую 5S рРНК, также является валиновая или фенилаланиновая митохондриальная тРНК [53]. Снижение плавучей плотности миторибосомы по сравнению с цитоплазматическими аналогами связано с укорочением рРНК и увеличением количества белков, структурно и функционально замещающих утраченные элементы рРНК. В результате миторибосома имеет менее плотную структуру [52] при сохранении линейных размеров (около 32 нм в диаметре) [54,55]. Из 80 миторибосомных белков более 20% не имеют прокариотических гомологов и возникли в процессе эволюции органеллы [54,56]. Кроме того, многие белки, гомологичные бактериальным, имеют специфические для митохондрий С- и N-концевые удлинения [53].

Некоторые характерные черты миторибосом, отличающие их от бактериальных и эукариотических цитоплазматических аналогов, связаны со специализацией синтеза мембранных белков. Миторибосомы локализованы на внутренней мембране митохондрий, что позволяет осуществляться котрансляционной интеграции в липидную мембрану и фолдингу высокогидрофобных белков. У человека ассоциация осуществляется за счет белка большой субъединицы – mL45 [57]. Кроме того, mL45 формирует сужения выходного туннеля, что препятствует сворачиванию полипептида в нем, направляет пептидную цепь и позиционирует выход из туннеля на оптимальном расстоянии от внутренней митохондриальной мембраны, позволяя белку OXA1L направить полипептид далее в мембрану [58].

Особенности структуры миторибосом коррелируют с особенностями мРНК. Митохондриальные мРНК человека практически не имеют нетранслируемых областей. 5' нетранслируемая область может быть представлена 1-3 нуклеотидами, а может отсутствовать вовсе, и, соответственно, не имеет последовательности Шайна-Дальгарно. В следствие этого 3' конец 12S рРНК, включая анти-последовательность Шайна-Дальгарно, также претерпел редукцию [56].

Частью миторибосомы млекопитающих также являются железо-серные кластеры. Всего идентифицировано 3 железо-серных кластера, входящих в состав миторибосомы: два – в малой субъединице и один – в большой. Каждый из кластеров координируется парой белков и располагается на периферии миторибосомы. Железо-серные кластеры не только стабилизируют структуру миторибосомы, но и необходимы для корректной сборки миторибосомных субчастиц и моносомы, а также могут служить сенсорами окислительного стресса и адаптировать митохондриальную трансляцию к окислительному статусу клетки [4,5].

2.5. Транскрипция в митохондриях

Согласно исследованиям, на каждой цепи мтДНК млекопитающих в некодирующей области генома расположено по одному промотеру. Промотеры располагаются ближе к 5'-участку некодирующей области. При транскрипции образуются два первичных транскрипта, которые затем процессируются с образованием 11 зрелых мРНК, тРНК и рРНК. Кроме того, недавно был обнаружен второй промотер легкой цепи, находящийся на 3'-участке некодирующей области генома. Предполагается, что наличие второго промотера легкой цепи позволяет разделить процесс синтеза праймера, необходимого для репликации, и транскрипции генов легкой цепи мтДНК [59]. Также существуют данные, свидетельствующие о наличии второго промотера тяжелой цепи ДНК, однако его функциональная активность *in vivo* требует дополнительных исследований [60]. Разнообразные механизмы регуляции митохондриальной транскрипции, таким образом, могут оказывать воздействие только на общий уровень синтеза РНК, но не на экспрессию отдельных генов [60,61]. Основная же регуляция экспрессии происходит на этапе трансляции.

2.6. Трансляция в митохондриях

Долгое время считалось, что митохондриальная трансляция организована по прокариотическому типу, но это верно лишь отчасти. Молекулярные процессы, происходящие в митохондриях, включая трансляцию, действительно наиболее сходны с таковыми у бактерий, ввиду эндосимбиотического происхождения органелл. Но исследования последних лет убедительно продемонстрировали, что синтез белка в митохондриях имеет ряд уникальных черт и особенностей.

Наиболее важным с точки зрения модуляции экспрессии и лимитирующим этапом трансляции является инициация [62,63].

2.7. Инициация трансляции в митохондриях

Точкой начала синтеза белка является стартовый кодон. Хотя наиболее распространенным инициаторным кодоном во всех доменах жизни является AUG, альтернативные стартовые кодоны (такие как GUG, UUG, CUG, AUU и другие) также распространены и имеют подтвержденную в репортерных системах эффективность. Например, у *E. coli* 83% генов имеют AUG в качестве стартового кодона, 14% – GUG и 3% – UUG. Подобная частота встречаемости характерна для бактерий в целом [64]. Эффективность инициации трансляции со стартовых кодонов, отличных от AUG, варьируется в зависимости от организма и конкретного кодона. У *E. coli* эффективность трансляции с кодонов GUG и UUG составляет 10-15% и 1-3% с кодонов CUG, AUU, AUC, AUA и ACG от эффективности синтеза белка со стартового кодона AUG [65]. Более того, минорный уровень трансляции (0.0007-3% относительно AUG) регистрируется с 47 из 64 кодонов [66]. В митохондриях человека 4 из 13 открытых рамок считывания начинаются кодонами, отличными от AUG: мРНК ND2 содержит AUU-кодон в качестве инициаторного, мРНК ND1, ND3 и ND5 содержат AUA [67].

У бактерий, а также в митохондриях, стартовые кодоны распознаются специализированной инициаторной тРНК – аминоацилированной и формилированной метиониновой тРНК. У бактерий инициаторная и элонгационная тРНК кодируются различными генами, и формилированию подвергается только метионин, расположенный на инициаторном варианте метиониновой тРНК. В митохондриях млекопитающих, напротив, существует единственный ген, кодирующий метиониновую тРНК [68]. Эффективность инициации трансляции с различных стартовых кодонов коррелирует с их комплементарностью (силой wobble-взаимодействий) антикодону инициаторной тРНК (CAU), последовательность которого универсальна [66].

Помимо стартового кодона, у прокариот ключевым элементом, необходимым для инициации трансляции, является последовательность Шайна-Дальгарно. Она располагается на 5' нетранслируемом участке мРНК на небольшом расстоянии от стартового кодона. Взаимодействие анти-Шайна-Дальгарно последовательности рРНК малой субъединицы рибосомы с этим участком способствует корректному размещению рибосомы на мРНК и образованию инициаторного комплекса. Инициация трансляции с безлидерных мРНК у бактерий встречается значительно реже и осуществляется моносомой (70S рибосомой) [63]. При этом безлидерная инициация возможна преимущественно с кодона AUG, но не с других встречающихся стартовых кодонов (например, GUG, UUG и CUG). По всей видимости, такая избирательность связана не со специфичностью взаимодействия кодона с антикодоном, а с другими механизмами [69].

В инициации трансляции прокариот принимают участие три фактора: IF1, IF2 и IF3. IF3 связывается с малой субъединицей рибосомы, что препятствует ассоциации рибосомных субъединиц. Первый фактор инициации трансляции, IF1, образует контакты с основаниями мРНК в А-сайте рибосомы, блокируя сайт для инициаторной тРНК и направляя ее в Р-сайт. IF2 опосредует попадание в Р-сайт инициаторной тРНК (аминоацилированной и формилированной метиониновой тРНК) в присутствии мРНК. IF3 стабилизирует инициаторную тРНК в Р-сайте и способствует диссоциации тРНК при некомплементарном взаимодействии кодона с антикодоном. Так образуется преинициаторный комплекс, включающий три фактора инициации трансляции, мРНК, инициаторную тРНК в Р-сайте и малую рибосомную субъединицу. Затем факторы IF1 и IF3 диссоциируют, а IF2 катализирует присоединение большой субъединицы рибосомы, после чего также высвобождается из комплекса [70].

При этом, связывание инициаторной тРНК индуцирует IF3-опосредованные конформационные изменения в 16S рРНК. Благодаря этому, консервативные основания рибосомальной РНК распознают G-C пары в стебле антикодоновой петли инициаторной метиониновой тРНК, что предотвращает присоединение элонгационной тРНК на стадии инициации [71]. Дискриминация неканонических (не AUG, GUG и UUG) стартовых кодонов обеспечивается консервативным мотивом 129RFRGR133 в С-концевом домене IF3: остаток R131 в этом мотиве взаимодействует с нуклеотидами +2U и +3G стартового кодона, способствуя точному узнаванию AUG-кодона [72].

Присутствие факторов инициации IF1 и IF2 необязательно для протекания инициации трансляции с безлидерных мРНК, но оказывает стимулирующее воздействие на этот процесс. IF3 также не является необходимым, более того, высокая концентрация IF3 ингибирует трансляцию с некоторых безлидерных мРНК. В условиях *in vitro* было показано, что высокая концентрация инициаторной тРНК значительно усиливает эффективность инициации трансляции безлидерных матриц и может снижать потребность в IF1 и IF2 [73]. Эффект факторов инициации, тем не менее, не является универсальным и во многом зависит от последовательности мРНК и организма [73,74].

Как было упомянуто, стартовый кодон мРНК в митохондриях млекопитающих располагается на самом 5' конце или на расстоянии 1-3 нуклеотидов от него. Было показано, что на безлидерных митохондриальных мРНК инициация может осуществляться также моносомой – 55S рибосомой. Наиболее стабильный комплекс с малой субъединицей миторибосомы образует мРНК COI. Авторы связывают это с наличием 5' лидерной последовательности, состоящей из 3 нуклеотидов (в то время как у остальных транскриптов эти участки 0-2 нуклеотида длиной), которая взаимодействует с белком uS7m 28S субъединицы [8]. Однако, согласно другим работам, 28S субъединица миторибосомы млекопитающих также способна иницировать трансляцию

[75]. Имеющиеся сведения позволяют предположить существование альтернативных путей инициации трансляции: непосредственно моносомой или через образование тройственного комплекса. Также различия в наблюдениях могут объясняться вариабельностью экспериментальных условий *in vitro*: концентрацией отдельных компонентов системы и их природой [76].

Согласно последним данным, 5'-участки большинства мРНК в митохондриях млекопитающих не структурированы: по крайней мере 40 нуклеотидов после стартового кодона не формируют стабильных вторичных структур. Исключение составляют транскрипты COII, Atp6 и Atp8. Шпильки, образованные мРНК COII и ATP8, располагаются на расстоянии 16 и 21 нт, соответственно, от стартового кодона. Эти структуры, предположительно, замедляют движение рибосомы, облегчая узнавание сайта инициации трансляции. мРНК Atp6 представляет собой второй цистрон бицистронного транскрипта Atp8/6. 3'-конец рамки считывания Atp8, при этом, на 46 нуклеотидов перекрывается с 5'-концом рамки считывания Atp6. Стартовый кодон Atp6 может входить в состав шпильки. Вероятно, такая вторичная структура координирует переход рибосомы от синтеза Atp8 к инициации трансляции Atp6 с запрограммированным сдвигом рамки считывания -1. В отсутствие шпильки рибосома беспрепятственно завершит синтез полноразмерного Atp8, в то время как образование вторичной структуры вблизи стартового кодона мРНК Atp6 приведет к замедлению миторибосомы. В случае индуцированного шпилькой сдвига рамки считывания, синтезируется укороченный вариант Atp8, а благодаря рециклизации произойдет инициация трансляции Atp6, сопровождающаяся релаксацией вторичной структуры. Таким образом, абортный синтез Atp8 способствует инициации трансляции Atp6, что, в свою очередь, облегчает последующее образование полноразмерного Atp8 [77]. Отметим, что аналогичных структур во второй бицистронной мРНК, ND4L/4, не обнаружено [77].

Инициация трансляции в митохондриях человека осуществляется при помощи всего двух факторов: mtIF2 и mtIF3, гомологичных IF2 и IF3 прокариот, соответственно.

Второй фактор инициации трансляции наиболее консервативен среди всех организмов. Тем не менее, mtIF2 имеет характерные особенности, коррелирующие с другими уникальными чертами митохондриальной трансляции. mtIF2 содержит специфический для митохондрий млекопитающих линкерный домен длиной 37 аминокислот. Этот домен формирует альфа-спираль, которая блокирует декодирующий центр, А-сайт миторибосомы, таким образом функционально замещая отсутствующий IF1. Линкер не взаимодействует с мРНК напрямую, но приводит к конформационным изменениям рибосомы, в результате препятствуя скольжению мРНК в составе инициаторного комплекса. мтДНК млекопитающих кодирует единственную метиониновую тРНК, при этом mtIF2 ответственен за узнавание именно формилированного метионина, что позволяет отличить инициаторную и элонгационную тРНК [78]. Фактор

инициации mtIF2 необходим для инициации трансляции у млекопитающих как *in vivo*, так и *in vitro* [8].

По сравнению с бактериальным митохондриальный IF3 имеет меньшую конформационную подвижность будучи связанным с малой субъединицей митоторибосомы. mtIF3 содержит характерные для митохондрий удлинения С- и N-концевых доменов. Эти удлинения блокируют консервативные межсубъединичные контакты, что предотвращает преждевременное формирование моносомы и препятствует присоединению инициаторной тРНК [79]. Присоединение большой субъединицы митоторибосомы к малой в составе инициаторного комплекса, таким образом, возможно лишь после диссоциации третьего фактора инициации. Тем не менее, mtIF3 обладает дискриминирующей активностью по отношению к не инициаторным тРНК. Аналогично бактериальному IF3, mtIF3 способствует конформационной перестройке рРНК малой субъединицы митоторибосомы и ее взаимодействию с консервативными тремя G-C парами в стебле антикодоновой петли инициаторной тРНК. Однако, консервативный бактериальный мотив 129RFRGR133 в митохондриальном аналоге IF3 заменён на 163KKGK166. Такой мотив имеет меньшее сродство к основаниям, формирующим пару кодон-антикодон, за счет чего облегчает инициацию трансляции с неканонических старт-кодонов (AUA и AUU) [76].

Присутствие mtIF3 не является необходимым для синтеза белка в митохондриях млекопитающих в общем, что характерно и для безлидерной инициации прокариот [8]. Тем не менее было показано, что трансляция Atp6 зависит от наличия mtIF3. При нокауте гена третьего фактора инициации митохондриальной трансляции наблюдается значительное уменьшение количества новосинтезируемого Atp6 [7]. Вероятно, в отсутствие mtIF3 не происходит реинициации трансляции с внутреннего стартового кодона Atp6 и, соответственно, расплетания шпильки, препятствующей синтезу полноразмерного Atp8 [77].

2.8. Регуляция митохондриальной трансляции

Сборка комплексов дыхательной цепи требует высоко скоординированной экспрессии генов обоих геномов, митохондриального и ядерного. В совокупности с необходимостью точного баланса синтеза отдельных субъединиц комплексов ЭТЦ, вышеописанная схема транскрипции, созревания мРНК и инициации трансляции, подразумевает наличие других регуляторных механизмов. Такая система контроля описана для пекарских дрожжей группы *Saccharomyces* и представлена трансляционными активаторами.

2.9. Трансляционные активаторы дрожжей

Регуляция митохондриальной трансляции отдельных полипептидов у дрожжей осуществляется белками, называемыми трансляционными активаторами. Трансляционные активаторы закодированы ядерным геномом, транслируются в цитоплазме и затем

транспортируются в митохондрии. Каждый такой активатор ответствен за синтез единственного закодированного в мтДНК белка и может иметь как стимулирующую, так и снижающую эффективность синтеза активность. Важно отметить, что мРНК в митохондриях дрожжей имеют протяженные 5' нетранслируемые области и большинство трансляционных активаторов взаимодействуют именно с 5'-НТО. Часть активаторов ассоциированы с внутренней митохондриальной мембраной и участвуют в ко-трансляционной интеграции новосинтезированных белков в мембрану и сборке комплексов. Некоторые активаторные белки связываются с миторибосомами и продуктами митохондриальной трансляции. Различные механизмы действия трансляционных активаторов направлены на координацию синтеза и сборки комплексов ЭТЦ, регулируют баланс синтеза ядерно и митохондриально кодируемых белков [9].

Часто синтез отдельных митохондриально кодируемых субъединиц дыхательных комплексов зависит от сборки комплексов через петлю обратной связи, а также требует активности нескольких белков. Такой механизм регуляции трансляции показан, например, для белков Cox1, COB и Atp6. Синтез Cox1 модулируется тремя активаторами – Mam33, Pet309 и Mss51, а также хеликазой Mss116. Механизм, лежащий в основе активации трансляции Cox1 белком Mam33, остается не изучен. Показано, что Mam33 необходим для синтеза Cox1 при адаптации к дыхательному росту по окончании стадии сбраживания [80]. Также Mam33 участвует в координации сборки миторибосом [81]. Mss51 и Mss116 связываются с миторибосомой до присоединения мРНК Cox1, а Pet309 при этом постоянно взаимодействует с миторибосомой. После привлечения мРНК хеликаза релаксирует вторичные структуры мРНК Cox1, а Mss51 способствует изменению конформации Pet309. В активной конформации Pet309 связывает 5'-НТО и обеспечивает корректное позиционирование рибосомы на стартовом кодоне мРНК. Mss51 напрямую не связывается с 5'-НТО [82], но необходим для элонгации биосинтеза Cox1 (предполагается его взаимодействие с новосинтезируемым пептидом и/или с кодирующей областью мРНК Cox1), и также взаимодействует с новосинтезированным Cox1, стабилизируя его в комплексе с факторами сборки. Таким образом, только по окончании сборки цитохром c оксидазного комплекса Mss51 диссоциирует из комплекса и может активировать новый раунд синтеза Cox1 [83,84]. Аналогично функционируют активаторы трансляции цитохрома b – Cbs1 и Cbs2. Эти белки взаимодействуют как с 5'-НТО COB, так и с большой субъединицей миторибосомы дрожжей поблизости от выходного туннеля. Димер Cbs1 и Cbs2 связывает цитохром b и остается ассоциирован до окончания сборки комплекса. Закодированные в митохондриальном геноме дрожжей субъединицы АТФ-синтетазы, Atp6 и Atp8, являются частью субкомплекса F₀. В отсутствие F₁ активность F₀ как протонной помпы приведет к разобщению, то есть снижению митохондриального потенциала. Поэтому трансляция Atp6 и

Atp8 протекает эффективно только в присутствии свободного F_1 , что опосредуется трансляционным активатором Atp22 [85].

2.10. PPR-белки

Многие трансляционные активаторы дрожжей принадлежат к семейству белков, содержащих пентатрикопептидные повторы (PPR-мотивы). PPR мотивы относятся к крупной группе альфа-солоноидных повторяющихся структур. PPR-белки в основном функционируют в органеллах: митохондриях и хлоропластах. При этом PPR-мотивы обладают РНК-связывающей активностью, что обуславливает их роль в пост-транскрипционных процессах, таких как сплайсинг и редактирование РНК, гидролиз РНК и трансляция. Подавляющее большинство (порядка 90%) таких белков обнаружены у зеленых растений [86].

В геноме пекарских дрожжей закодировано по крайней мере 15 белков, содержащих PPR-мотивы. Все они локализуются в митохондриях и участвуют в регуляции экспрессии митохондриально кодируемых генов на посттранскрипционном уровне [87].

Первичная структура типичного PPR-мотива является вырожденной консенсусной последовательностью и состоит из 35 аминокислот. Мотив может быть тандемно повторен вплоть до 30 раз. Структурно пентатрикопептидный повтор образован двумя антипараллельными альфа-спиралями и представляет собой классический мотив спираль-поворот-спираль. Повторяющиеся PPR-мотивы формируют суперспираль в форме полумесяца или туннеля, где внутренняя поверхность (или бороздка) несет положительный заряд и непосредственно может взаимодействовать с РНК [88], причем такое взаимодействие оказывается последовательность-специфичным. Один повтор мотива узнает и связывает определенный нуклеотид РНК, в зависимости от комбинации аминокислот, располагающихся в трёх ключевых позициях мотива. Полноценный белок, будучи «составленным» из отдельных мотивов-модулей, узнает конкретную последовательность РНК, совпадающую по длине с количеством PPR-элементов [89,90]. Для некоторых определенных PPR-мотивов был изучен и расшифрован «код», согласно которому происходит узнавание конкретных нуклеотидов. То есть, определен контекст аминокислот, при наличии которого повтор связывает те или иные основания РНК. Тем не менее, как было упомянуто, последовательности мотивов являются вырожденными, поэтому для большинства PPR-белков сайты узнавания неизвестны [90].

2.11. PPR-белки человека

У человека известно всего 7 PPR-белков. Все они закодированы ядерным геномом, обнаруживаются в митохондриях, однако, некоторые могут быть также локализованы в ядре. PPR-белки играют различные роли в регуляции экспрессии митохондриальных генов на разных этапах: участвуют в транскрипции, процессинге РНК и трансляции.

К PPR-белкам человека относится митохондриальная РНК-полимераза POLRMT. POLRMT содержит всего 2 PPR-мотива, функция которых не вполне ясна. Предполагается, что они могут участвовать в белок-белковых взаимодействиях и в направлении цепи синтезируемой РНК. Также в состав митохондриального комплекса РНКазы Р, участвующего в процессинге транскриптов, входит белок MRPP3, содержащий PPR домен. Домен включает всего 5 PPR- и PPR-подобных мотивов (2 из которых – канонические). Функция PPR-мотивов, вероятно, заключается в специфическом узнавании тРНК [14]. Белок человека PTCD1 содержит 8 пентатрикопептидных повторов и взаимодействует с лейциновой тРНК, в том числе с незрелыми транскриптами, содержащими непротрансценсированную тРНК. Показано, что PTCD1 регулирует количество тРНК, но не участвует в процессинге транскриптов и трансляции [15].

Известны два PPR-содержащих белка млекопитающих, mS27 и mS39, которые являются компонентами малой субъединицы митоторибосомы. mS27 содержит 6 пентатрикопептидных повторов и связывается с 12S рРНК и глутаминовой тРНК, но не участвует в процессинге РНК и не регулирует количество транскриптов и тРНК, равно как и их стабильность в митохондриях. При нокдауне гена mS27 на третьи сутки значительно уменьшается эффективность трансляции COI, на девятые – также уменьшается количество COII и ядерно кодируемого белка Cox4. Количество комплексов ЭТЦ и активность цитохром с оксидазы снижается на 9-е сутки нокдауна гена mS27. Таким образом, mS27 регулирует активность комплексов дыхательной цепи за счет модуляции трансляции отдельных белков [16]. Белок mS39 (PTCD3) также ассоциирован с 12S рРНК и не влияет на количество и стабильность митохондриальных транскриптов. При нокдауне гена mS39 снижается эффективность синтеза закодированных мтДНК полипептидов и активность цитохром с-оксидоредуктазы и цитохром с оксидазы. Согласно структурным данным, mS39 располагается на периферии входного тоннеля мРНК. Предполагается, что mS39 взаимодействует с урацил-богатым участком мРНК. Такие урацил-богатые последовательности, расположены на 5'-конце мРНК, после 7-го кодона, и соответствуют кодонам гидрофобных аминокислот, имеющим урацил во второй позиции [78].

В митохондриях млекопитающих функционируют еще два белка, содержащие пентатрикопептидные повторы: LRPPRC и PTCD2. LRPPRC функционально тесно связан с белком SLIRP.

2.12. LRPPRC и SLIRP

LRPPRC может быть локализован в различных клеточных компартментах, включая ядро, митохондрии и эндоплазматический ретикулум, и образует комплексы с белками различных функций. LRPPRC включает 23 PPR-мотива, что указывает на его роль в метаболизме РНК [91]. LRPPRC является гомологом трансляционного активатора Cox1 пекарских дрожжей Pet309, но, как будет описано далее, функционально ему не комплементарен [85].

SLIRP – небольшой белок (~12 кДа), известен в первую очередь взаимодействием с РНК-активатором ядерных стероидных рецепторов (SRA). Ядерные рецепторы функционируют как лиганд-зависимые транскрипционные активаторы: связывая стероиды, ретиноиды или некоторые другие молекулы, обретают сродство к определенным последовательностям ДНК. Комплекс ДНК с ядерным рецептором затем привлекает другие ко-регуляторы, активирующие или подавляющие транскрипцию целевых генов в ответ на действие гормонов [92]. РНК-активатор стероидных рецепторов – длинная некодирующая РНК, усиливающая транскрипцию генов, зависящих от стероидных рецепторов; единственный известный РНК-корегулятор ядерных рецепторов. Возможно, SRA формирует каркас для связывания других корегуляторов. РНК-активатор стероидных рецепторов имеет сложную вторичную структуру с множеством петель. С самой крупной из них, петель 7, связывается белок SLIRP. Взаимодействие SLIRP с РНК обусловлено наличием РНК-связывающего домена, включающего два субмотива. Также SLIRP имеет сигнал митохондриальной локализации и большая часть этого белка обнаруживается в митохондриях [93].

Согласно данным биоинформатического анализа, белок LRPPRC является ортологом белка дрожжей Pet309 – трансляционного активатора COX1. LRPPRC в митохондриях образует комплекс с белком SLIRP в виде гетеродимера. LRPPRC способствует корректному фолдингу мРНК, взаимодействуя как со структурированными, так и с линейными формами мРНК, облегчает протекание пост-транскрипционных реакций. Как следствие, комплекс LRPPRC-SLIRP регулирует эффективность трансляции закодированных мтДНК полипептидов [77].

LRPPRC-SLIRP ко-транскрипционно связываются с мРНК и препятствуют ее последующей деградации. На стабильность тРНК и транскрипцию, при этом, влияния не оказывает ни один из белков комплекса. Образую РНК-зависимый комплекс, LRPPRC-SLIRP обеспечивает стабильность мРНК в митохондриях (за исключение мРНК ND6) [19,94]. Также LRPPRC необходим для полиаденилирования митохондриальных мРНК (кроме мРНК ND6, которая не подвергается полиаденилированию в норме): в его отсутствие длина полиаденинового тяжа снижается. Вероятно, LRPPRC стабилизирует комплекс мРНК и митохондриальной полиА-полимеразы, обеспечивая эффективное протекание полиаденилирования [95]. Роли SLIRP в поддержании полиаденилировании продемонстрировано не было [96].

Последние данные предполагают участие комплекса LRPPRC-SLIRP в реинициации синтеза белка Atp6 с внутреннего стартового кодона бицистронного транскрипта Atp8/6. При нокауте *LRPPRC* снижается структурированность мРНК Atp8/6. Возможно, комплекс LRPPRC-SLIRP способствует взаимодействию малой миторибосомной субъединицы с мРНК в 5' области от стартового кодона Atp6.

Стабильность и количество мРНК в митохондриях влияют на количество синтезируемых белков. Этот факт осложняет анализ роли белков, функционирующих как РНК-шапероны непосредственно в регуляции эффективности трансляции.

В ряде работ была продемонстрирована разбалансировка эффективности синтеза митохондриально кодируемых белков при нокауте *LRPPRC* [18,95]. Однако, при нормировке количества новосинтезированных белков на количество их транскриптов, снижение уровня трансляции отдельных полипептидов оказалось менее значительным, чем предполагалось изначально. В частности, эффективность синтеза COI и COII снижаются более чем в 2 раза, COIII – сохраняется на уровне, характерном для дикого типа. Эффективность трансляции субъединицы НАДН-дегидрогеназного комплекса, ND6, напротив, увеличивается более чем в 2 раза.

SLIRP стабилизирует LRPPRC и защищает его от деградации протеазами матрикса. Снижение количества LRPPRC в ответ на нокаут *SLIRP* оказывается тканеспецифическим. В отсутствие SLIRP также наблюдается уменьшение количества стабильных мРНК и разбалансировка митохондриальной трансляции. Эти эффекты разнятся в зависимости от исследуемой ткани и могут быть связаны со снижением количества LRPPRC. Исследователи также предполагают наличие неизвестных тканеспецифических механизмов компенсации дефектов синтеза белка в митохондриях [96]. Стабильность SLIRP также зависит от возможности взаимодействия с LRPPRC. Мутации аминокислот в ключевых для образования гетеродимера позициях ведут к уменьшению количества как SLIRP, так и LRPPRC [97].

Учитывая снижение количества мРНК в проанализированных тканях, существующие данные не позволяют оценить непосредственную роль SLIRP в регуляции синтеза белка.

Последние данные криоэлектронной микроскопии демонстрируют участие комплекса LRPPRC-SLIRP в привлечении мРНК к митоторибосоме. LRPPRC взаимодействует с малой субъединицей митоторибосомы в области входного туннеля мРНК через белки mS31 и mS39 [18]. LRPPRC и митоторибосомные белки mS31 и mS39 образуют коридор, опосредуя направление мРНК в каталитический центр митоторибосомы. Наружная часть этого коридора сформирована белком SLIRP. SLIRP связан с LRPPRC, не образуя контактов с митоторибосомными белками напрямую. При этом консервативный РНК-связывающий домен SLIRP оказывается обращен к мРНК и способен взаимодействовать с ней. Таким образом, ключевая роль в привлечении мРНК к рибосоме, согласно данным криоэлектронной микроскопии, принадлежит SLIRP.

Анализ литературы позволяет предположить, что прямые функции LRPPRC могут ограничиваться стабилизацией нетранслируемой мРНК и обеспечением взаимодействия SLIRP с митоторибосомой. Влияние же на трансляцию конкретных транскриптов осуществляется опосредованно за счет разбалансировки количества мРНК и дестабилизации взаимодействия

SLIRP с инициаторным комплексом. Соответственно, именно роль SLIRP оказывается ключевой для регуляции инициации синтеза белка.

Таким образом, комплекс LRPPRC-SLIRP необходим для поддержания стабильного резерва нетранслируемых мРНК, созревания мРНК и привлечения мРНК к рибосоме, что обуславливает его универсальную роль как регулятора экспрессии. Наше исследование, результаты которого изложены ниже, помогает пролить свет на индивидуальную роль SLIRP в специфической регуляции инициации митохондриальной трансляции.

2.13. PTCD2

Белок PTCD2, согласно биоинформатическому анализу, содержит 5 пентатрикопептидных повторов и локализуется в митохондриях. Молекулярная масса PTCD2 составляет приблизительно 44 кДа. Хотя наличие РНК-связывающих PPR-мотивов позволяет подразумевать участие PTCD2 в регуляции экспрессии закодированных мтДНК генов, до недавнего времени про функции PTCD2 в митохондриях было известно немного.

На мышинной модели нокаут *PTCD2* приводил к тканеспецифичным нарушениям митохондриального дыхания. В сердце наблюдалось значительное снижение активности цитохром с оксидоредуктазы (комплекса III), менее явное – в печени и почках. В мышечной ткани активность комплекса III не ослабевала вовсе. Активность цитохром с оксидазы, напротив, повышалась в печени, мышечной и сердечной ткани, но не изменялась относительно дикого типа в почках. Также нокаут *PTCD2* приводил к нарушению созревания мРНК CytB. Однако, в рамках данной модели нокаут затрагивал лишь 9 и 10 экзоны гена белка, в результате чего экспрессировалась укороченная версия PTCD2. Таким образом, был описан фенотип замены полноценного PTCD2 его искусственной изоформой [17].

В рамках представляемой работы было изучено влияние полного нокаута гена *PTCD2* на митохондриальные функции и показана роль PTCD2 в биосинтезе белка в митохондриях клеток человека. Результаты исследования представлены ниже.

2.14. Трансляционные активаторы в митохондриях человека

У млекопитающих обнаружены гомологи некоторых трансляционных активаторов дрожжей, однако активности активаторов они не проявляют. Вероятно, регуляторные механизмы экспрессии белка в митохондриях млекопитающих устроены иначе. До сих пор для млекопитающих был известен единственный активатор трансляции – TACO1, контролирующий синтез COI.

TACO1 – РНК-связывающий белок, содержит 3 домена различной структуры. TACO1 взаимодействует с аденин-гуанин-богатыми последовательностями мРНК COI, благодаря положительно заряженному домену. Поскольку большая часть таких мотивов расположено

ближе к 5'-концу мРНК, предполагается, что TACO1 участвует в инициации или ранних этапах элонгации. TACO1 также ассоциирован с миторибосомой (28S субъединицей и 55S, в меньшей степени), но не участвует в привлечении к ней мРНК, а, вероятно, стимулирует трансляцию COI. В отсутствие трансляционного активатора значительно снижается эффективность синтеза COI, а также количество и активность комплекса IV [10].

2.15. ZMYND17

Белок ZMYND17 человека является ортологом белка Mss51 *S. cerevisiae* и содержит домен MYND, относящиеся к суперсемейству TRASH (Pfam ID: CL0175). Суперсемейство объединяет домены, содержащие консервативные остатки цистеина, включая домены типа «цинковый палец», такие как zf-Mss51 (Pfam ID: PF13824) и zf-MYND (Pfam ID: PF01753), характерные для белка дрожжей Mss51 и белка человека ZMYND17, соответственно.

В гидрофильном участке N-концевого домена белка Mss51 были обнаружены два цистеин-пролиновых мотива (Cys-Pro-X), связывающие гем [98]. Гем может являться конститутивным кофактором многих белков (простетической группой), необходимых для хранения и транспорта кислорода (гемоглобин, миоглобин), митохондриального дыхания (цитохром c), метаболизма различных молекул (гемосодержащие пероксидазы, каталазы) и контроля окислительного статуса клетки и связанного с ним сигналинга (растворимая гуанилатциклаза) [99]. Гем также может быть самостоятельной сигнальной молекулой, так как его синтез зависит от наличия кислорода. В ответ на изменение количества кислорода гем связывается с регуляторными белками, таким образом влияя на различные молекулярные процессы. Например, у дрожжей, связывая гем, Nar1 активирует транскрипцию генов, необходимых для дыхания и контроля окислительного стресса и а также некоторых других генов, связанных с аэробными условиями, и приводит к репрессии транскрипции генов гипоксии [100]. HCI – гем-зависимая киназа, которая в отсутствие гема инактивирует eIF2α эукариот, приводя к глобальному ингибированию цитоплазматической трансляции у млекопитающих [101]. У человека и дрожжей четыре из восьми ферментативных реакций, необходимых для синтеза гема, происходят в митохондриях. Гем связывается с регуляторными белками, таким образом влияя на транскрипцию, трансляцию и сборку белков (см. ниже) [102,103]. Связывание в таком случае опосредовано гем-связывающими цистеин-пролиновыми мотивами. Показано, что такие мотивы Mss51 связывают гем В как *in vitro*, так и *in vivo*. Предполагается, что взаимодействие с гемом необходимо для эффективной активации трансляции Cox1 белком Mss51. Связывание гема В сигнализирует как о доступности кислорода в среде и возможности осуществления митохондриального дыхания, так и о доступности субстрата для синтеза гема А, ключевой простетической группы цитохром c оксидазы, и таким образом координирует синтез отдельной субъединицы (Cox1) и сборку IV

комплекса в целом. Белок млекопитающих ZMYND17, несмотря на гомологию с Mss51, по всей видимости не содержит гем-связывающие мотивы [98].

У мышей и человека наиболее активная экспрессия гена *ZMYND17* отмечена в скелетной мускулатуре. У мышей уровень экспрессии гена этого белка особенно высок в мышцах гликолитического типа. Как и Mss51, ZMYND17 локализован в митохондриях [11]. В культуре мышечных клеток, дифференцировавшихся в миелобласты и образовавших миотубулу, отсутствие *Zmynd17* приводит к усилению клеточного метаболизма, что выражается в увеличении продукции АТФ, интенсификации гликолиза и митохондриального дыхания [11]. Аналогичные результаты были получены *in vivo*. В скелетных мышцах мышей при нокауте гена *Zmynd17* катаболизм глюкозы и жирных кислот происходит интенсивнее, чем в норме, а скорость поглощения кислорода выше, чем в мышцах мышей дикого типа. Нокаутная линия мышей также была устойчива к увеличению массы тела, индуцируемому диетой. Морфология митохондрий при этом не была нарушена [12]. Согласно другой работе, митохондрии мышечной ткани мышей, нокаутных по гену *Zmynd17*, характеризуются дефектной морфологией, уменьшением количества комплексов ЭТЦ и снижением эффективности дыхания. Метаболический стресс у мышей нокаутной линии усиливает митохондриальную дисфункцию [13].

Таким образом ZMYND17 предположительно является глобальным модулятором метаболизма и имеет другие функции, нежели дрожжевой Mss51, несмотря на гомологию белков и митохондриальную локализацию. В своей работе мы изучили влияние отсутствия ZMYND17 на эффективность митохондриальной трансляции, активность отдельных комплексов ЭТЦ и дыхания в целом в клетках человека, а также проследили эволюционную историю ZMYND17 и Mss51.

2.16. Митохондриальные заболевания

Функции митохондрий интегрированы в различные аспекты метаболизма эукариотической клетки. В этом компартменте протекают реакции цикла трикарбоновых кислот, глюконеогенеза и цикла мочевины, биосинтеза железо-серных кластеров, гема и фосфолипидов, осуществляются финальные реакции окисления питательных веществ и производится энергия в виде молекул АТФ. В процессе эволюции митохондрии стали необходимыми для жизнедеятельности отдельных эукариотических клеток и организма в целом. Митохондриальные заболевания могут быть следствием мутаций как ядерного генома, так и мтДНК, а дефекты – затрагивать различные аспекты митохондриальных функций. Митохондриальные заболевания гетерогенны, могут проявляться в разном возрасте и характеризуются разнообразной симптоматикой [104].

Например, нарушения синтеза гема приводят к различным видам порфирии – тяжелым, чаще всего наследственным заболеваниям [105]. Дефекты протекания цикла Кребса и

глюконеогенеза часто сказываются на функциях нервной системы и приводят к нейродегенеративным заболеваниям и молочнокислому ацидозу [106].

Атаксия Фрейдриха – истощение железо-серных кластеров, на молекулярном уровне приводит к дефектам сборки миторибосом человека, нарушению трансляции и, как следствие, снижению митохондриального дыхания [107].

В литературе под митохондриальными заболеваниями обычно понимают расстройства, связанные так или иначе с дисфункцией цепи окислительного фосфорилирования. Нарушения митохондриального дыхания могут быть следствием мутаций непосредственно в генах субъединиц комплексов ЭТЦ, факторов сборки, регуляторов трансляции и миторибосомных белков, белков, участвующих в метаболизме РНК и ДНК.

Распространенными формами митохондриальных заболеваний являются энцефаломиопатии, поскольку именно нервная система и скелетная мускулатура наиболее чувствительны к дефектам работы ЭТЦ [108]. При этом, различные нарушения на биохимическом и молекулярном уровне зачастую приводят к сходным фенотипам на уровне организма. Например, наиболее часто встречающимся синдромом, возникающим в детском возрасте, является синдром Лея, известный также как подострая некротизирующая энцефаломиопатия. Синдром Лея может возникать в результате одиночных мутаций в более чем 75 различных генов, как ядерных, так и митохондриальных [104]. Данное заболевание, в числе прочего, развивается в результате мутаций генов белков TACO1 [109], LRPPRC [91] и mS39 [110]. Известны патогенные мутации гена *SLIRP*, приводящие к митохондриальной энцефаломиопатии в результате дисфункции цепи переноса электронов [111].

Мутации в гене белка mtIF2 могут вызывать патологическую гипертрофию миокарда при ожирении и в пожилом возрасте у мышей; мутации в гене, кодирующем mtIF3, ассоциированы с кардиомиопатией, ожирением и болезнью Паркинсона [112]. Фенотип на уровне организма, возникающий при некоторых дефектах ключевых для биосинтеза белка генов или их конститутивном нокауте или нокдауне, может приводить к эмбриональной летальности и не поддается изучению. В следствие этого, например, изучение патологий, связанных с дисфункцией mtIF3, проводилось на мышинных моделях при тканеспецифичном условном нокауте этого фактора инициации трансляции [113].

На настоящий момент известно более 400 различных генов, мутантные формы которых ассоциированы с митохондриальными заболеваниями [114]. Но высокая гетерогенность симптоматики, недостаток биохимических и молекулярных сведений и редкость отдельных мутаций пока не позволили разработать терапию митохондриальных болезней [104].

Большая часть патологий связана с дефектами митохондриальной трансляции: мутациями генов субъединиц комплексов дыхательной цепи, тРНК и рРНК, белков миторибосом, факторов

трансляции и многих других белков, регулирующих митохондриальную экспрессию на разных этапах. Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов, лежащих в основе функционирования митохондрий, причины многих митохондриальных заболеваний, сопровождающихся дефектами ЭТЦ, до сих пор остаются неизвестны [104].

Для эффективной диагностики и лечения митохондриальных заболеваний необходимы комплексные исследования механизмов и особенностей синтеза белка в митохондриях и его регуляции. Данная работа посвящена поиску и изучению потенциальных трансляционных активаторов в митохондриях человека, а также других белков, влияющих на трансляцию отдельных митохондриально кодируемых полипептидов.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Штаммы и линии клеток, среды для культивирования

Для стандартного клонирования в работе использовали штамм *Escherichia coli* TOP10 OneShot («Invitrogen», США – в работе Baleva MV, et al. (2021) и «Thermo Scientific», США – в Baleva MV, et al. (2022), Baleva MV, et al. (2021)), культивируемый в среде LB. Для гетерологической экспрессии рекомбинантных белков использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Promega, Madison, WI, USA).

Изучение влияние нокаута генов на митохондриальные функции белков ZMYND17 и PTCD2 проводились на адгезионной линии клеток человека HeLa (ATCC CCL2, «ATCC», США), белка SLIRP – на адгезионной линии HEK293T (ATCC: CRL-3216). Клетки обеих линий культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) фирм «ПанЭко», Россия с глюкозой 4.5 г/л, с аланил-глутамином – в работе Baleva MV, et al. (2021), «Corning», США с 4,5 г/л глюкозы, Corning @glutargo и пируватом натрия – Baleva MV, et al. (2022); «Gibco», США с 4,5 г/л глюкозы, Glutamax («Gibco», США) и пируватом натрия – Baleva MV, et al. (2023). К средам DMEM добавляли фетальную бычью сыворотку до 10% по объему («Sigma», США или «Corning», США). Для предотвращения контаминации в среду добавляли 1000 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2.5 мкг/мл Амфотерицина В (все компоненты «Sigma», США или «Thermo Scientific», США). Клетки человека перечисленных выше линий инкубировали при 37 °C в увлажненной атмосфере 5% CO₂.

Для получения клеточных линий с делецией в генах исследуемых белков также использовали среду Opti-MEM (1X) с пониженным содержанием сыворотки, забуференную раствором HEPES и бикарбоната натрия, и дополненную гипоксантином, тимидином, пируватом натрия, аланил-глутамином, микроэлементами и факторами роста («Thermo Scientific», США).

Для анализа пролиферативной активности клеток использовали среду DMEM с галактозой 4.5 г/л, 4 mM глутамина и 1 mM пирувата натрия («ПанЭко», Россия).

Клетки линии HeLa и ее производные диссоциировали 0.25% раствором Трипсин-EDTA («Thermo Scientific», США). Отсутствие инфицирования микоплазмой клеточных культур подтверждали с помощью набора MycoReport («Евроген», Россия).

3.2. Плазмидные векторы

Для получения нокаутных клеточных линий в работе использовали плазмидные векторы:

1) pCas9-IRES-EGFP, несущий гены РНК-управляемой эндонуклеазы Cas9, зеленого флуоресцирующего белка EGFP, а также ген устойчивости к канамицину (плазмида получена ранее нашей научной группой [7]). EGFP (enhanced GFP) – рекомбинантный GFP,

флуоресцирующий в 35 раз ярче белка дикого типа. Имеет оптимизированный для экспрессии в клетках млекопитающих состав кодонов [115].

2) pU6-gRNA, применяемый для клонирования гидовых РНК и их экспрессии под U6 промотером; содержит ген устойчивости к канамицину (предоставлено доктором Борисом Скрыбиным, Университет Мюнстера).

Для получения стабильной клеточной линий с помощью системы Sleeping Beauty в работе использовали следующие плазмидные векторы:

1) pSBtet-Neo (предоставлен Эриком Коварцем; плазида Addgene #60509; <http://n2t.net/addgene:60509>; RRID:Addgene_60509), содержащий сайты рестрикции для направленной интеграции целевого гена в плазмиду, индуцируемый тетрациклином (доксидиклином) промотер, сайты узнавания транспозазы SB100X и ген устойчивости к неомицину;

2) pCMV(CAT)T7-SB100 (получен в дар от Сюзанны Ижсвак плазида Addgene #34879; <http://n2t.net/addgene:34879>; RRID:Addgene_34879), содержащий ген транспозазы SB100X, обеспечивающей вырезание и встраивание в геном целевого гена и гена устойчивости к антибиотику, необходимому для селекции.

Для получения клеточной линии с временной экспрессией белка SLIRP использовали плазмидный вектор pcDNA5/FRT/TO («Invitrogen», США), содержащий CMV промотер и ген устойчивости к гигромицину для проведения селекции.

Для получения рекомбинантного белка PTCD2 использовали плазмидный вектор pET30a («Novagen», Германия), содержащий ген устойчивости к канамицину.

3.3. Олигонуклеотиды

Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе, приведены в таблицах в соответствующих разделах. Последовательности олигонуклеотидов указаны в направлении 5'-3'; «Fw» и «Rv» в названии означает прямой (комплементарный анти-смысловой цепи ДНК) и обратный (комплементарный смысловой цепи ДНК) олигонуклеотиды, соответственно. Синтез олигонуклеотидов заказывали в компании «Евроген», Россия. Олигонуклеотиды не содержат фосфатную группу на 5'-конце. Олигонуклеотиды, используемые для проведения ПЦР и последующей рестрикции, дополнены на 5'-концах искусственными фланкирующими последовательностями за пределами сайта узнавания эндонуклеаз рестрикции. Эти последовательности оптимизируют эффективность узнавания сайтов и гидролиза ДНК ферментом.

3.4. Получение линий клеток с делецией в генах исследуемых белков

3.4.1. Система редактирования генома

Для нокаута генов исследуемых белков была использована система редактирования генома CRISPR-Cas9, состоящая из нуклеазы Cas9 и одиночных направляющих РНК (single guide РНК, sgРНК). При помощи онлайн-сервиса [genscript.com](https://www.genscript.com) были подобраны последовательности гидовых РНК (гРНК). гРНК имеют длину 20 нуклеотидов и располагаются с 5'-конца от последовательности мотива, смежного с протоспейсером (protospacer adjacent motif, PAM): (5'-NGG-3'). Также последовательности гРНК были выбраны с учетом минимизации количества их неспецифических сайтов связывания в геноме. Поскольку для клонирования гидовых РНК был использован вектор pU6-gRNA, содержащий U6 промотор, первые нуклеотиды выбранных последовательностей заменялись на гуанин, и вносились сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции BbsI на 5'-концах олигонуклеотидов. Последовательность транс-активируемых РНК (trans-activating crisper РНК, tracrРНК) закодирована в векторе pU6-gRNA. Таким образом, при вставке последовательности гРНК образуется ген единой направляющей РНК, транскрибирующийся в единую РНК-молекулу. Пары гидовых РНК были подобраны таким образом, чтобы делетировались экзоны или участки экзонов, входящие в состав всех известных изоформ исследуемого белка. Принималось во внимание, чтобы длины удаляемых участков не были кратным трем, то есть, чтобы происходил сдвиг рамки считывания, а также, чтобы исходный старт-кодон сохранялся в отредактированном гене.

Для получения нокаутных линий с делецией в экзоне генов изучаемых белков ZMYND17, SLIRP и PTCD2 были подобраны по 2 гидовых РНК, составляющие пару для удаления участка внутри экзона. Для каждой подобранной таким образом гРНК заказывали пару олигонуклеотидов, комплементарную друг другу – прямой (обозначены «Fw» в таблице 1) и обратный (обозначены «Rv» в таблице 2), содержащую свисающие 5'-концы CACC и AAAC, соответственно. Олигонуклеотиды представлены в таблице 1; обозначены, соответственно названиям белков.

Таблица 1. Олигонуклеотиды для конструирования генов гидовых РНК. Сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции BbsI выделены голубым цветом.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида | Белок, ген которого затрагивает делеция |
|--------------------------|------------------------------------|---|
| ZMYND17-1Fw | CACC gTCCACGGTCCCGGCGACGA | ZMYND17 |
| ZMYND17-1Rv | AAACT CGTCGCCGGGACCGTGGAc | |
| ZMYND17-2Fw | CACC gCCTTGGATGATAATGTTCC | |
| ZMYND17-2Fw | AAAC GGAACATTATCATCCAAGGc | |
| SLIRP-1Fw | CACCG CGTAGAAGTATCAATCAGC | SLIRP |
| SLIRP-1Rv | AAAC GCTGATTGATACTTCTACGC | |
| SLIRP-2Fw | CACCG CACTCGACGCCGAGTCCA | |
| SLIRP-2Rv | AAACT GGAAGTATCAATCAGC | |
| PTCD2-1Fw | CACCG CAAAATCTGCAGCGCCTGCG | PTCD2 |
| PTCD2-1Rv | AAAC GCGAGGCGCTGCAGATTTTGCG | |
| PTCD2-2Fw | CACCG GCCCTCTCGGAGGTATCCG | |
| PTCD2-2Rv | AAAC CGGATACCTCCGAGAGGGCC | |

3.4.2. Клонирование гРНК в составе плазмидного вектора pU6-gRNA

гРНК клонировали в составе плазмиды pU6-gRNA. Для этого проводили линейаризацию 1 мкг плазмиды pU6-gRNA в 20 мкл с использованием эндонуклеазы рестрикции BbsI («Thermo Fisher Scientific», США), следуя рекомендациям производителя. Рестрикционную смесь разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле (0.5xTBE, 125V). Линейаризованную плазмиду выделяли из агарозного геля с помощью набора CleanUp («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Качество нуклеиновой кислоты здесь и далее проверяли при помощи электрофореза в агарозном геле (0.5xTBE, 125V); количество оценивали спектрофотометрически с помощью NanoPhotometer P300 («Implen», Германия).

По 100 пмоль комплементарных олигонуклеотидов фосфорилировали и отжигали друг на друга в 10 мкл. Для фосфорилирования использовали T4 полинуклеотид киназу (10 Ед/мкл; «Thermo Fisher Scientific», США), следуя инструкциям производителя. Затем полученную на предыдущем этапе смесь инкубировали 5 минут при 95 °С, с последующим снижением температуры по 1 °С/мин до 20 °С.

Лигирование линейаризованного вектора и полученных двуцепочечных олигонуклеотидов, соответствующих гРНК, проводили с использованием T4 ДНК лигазы (5 Ед/мкл; «Thermo Fisher Scientific», США) в 20 мкл, согласно инструкции производителя. Использовали 100 нг линейаризованного вектора pU6-gRNA и ~0.2 пмоль (2.6 нг) олигонуклеотидов, что соответствует молярному соотношению 1:5.

Лигазную смесь добавляли к аликвоте компетентных клеток *E. coli* штамма TOP10 OneShot, подготовленных по методу Inoue [116], и инкубировали на льду в течение 30 минут. Реакционную смесь прогревали в течение 35 секунд на водяной бане при 42 °С и помещали в лед

на 5 минут. Клетки инкубировали в среде LB при 37 °С в течение часа. Далее бактериальные клетки высевали на чашки Петри с агаризованной селективной средой, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 14-16 часов.

Для отбора клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды, проводился скрининг бактериальных колоний методом ПЦР. Колонии клеток носиком пипетки скалывали в 15 мкл воды и ресуспендировали, затем 2 мкл суспензии использовали как матрицу для ПЦР. Скрининг проводили в объеме 20 мкл; использовали праймеры M13 (по 1мкМ) и ДНК полимеразу Taq (5 Ед/мкл; «Thermo Fisher Scientific», США), следуя рекомендациям производителя.

ПЦР-продукты разделяли с помощью электрофореза в 3% агарозном геле (0.5xTBE, 125V). Суспензии клеток, показавшие положительный ответ ПЦР-анализа, высевали в селективную жидкую среду (LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина) и инкубировали при 37 °С 14-16 часов. Из ночной культуры выделяли плазмиды с помощью набора Plasmid Miniprep («Евроген», Россия) согласно руководству производителя и анализировали их при помощи секвенирования по Сэнгеру с праймеров M13 («Евроген», Россия).

3.4.3. Получение генномодифицированных клеток

Клетки линии HeLa (раковые клетки эндотелия матки) или HEK293T (линия, полученная из эмбриональных почек человека) котрансфицировали плазмидами pU6-gRNA, содержащими вставки соответствующих гидовых РНК, и pCas9-IRES-EGFP при помощи реагента Lipofectamine 3000 («Invitrogen», США), следуя инструкциям производителя. Через 48 часов проводили отбор клеток, содержащих зеленый флуоресцирующий белок EGFP, при помощи сортирующей цитофлуометрической системы FACS Aria SORP (Beckton Dickinson Biosciences, США). Отобранные клетки инкубировали в среде DMEM при 37 °С и 5% CO₂ до 30-50% конфлюентности.

3.4.4. Проверка трансфицированных клеток на наличие делеции

Для оценки эффективности редактирования из культуры клеток была выделена ДНК, а затем проведена ПЦР с подобранными парами праймеров, комплементарными фланкирующим последовательностям целевого участка делеции. Праймеры были подобраны таким образом, чтобы в случае успешного редактирования размер амплифицированного фрагмента отредактированного гена был меньше, чем у исходного (нередктированного) варианта (Таблица 2). ПЦР-продукты разделяли в 2.5% или 1.5% агарозном геле (0.5xTBE, 125V). В результате, при анализе геномной ДНК смешанной клеточной культуры с успешным редактированием наблюдали два продукта амплификации: укороченный фрагмент (делеционный вариант) и полноразмерный фрагмент (интактный ген). Смешанную линию клеток, затем, с помощью сортирующей цитофлуометрической системы FACS Aria SORP, рассевали по одной клетке в лунки 96-луночного планшета, растили в среде DMEM при 37 °С и 5% CO₂. При достижении 30–

50% конфлюэнтности клеточного монослоя культуры пересевали в лунки 12-луночного планшета и инкубировали в тех же условиях. Из половины клеток, по достижении 30-50% конфлюэнтности, выделяли ДНК и анализировали с помощью ПЦР, как описано выше. Отбор моноклональной линии проводили по наличию единственного продукта амплификации, соответствующего нокаутному варианту гена. ПЦР-продукты очищали из агарозного геля с использованием набора для экстракции ДНК («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя и подвергали секвенированию по Сэнгеру с тех же праймеров («Евроген», Россия). Моноклональные линии с подтверждённой делецией использовали для последующих биохимических и метаболических исследований.

Таблица 2. Олигонуклеотиды для проверки эффективности редактирования генома методом ПЦР.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида | Длина ампликона без редактирования, нт |
|--------------------------|------------------------------------|--|
| ZMYND17-Fw | CCTGGGTCTGAGAGACTGG | 428 |
| ZMYND17-Rv | CTGTACTCCCTCTCCACCTTC | |
| SLIRP-Fw | CGGAAGCAGATTCTCTCGTG | 237 |
| SLIRP-Rv | CTTTGAGGATCACTTGGACC | |
| PTCD2-Fw | GGACGAATCCCTTTTGTTCGC | 272 |
| PTCD2-Rv | ATGCTAGCTGGGATCTAACAC | |

3.4.5. Выделение ДНК из клеток человека

Для выделения ДНК из клеток человека к осадку клеток (~1-5 млн клеток) добавляли 300 мкл буфера (50 mM Трис-HCl, pH 7.5-8, 400 mM NaCl, 2 mM ЭДТА, 0.1% SDS, 50 мкг/мл протеиназы K), инкубировали в течение часа при 37 °C. Затем проводили фенол-хлороформную экстракцию ДНК.

3.5. Получение стабильных клеточных линий

Для получения стабильных клеточных линий использовали систему на основе транспозона Sleeping Beauty [117]. В своей работе мы использовали вектор pCMV(CAT)T7-SB100, где ген транспозазы SB100X находится под контролем конститутивного CMV промотера, и вектор pSBtet-Neo.

Вектор pSBtet-Neo содержит два сайта рестрикции SfiI, образующих при линеаризации различные свисающие 5'-концы, что обеспечивает направленную интеграцию целевого гена. В собранном плазмидном векторе целевой ген оказывается под контролем TRE промотера, в результате чего экспрессия гена активируется добавлением антибиотика доксициклина. Также в транспозон входит ген устойчивости к антибиотику неомицину (и генетицину, также называемому G418), находящийся под контролем конститутивного промотера. Таким образом,

отбор клонов, содержащих вставку в геном, проводится с помощью селекции на антибиотике G418, а анализ фенотипа экспрессии целевого гена – после индукции доксициклином.

3.5.1. Клонирование кодирующей части гена *PTCD2* в составе плазмидного вектора pSBtet-Neo

Амплификацию кодирующей части гена белка PTCD2 проводили, используя в качестве матрицы комплементарную ДНК. Для этого из клеток линии дикого типа HeLa выделяли тотальную РНК, используя TRIzol™ Reagent («Invitrogen», США), следуя рекомендациям производителя. С помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) для обратной транскрипции получали комплементарную ДНК, используя гексонуклеотиды со случайным составом (N₆) в качестве затравки. На реакцию объемом 20 мкл отбирали по 1 мкг тотальной РНК. Реакционные смеси инкубировали 60 минут при 40 °С и 10 минут при 70 °С для инактивации обратной транскриптазы.

Далее проводили амплификацию всей кодирующей части гена *PTCD2* методом ПЦР. Прямой и обратный праймеры на 5'-конце содержали сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции SfiI спроектированные таким образом, чтобы обеспечить последующее направленное клонирование в вектор pSBtet-Neo. Обратный праймер также содержал последовательность, кодирующую с-Мус эпитоп (EQKLISEEDL) для последующей детекции наличия белка (с эпитопом на С-конце) с помощью иммуноблоттинга. Праймеры представлены в таблице 3.

Таблица 3. Олигонуклеотиды для амплификации кодирующей части гена белка PTCD2 методом ПЦР. Сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции SfiI выделены голубым цветом. Последовательность, кодирующая с-Мус эпитоп показана строчными буквами.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида |
|--------------------------|--|
| PTCD2-SfiI-Fw | ATCGAGG GCCTCTGAGGCC ATGGTCCGAGACAGTATGG |
| PTCD2-cMyc-SfiI-Rv | ATCGAG GGCCTGACAGGCC ttaaagatcttctcgctaataagttttgttcCTCAGCCAACAGGGACTGG |

Амплификацию проводили с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Platinum SuperFi II («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. ПЦР-продукты разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле (0.5xTBE, 125V) и выделяли из агарозного геля с помощью набора CleanUp («Евроген», Россия), следуя инструкции производителя.

Рестрикцию полученного ПЦР-фрагмента и линеаризацию плазмиды pSBtet-Neo проводили в 20 мкл с использованием эндонуклеазы рестрикции SfiI («Thermo Fisher Scientific»,

США), следуя рекомендациям производителя. Рестрикционные смеси разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле (0.5xTBE, 125V). Линеаризованную плазмиду и продукт рестрикции ПЦР-фрагмента выделяли из агарозного геля с помощью набора CleanUp («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя.

Лигирование линеаризованного вектора и ПЦР-фрагмента после рестрикции проводили с использованием Т4 ДНК лигазы (5 Ед/мкл; «Thermo Fisher Scientific», США) в 20 мкл, согласно инструкции производителя. Использовали 100 нг линеаризованного плазмидного вектора pSBtet-Neo и ~48 нг ПЦР-фрагмента, что соответствует молярному соотношению 1:3.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамма TOP10 OneShot лигазной смесью и инкубацию проводили, как описано выше. В качестве селективного маркера среда содержала 100 мкг/мл ампициллина.

Для отбора клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды, проводился скрининг бактериальных колоний методом ПЦР, как описано выше. Для скрининга и последующего анализа методом секвенирования собранных плазмид по Сэнгеру использовали праймеры, перечисленные в таблице 4. ПЦР-продукты разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (0.5xTBE, 125V). Суспензии клеток, показавшие положительный ответ ПЦР-анализа, высевали в селективную жидкую среду (LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина) и инкубировали при 37 °C 14-16 часов. Из ночной культуры выделяли плазмиды с помощью набора Plasmid Miniprep («Евроген», Россия) согласно руководству производителя. Собранные плазмиды анализировали при помощи секвенирования по Сэнгеру («Евроген», Россия) на наличие мутаций и контроля качества сборки.

Таблица 4. Олигонуклеотиды для анализа интеграции целевого гена в вектор pSBtet-Neo методом ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида |
|--------------------------|------------------------------------|
| pSBtet-Fw | CCTGGAGCCAATTCCAACCTCT |
| pSBtet-Rv | CACTGCATTCTTGTTGTGGTT |

3.5.2. Получение генномодифицированных клеток

Клетки моноклональной линии HeLa, нокаутной по гену белка PTCD2 котрансфицировали полученной плазмидой pSBtet-Neo-PTCD2 и плазмидой pCMV(CAT)T7-SB100 при помощи реагента Lipofectamine 3000 («Invitrogen», США), следуя инструкциям производителя.

Отбор трансфицированных клеток на наличие интеграции транспозона в геном проводили, культивируя их в присутствии 1 мг/мл антибиотика G418 в течение 14 дней. По

прошествии селекции получали культуру с интегрированной в геном кодирующей частью гена *PTCD2* под контролем промотора, активируемого доксициклином.

3.5.3. Проверка трансфицированных клеток

Для оценки эффективности интеграции транспозона, содержащего кодирующую часть гена *PTCD2*, из культуры клеток выделяли ДНК и проводили ПЦР с парой праймеров, комплементарными фланкирующим последовательностям целевого гена в составе транспозона (таблица 4). ПЦР-продукты разделяли в 1% агарозном геле (0.5xTBE, 125V).

Эффективность экспрессии *PTCD2* на уровне белка анализировали с помощью иммуноблоттинга с антителами к эпитопу с-Мус. Для этого клеточную культуру культивировали в присутствии 1 мкг/мл антибиотика доксициклина, в результате чего инициировалась транскрипция мРНК и транслировался рекомбинантный *PTCD2*, содержащий аффинный эпитоп с-Мус на С-конце.

3.6. Получение клеточных линий с временной экспрессией белка SLIRP

Для временного восстановления экспрессии гена белка *SLIRP* в нокаутной по этому гену линии использовали плазмидный вектор *pcDNA5/FRT/TO*.

3.6.1. Клонирование кодирующей части гена *SLIRP* в составе плазмидного вектора *pcDNA5/FRT/TO*

Амплификацию кодирующей части гена белка *SLIRP* проводили, используя в качестве матрицы комплементарную ДНК полученную аналогично ранее описанному протоколу. Прямой и обратный праймеры на 5'-конце содержали сайт узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Xho*I («Thermo Scientific», США), соответственно, чтобы обеспечить последующее направленное клонирование в вектор. Праймеры представлены в таблице 5.

Таблица 5. Олигонуклеотиды для амплификации кодирующей части гена белка *SLIRP* методом ПЦР. Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Xho*I выделены голубым цветом.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида |
|--------------------------|---|
| SLIRP- <i>Bam</i> HI-Fw | GTCAGGATCCATGGCGGCCTCAGC |
| SLIRP- <i>Xho</i> I-Rv | GTCAC TCGAGT CAAAAATCTTTCTTTTCATCATCAGATGT |

Рестрикцию полученного ПЦР-фрагмента и линейаризацию плазмиды *pcDNA5/FRT/TO* проводили в 20 мкл с использованием эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Xho*I, следуя рекомендациям производителя. Очистку продуктов рестрикции после электрофоретического разделения и лигирование проводили, как описано выше. Использовали 100 нг линейаризованного плазмидного вектора *pcDNA5/FRT/TO* и ~32 нг ПЦР-фрагмента, что соответствует молярному соотношению 1:5.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамма TOP10 OneShot лигазной смесью и инкубацию проводили, как описано выше. В качестве селективного маркера среда содержала 100 мкг/мл ампициллина.

Отбор клонов, содержащих собранные плазмиды pcDNA5/FRT/TO-SLIRP, осуществляли, как описано выше. Для скрининга и последующего анализа методом секвенирования собранных плазмид по Сэнгеру использовали праймеры, перечисленные в таблице 5.

3.6.2. Получение генномодифицированных клеток

Клетки моноклональной линии HEK293T, содержащей делецию в гене белка SLIRP трансфицировали полученной плазмидой pcDNA5/FRT/TO, как описано выше.

Анализ фенотипа клеточной культуры с восстановленной экспрессией гена *SLIRP* под контролем конститутивного CMV промотера проводили через 24 и 48 часов после трансфекции с помощью иммуноблоттинга.

3.7. Анализ пролиферативной активности клеток

Клетки линии дикого типа HEK293T и линии с делецией в гене SLIRP высевали в лунки 24-луночного планшета по $\sim 2.5 \times 10^4$ клеток на лунку в среду с содержанием 4.5 г/л глюкозы или галактозы. Каждые 24 часа количество жизнеспособных клеток определяли методом исключения трипанового синего с помощью автоматического счетчика клеток TC-20 («Bio-Rad», США).

3.8. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг осуществляли после электрофоретического разделения белков клеточных лизатов в денатурирующих условиях. Так же анализировали фракции, полученные в результате ультрацентрифугирования клеточных лизатов в градиенте плотности сахарозы для анализа ко-ассоциации белков с митохондриальными субчастицами. Для анализа количества комплексов ЭТЦ иммуноблоттинг проводили после нативного электрофореза лизатов митохондрий.

Для анализа наличия или отсутствия целевого белка в клеточных лизатах, осадок клеток ресуспендировали в PBS (100 мкл на $\sim 1-3$ млн клеток) и лизировали в том же растворе ультразвуком, затем проводили измерение концентрации суммарного белка методом Бредфорда. По 100 мкг общего белка из каждого образца разделяли в денатурирующем полиакриламидном геле в системе Лэммли.

Белки митохондриальными и ассоциированными с ними, содержащиеся во фракциях градиента плотности сахарозы, разделяли также электрофоретически в системе Лэммли. Для оценки количества комплексов цепи переноса электронов митохондрий проводили иммуноблоттинг после нативного электрофореза, подробности пробоподготовки описаны в одном из следующих разделов.

Затем иммобилизовали белки на нитроцеллюлозную мембрану с полиэфирной подложкой (размер пор 0.22 мкм, «Bio-Rad», США), с использованием прибора для полусухого переноса Trans-Blot Turbo («Bio-Rad», США), следуя инструкциям производителя.

Для оценки качества переноса белков и относительного количества белка в каждом из образцов, белки на мембране окрашивали водным раствором Понсо S (1 мкг/мл Понсо S, 5% ледяной уксусной кислоты). Затем блокировали неспецифические сайты связывания антител, инкубируя мембрану в буфере, содержащем 1xPBS и 3% обезжиренное молоко, в течение 30 минут при перемешивании.

Далее проводили детекцию белков. Для этого инкубировали мембрану с первичными антителами, специфичными к интересующему белку. Гибридизацию проводили в течение 14-16 часов при 4°C и постоянном перемешивании. Использовали антитела в PBS в разведении, рекомендованном производителем. Затем промывали мембрану PBS (3 раза по 10 минут) и инкубировали со вторичными антителами, специфичными к конstitutивной части первичного антитела и конъюгированными с пероксидазой хрена в качестве репортера, в течение 1-1.5 часов. Мембрану снова промывали и визуализировали хемилюминисценцию с помощью набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate («Thermo Scientific», США) и системы геледокументирования ChemiDoc («BioRad», США), согласно рекомендациям производителя. Антитела, используемые в работе, указаны в таблице 6.

Таблица 6. Антитела, использованные в работе.

| Антиген | Номер в каталоге, фирма-производитель, страна производства | Тип антитела, источник антитела |
|--|--|---------------------------------|
| Первичные антитела | | |
| с-Мус эпитоп | FNab05462, «FineTest», Китай | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок PTCD2 | NBP2-26176, «Novus Biologicals», США | Поликлональное, IgG, козёл |
| Белок COII | FNab05393, «FineTest», Китай | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок COIII | 55082-1-AP, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок Cox4 | 11242-1-AP, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок SLIRP | 26006-1-AP, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок CytB | FNab02184, «FineTest», Китай | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок NDUFS3 | 15066-1-AP, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок ATP5A1 | 14676-1-AP, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок MRPS27 | 17280-1-AP, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| Белок MRPL44 | 16394-1-AP, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| Полигистидиновый тег | K200060M, «Solarbio», Китай | Моноклональное, IgG, мышь |
| Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена | | |
| IgG кролика | 5196-2504, «Bio-Rad», США | Поликлональное, IgG, козёл |
| IgG козла | SA00001-4, «Proteintech», США | Поликлональное, IgG, кролик |
| IgG мыши | FNSA-0003, «FineTest», Китай | Поликлональное, IgG, козёл |

Проводили визуальное сравнение интенсивности хемилюминисценции. Для получения достоверных результатов анализа проводили нормализацию на этапе подготовки и нанесения образцов: ориентируясь на общее количество белка, измеренное по Брэдфорду, наносили одинаковое количество образцов. Верификацию также проводили при окраске белков, иммобилизованных на мембране, раствором Понсо S. Выводы, относительно снижения или увеличения количества анализируемого белка в образцах нокаутных линий клеток делали на основании сравнения с количеством белка в интактных линиях.

3.9. Анализ митохондриальной трансляции *in vivo* в клетках млекопитающих

3.9.1. Мечение продуктов митохондриальной трансляции *in vivo* в клетках млекопитающих

Эксперименты по мечению проводили при достижении клетками примерно 70% конфлюэнтности; для одного анализа использовали примерно 5×10^5 клеток. Для радиоактивного мечения и мечения с использованием HPG клетки инкубировали в среде DMEM, не содержащей

метионин («ПанЭко», Россия), с 10% диализованной сывороткой («Sigma», США) и инкубировали 30 минут при 37 °С и 5% CO₂. Затем цитозольную трансляцию ингибировали добавлением циклогексимида до конечной концентрации 200 мкг/мл. После 5 минут инкубации продукты митохондриальной трансляции метили добавлением в среду либо 0.5 мКюри/мл L-[35S]-метионина («Perkin Elmer», США), либо 50 мкМ HPG («Lumiprobe», Россия), в зависимости от эксперимента. После 1 часа инкубации к клеткам добавляли среду DMEM, содержащую метионин, и инкубировали 10 минут при 37 °С и 5% CO₂, чем останавливали реакцию мечения.

3.9.2. Подготовка радиоактивно меченых образцов клеток млекопитающих
Клетки, меченные ³⁵S-метионином, промывали раствором PBS, диссоциировали и осаждали центрифугированием (400g, 4 мин, комнатная температура). Осадок клеток дважды промывали раствором PBS. Затем клетки ресуспендировали в PBS и лизировали в том же растворе ультразвуком (3 импульса по 10 секунд с интервалами 15 секунд, амплитуда 15%, ультразвуковой дезинтегратор «Branson», США). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда. Равные количества белка смешивали с загрузочным буфером Лэммли и инкубировали 15 минут при 37 °С.

3.9.3. Подготовка HPG-меченых образцов клеток млекопитающих
HPG-меченые клетки собирали, как описано ранее, и ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl (pH 8.1). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда. Затем клетки лизировали добавлением раствора SDS до конечной концентрации 1% и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут.

3.9.4. Клик-реакция
Клик-реакцию между HPG, включенным в состав митохондриальных полипептидов, и флуорофором проводили в 75 мкл. Для этого к клеточному лизату добавляли каталитический буфер, содержащий медь(II)-ТВТА («Lumiprobe», Россия), до однократной концентрации в финальной смеси, до 0.1 мМ AF 488 азида («Lumiprobe», Россия) и до 1 мМ аскорбиновой кислоты. Реакционную смесь тщательно перемешивали после добавления каждого компонента. Для предотвращения окисления аскорбиновой кислоты смесь насыщали азотом. Реакционную смесь инкубировали 16 часов при комнатной температуре в отсутствие света. Белки очищали от свободного красителя с использованием колонок Micro Bio-Spin 6 (BioRad, США), уравновешенных PBS, следуя рекомендациям производителя. После очистки на колонке измеряли концентрацию белка методом Брэдфорд. Белки осаждали метанол-хлороформной экстракцией, ресуспендировали в загрузочном буфере Лэммли с 3% SDS и не содержащем красителя бромфеноловый синий и инкубировали при 37 °С в течение 30 минут.

3.9.5. Электрофоретическое разделение меченых полипептидов

Электрофоретическое разделение белков, как в случае с радиоактивным, так и HPG-мечением, проводили по методу Лэммли. По 35 мкг общего белка из каждого образца анализировали в денатурирующем полиакриламидном геле (5% концентрирующий гель и 18% разделяющий гель). В качестве молекулярного маркера использовали PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 кДа, «Thermo Scientific», США). Электрофорез выполняли в течение 18 часов при 4°C и напряжении 110В на системе BioRad XL Cell («BioRad», США) с использованием стекол размером 160×200 мм.

3.9.6. Визуализация радиоактивно меченых полипептидов

После электрофореза гель окрашивали Кумасси Бриллиантовым Синим R-250. Окрашенный гель сканировали при помощи системы гель-документирования ChemiDoc («BioRad», США). Затем гель высушивали на приборе Gel Dryer System («Hoefer», Германия) при 80 °C в течение часа и экспонировали с фосфорным экраном («GE Healthcare», США) в течение 5 дней. Авторадиограмму проявляли с помощью сканера Storm 865 («GE Healthcare», США) и анализировали в программе ImageJ («NIH», США).

3.9.7. Визуализация HPG-меченых полипептидов

Флуоресцентно меченые митохондриальные полипептиды визуализировали на сканере Typhoon FLA 9500 («GE Healthcare», США). Интенсивность специфических полос и эффективность синтеза митохондриальных белков анализировали в программе ImageJ («NIH», США). После детекции флуоресценции гель окрашивали Кумасси Бриллиантовым Синим R-250 и повторно сканировали с помощью ChemiDoc («BioRad», США).

3.10. Измерение скорости поглощения кислорода

Поглощение кислорода клетками человека определяли полярографически при помощи электрода Кларка на приборе Oxygraph Plus («Hansatech», Великобритания) при 37 °C в среде DMEM. Для одного измерения использовали $\sim 4 \times 10^6$ клеток, посчитывая их количество до начала измерений. Измерение базального уровня дыхания проводили в течение 5 минут. После установления базального уровня, для анализа максимально возможной скорости восстановления молекулярного кислорода четвертым комплексом дыхательной цепи митохондрий, в суспензию добавляли разбавитель карбонил цианид 3-хлорфенилгидразон (CCCP; carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) до конечной концентрации 25 мкМ; измерения проводили еще 2 минуты. Затем ингибировали цитохром с оксидазу добавлением KCN до 1 мМ. Скорость поглощения кислорода клетками рассчитывалась как производная функции, выражающей зависимость концентрации кислорода от времени. Нормирование результатов проводили на количество клеток, скорость поглощения кислорода выражали в нМ/10⁶ клеток/мин.

3.11. Анализ клеточного метаболизма с помощью Seahorse XF HS MINI

Анализ скорости потребления кислорода проводили с помощью набора Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit для анализа митохондриальных функций («Agilent Technologies», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки высевали в 8-луночные микропланшеты XF («Agilent Technologies», США); $\sim 6 \times 10^4$ клеток на лунку. Скорость поглощения кислорода измеряли с помощью анализатора Seahorse XF HS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Измерения проводили в среде DMEM XF, дополненной 10 мМ глюкозы, 2 мМ L-глутамина и 1 мМ пирувата натрия в базовых условиях и в ответ на последовательное добавление 1.5 мкМ олигомицина, 2 мкМ карбонилцианида 4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP; cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) и 0.5 мкМ ротенона/антимицина А. Фактическое значение скорости поглощения кислорода нормировали на общее содержание белка, измеренное по Брэдфорду.

3.12. Выделение митохондрий из клеток человека [118]

Митохондрии выделяли из 2×10^7 клеток. Клетки диссоциировали и центрифугировали 4 минуты при 400g. Осадок клеток промывали раствором PBS и центрифугировали 10 минут при 600g. К осадку клеток добавляли 2 мл холодного гипотонического буфера (10 мМ NaCl, 1.5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.5), и инкубировали на льду в течение 20 минут. Затем суспензию клеток переносили в предварительно охлажденный 7 мл гомогенизатор Даунса и лизировали семью ударами (пестик В). К 2 мл клеточного лизата добавляли 1.455 мл 2.5х буфера (1х: 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ EDTA, 5 мМ Tris-HCl, pH 7.5), затем добавляли 1х буфера до 10 мл. Лизат клеток центрифугировали 5 мин при 1300g и 4°C. Митохондрии осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 17000g и 4°C. Концентрацию митохондриального белка измеряли методом Брэдфорда.

3.13. Измерение активности IV комплекса спектрофотометрически

Активность IV комплекса цепи переноса электронов – цитохром с оксидазы измеряли как на клеточном лизате, так и на изолированных митохондриях. Субстрат для проведения измерения готовили, растворяя 2.7 мг цитохрома («Sigma Aldrich», США) в 1 мл mQ. Для получения восстановленного цитохрома с добавляли дитиотриэтол до конечной концентрации 2 мМ и инкубировали ночь на 4°C. Исходный раствор, содержащий восстановленный цитохром с, разбавляли в 20 раз и измеряли разницу поглощения при длинах волны 550 и 565 нм. Субстрат считали готовым, когда соотношение A_{550}/A_{565} составляло от 10 до 20.

Для подготовки образцов лизатов – клетки диссоциировали и центрифугировали 4 минуты при 400g. Осадок клеток ресуспендировали в растворе PBS и измеряли количество клеток. Клеточную суспензию трижды замораживали на -80°C и затем размораживали. Для измерения активности комплекса к 200 мкл буфера, содержащего 10 мМ KH_2PO_4 , 250 мМ сахарозы и 1 мг/мл

бычьего сывороточного альбумина, добавляли 2 мкл 20% додецилмальтозида и 10 мкл подготовленного субстрата – восстановленного цитохрома с. Затем добавляли объем клеточной суспензии, содержащий примерно 15×10^3 клеток. Поглощения смеси измеряли при 550 нм каждые 10 секунд в течение 3 минут. Реакцию ингибировали добавлением 1 мкл 1М KCN, специфически ингибирующего IV комплекс, и продолжали измерение в тех же временных интервалах.

Активность цитохром с оксидазы вычисляли в единицах активности (U) на мг митохондриального белка следующим образом:

$$\text{Активность} \left(\frac{U}{\text{мг}} \right) = \left(\frac{\Delta \text{поглощение}}{\text{мин}} * 1000 \right) / 21.84$$

где 21.84 – $\Delta \epsilon^{\text{мм}}$ между ферроцитохромом с и феррицитохромом с при 550 нм.

Для измерения активности IV комплекса в митохондриях, количество митохондрий, соответствующие 1 мкг суммарного белка, ресуспендировали в 220 мкл буфера, содержащего 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 и 45 mM сахарозы. Затем добавляли 180 мкл буфера, содержащего 10 mM Tris-HCl, 125 mM KCl, pH 7.0; 1 mM неионного детергента – додецилмальтозида. К полученной суспензии добавляли 20 мкл раствора субстрата и дальнейшие измерения проводили аналогично описанным выше.

3.14. Солюбилизация мембран митохондрий, подготовка проб и постановка Blue-Native электрофореза [119]

Осадок митохондрий ресуспендировали в солюбилизирующем буфере (50 mM NaCl, 50 mM имидазол, pH 7.0, 2 mM 6-аминогексановая кислота, 1 mM ЭДТА) из расчета: 1 мкл буфера на 10 мкг белка. Добавляли детергент 20% дигитонин (3 мкл на 100 мкг белка) или 20% додецилмальтозида (1.25 мкл на 100 мкг белка), инкубировали на льду 20 минут и затем центрифугировали 1 час при 25000g при 4 °C. Переносили супернатант в новую пробирку, добавляли 50% глицерин (5 мкл на 400 мкг белка) и 5% кумасси бриллиантовый синий G-250 (3 мкл на 400 мкг белка). Пробы центрифугировали 5 минут при 25000g при 4 °C и наносили на гель объемы, соответствующие 100 мкг митохондриального белка. Для разделения комплексов и суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий использовали градиентные неденатурирующие полиакриламидные гели (AA:MBA 32:1, 25 mM имидазол, 0.5 M 6-аминогексановая кислота, 0.08% персульфат аммония, 0.008% тетраметилэтилендиамин; в наиболее концентрированную составляющую разделяющего геля дополнительно добавляли 25% глицерина). Для разделения белковых комплексов, полученных с применением дигитонина, использовали гель с градиентом концентрации акриламида от 4 до 8%. В качестве анодного

буфера использовали 25 мМ имидазол-НСl, рН 7.0. Электрофоретическое разделение проводили при постоянном напряжении 75 V в течение 30 минут, используя первый катодный буфер, содержащий 50 мМ трицина, 7.5 мМ имидазол-НСl, рН 7.0 и 0.02% кумасси бриллиантового синего G-250. Затем заменяли катодный буфер на второй, содержащий 50 мМ трицина, 7.5 мМ имидазол-НСl, рН 7.0, и 0.002% кумасси бриллиантового синего G-250, и проводили электрофоретическое разделение 2-3 часа при постоянном напряжении 90 V. После проведения Blue-Native электрофореза измеряли активность комплексов дыхательной цепи в геле, либо анализировали их состав с помощью иммуноблоттинга на нитроцеллюлозной мембране.

3.14.1. Анализ активности I комплекса в полиакриламидном геле

Для оценки распределения активности I комплекса между суперкомплексами различной стехиометрии гель после нативного электрофореза инкубировали в буфере, содержащем 100 мМ Tris-НСl, рН 7.4, 1 мг/мл NBT (нитросиний тетразолий) и 0.14 мМ НАДН. Реакцию останавливали добавлением уксусной кислоты до 10%. Качественная реакция основана на том, что функциональный I комплекс окисляет НАДН до НАД⁺ и восстанавливает нитросиний тетразолий до его окрашенного производного, который выпадает в осадок в зоне активности НАДН-дегидрогеназы. Интенсивность окрашенной полосы пропорциональна концентрации активного комплекса I в образце.

3.14.2. Анализ активности IV комплекса в полиакриламидном геле

Для детектирования активности цитохром с оксидазы, гель инкубировали в буфере, содержащем 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7.4, 0.5 мг/мл 3,3'-диаминобензидина, 1 мг/мл цитохрома с, 75 мг/мл сахарозы. В результате окисления комплексом IV цитохрома с происходит восстановление 3,3'-диаминобензидина с образованием осадка коричневого цвета. Буфер удаляли, гель промывали дистиллированной водой и затем инкубировали в течение часа в 50 мМ глицине, прежде чем проводить качественную реакцию на активность АТФ-синтазы.

3.14.3. Анализ активности V комплекса в полиакриламидном геле

Для проведения качественной реакции на активность V комплекса дыхательной цепи гель инкубировали при 37 °С в буфере, содержащем 35 мМ Трис, 270 мМ глицина, 14 мМ MgCl₂, 5 мМ АТФ и 0.2% Pb(NO₃)₂. АТФ-синтаза гидролизует АТФ до АДФ и свободного фосфата. В результате реакции обмена ортофосфат свинца выпадает белым осадком, окрашивая области геля рядом с активным V комплексом.

3.15. Фракционирование миторибосом

Для анализа профиля митохондриальных рибосом применяли метод ультрацентрифугирования в линейном градиенте плотности сахарозы. Для одного образца диссоциировали приблизительно 10⁷ клеток, дважды промывали PBS. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл буфера, содержащем 10 мМ HEPES, рН 7.4, 120 мМ KCl, 20 мМ ацетата

магния, 5 мМ β -меркаптоэтанола, и измеряли количество белка методом Бредфорд. Выравнивали концентрации белка между образцами тем же буфером и добавляли неионный детергент Triton X-100 до конечной концентрации 1.7%. Лизировали клетки в течение 30 минут на льду, перемешивая каждые 5-10 минут. На этом этапе отбирали контроль нанесения. Затем осветляли лизат центрифугированием при 25000 g в течение 30 минут. Переносили супернатанты в новые пробирки и повторяли центрифугирование. Лизаты (обычно на одно нанесение – ~1.5-3 мг белка в 500-600 мкл) наносили на линейный 10–40% градиент сахарозы, приготовленный на том же буфере без добавления детергента с помощью системы Gradient Station ip («Bioscomp Instruments», Канада). После ультрацентрифугирования при 80000g в течение 18 часов (ротор SW-40Ti, центрифуга Beckman Optima XE-90 «Beckman Coulter», США) градиенты фракционировали (20-21 фракцию объемом ~600 мкл) с помощью системы Gradient Station ip («Bioscomp Instruments», Канада). Белки во фракциях осаждали метанолом/хлороформом. Полученный осадок ресуспендировали в загрузочном буфере Лэммли и инкубировали 5 минут при 95°C. Полученные образцы разделяли электрофоретически в денатурирующем полиакриламидном геле и анализировали распределение миторибосомных субчастиц и других белков по фракциям с помощью иммуноблоттинга.

3.16. Получение конструкций для гетерологичной экспрессии генов

Для получения рекомбинантных белков PTCD2 и SLIRP, содержащих аффинный тег, состоящий из шести гистидинов на С-конце, кодирующие части генов соответствующих белков клонировали в составе плазмидного вектора pET30a.

Для этого проводили амплификацию кодирующих областей генов белка PTCD2 и SLIRP, используя в качестве матрицы комплементарную ДНК полученную, как описано выше. Праймеры для проведения ПЦР перечислены в таблице 7. Прямой и обратный праймеры на 5'-конце содержали сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII («Thermo Fisher Scientific», США), соответственно. Праймеры были спроектированы таким образом, чтобы обеспечить направленное клонирования в вектор pET30a и сохранить рамки считывания между геном белка и 3'-последовательностью, кодирующей гистидиновый тег.

Таблица 7. Олигонуклеотиды для амплификации кодирующей части генов белка PTCD2 и SLIRP методом ПЦР. Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII выделены голубым цветом.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида |
|--------------------------|--|
| PTCD2-NdeI-Fw | ATCGCATATGATGGTCCGAGACAGTATGG |
| PTCD2-HindIII-Rv | ATCGAAGCTTCTCAGCCAACAGGGACTGG |
| SLIRP-NdeI-Fw | ATCGCATATGATGGCGGCCTCAGC |
| SLIRP-HindIII-Rv | ATCGAAGCTTTCAAAAATCTTTCTTTTCATCATCAGATGT |

Амплификацию, рестрикцию и лигирование проводили как описано в разделе выше. Для лигирования использовали 100 нг линейаризованного плазмидного вектора pET30a и ~113 нг и ~31 нг ПЦР-фрагментов PTCD2 и SLIRP, что соответствует молярному соотношению 1:5.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамма TOP10 OneShot лигазной смесью и инкубацию проводили, как описано выше. В качестве селективного маркера среда содержала 50 мкг/мл канамицина.

Далее проводили отбор клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды pET30a-PTCD2 и pET30a-SLIRP, как описано выше. Для скрининга и последующего анализа методом секвенирования собранных плазмид по Сэнгеру использовали стандартные праймеры, комплиментарные промоторной области и терминатору транскрипции T7 бактериофага.

Полученными плазмидными векторами трансформировали компетентные клетки *E. coli* экспрессионного штамма BL21(DE3)/pLysS, согласно описанному ранее протоколу.

3.16.1. Выделение и очистка рекомбинантных белков

Для гетерологической экспрессии генов рекомбинантных белков PTCD2 и SLIRP клетки экспрессионного штамма, трансформированные плазмидами pET30a-PTCD2 и pET30a-SLIRP, соответственно, инокулировали в 5 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола. Инкубировали при 37°C и постоянном перемешивании в течение 14-16 часов. Выросшую культуру переносили в 1 л LB, также содержащей 50 мкг/мл канамицина и 20 мкг/мл хлорамфеникола, до OD₆₀₀ ~ 0.02. Инкубировали при 30°C до достижения OD₆₀₀ ~ 0.7–0.9. Затем добавляли IPTG до 0.25 mM, для индукции транскрипции гена целевого белка и инкубировали при 30°C еще 4 часа.

Клетки собирали центрифугированием при 3000g в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали PBS и центрифугировали в тех же условиях. Затем ресуспендировали осадок клеток в 40 мл PBS (в случае культуры, трансформированной pET30a-PTCD2) или буфера, содержащего 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 25 mM имидазол (в случае культуры,

трансформированной рЕТ30а-SLIRP) и лизировали ультразвуком (10 импульсов по 15 сек, амплитуда 30%, интервалы 45 сек, ультразвуковой дезинтегратор «Branson», США). Полученный лизат центрифугировали при 25000g и 4°C 20 минут. Осветленный лизат, полученный из культуры, содержащей плазмиду рЕТ30а-SLIRP, отбирали и использовали далее для выделения SLIRP.

Осадок, полученный из культуры, содержащей плазмиду рЕТ30а-PTCD2, ресуспендировали в 7 мл буфера, содержащего 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 25 mM имидазол, 8 M мочевины для выделения целевого белка из телец включения, затем центрифугировали при 25000g и 4°C 20 минут.

Полученный лизат наносили на колонку Ni-NTA объемом 1 мл (HisTrap, «GE Healthcare», США), подключенную к хроматографической системе AKTA Purifier («GE Healthcare», США). Колонку предварительно уравнивали тем же буфером, в котором растворен соответствующий белок. После промывки колонки сорока объемами буфера, рекомбинантные белки PTCD2 и SLIRP элюировали тем же буфером, дополнительно содержащим 300 mM имидазола. Фракции, содержавшие рекомбинантные белки, объединяли и диализовали против 25 mM натрий-фосфатного буфера, pH 7.5, содержащего 150 mM NaCl в течение 24 ч (проводили 4 смены буфера за это время). Концентрацию белка определяли методом Бредфорда.

3.17. Анализа электрофоретической подвижности комплексов

Для детектирования взаимодействия рекомбинантного белка SLIRP с митохондриальными мРНК COII и Cytb использовали метод анализа электрофоретической подвижности комплексов в полиакриламидном геле.

Проводили амплификацию 5'-участков мРНК COII и Cytb с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Platinum SuperFi II («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. В качестве матрицы для ПЦР использовали суммарную ДНК, полученную из клеток человека линии НЕК293Т описанным выше способом. Используемые праймеры перечислены в таблице 8. ПЦР-продукты разделяли при помощи электрофореза в 2% агарозном геле (0.5xTBE, 125V) и выделяли из агарозного геля с помощью набора CleanUp («Евроген», Россия), следуя инструкции производителя. При помощи TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit («Thermo Fisher», США), согласно рекомендациям производителя, проводили *in vitro* транскрипцию. В качестве матрицы использовали полученные ДНК-фрагменты. Выделение РНК проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. По 1 мкг полученный РНК фосфорилировали при помощи T4 полинуклеотид киназы (10 Ед/мкл; «Thermo Fisher Scientific», США), следуя инструкциям производителя. В качестве источника фосфатной группы использовали γ -³²P-АТФ (3000 Ки/ммоль). Очистку РНК осуществляли также фенол-хлороформной экстракцией.

Таблица 8. Олигонуклеотиды для амплификации 5'-участков генов COII и Cytb методом ПЦР. Последовательности T7 промотора выделены голубым цветом.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида |
|--------------------------|--|
| COII-Fw | TAATACGACTCACTATAGATGGCACATGCAGCGCAAG |
| COII-Rv | ATACAGGACTAGGAAGCAG |
| Cytb-Fw | TAATACGACTCACTATAGATGACCCCAATACGCAAAAC |
| Cytb-Rv | GTGGTGATTTGGAGGATCAG |

Рекомбинантный белок SLIRP получали, как описано выше. Реакции связывания мРНК с исследуемым белком проводили в 10 мкл в буфере со следующими конечными концентрациями компонентов: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.25 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 6% глицерина.

Соотношение белок:РНК варьировали от 10:1 до 5000:1 (при фиксированной концентрации РНК, составляющей 100 пМ). Реакционные смеси инкубировали 15 минут при 37°C. По 5 мкл разделяли электрофоретически в неденатурирующих условиях (1xTBE, 6% акриламид AA:MBA 19:1) при 75 В в течение 45 минут. Гель высушивали на приборе Gel Dryer System («Hoefer», Германия) при 80 °C в течение часа и экспонировали с фосфорным экраном («GE Healthcare», США) в течение 14-16 часов. Авторадиограмму проявляли с помощью сканера Storm 865 («GE Healthcare», США) и анализировали в программе ImageJ («NIH», США).

3.18. Ко-иммунопреципитация, сравнительная протеомика и анализ данных

3.18.1. Ко-иммунопреципитация рекомбинантного PTCD2

0.5 мг митохондрий HeLa, выделенных, как описано выше, ресуспендировали в солюбилизирующем буфере, содержащем 50 mM имидазол-HCl, pH 7.0, 50 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 2 mM 6-аминогексановой кислоты и дополненном неионным детергентом – 2% додецилмальтозидом, и инкубировали на льду в течение 40 минут. Нерастворимые компоненты удаляли центрифугированием при 18000g и 4°C в течение 1 часа. Растворимую фракцию инкубировали с 25 мкг рекомбинантного PTCD2, содержащего гистидиновый тег, в течение 1 часа на 4°C при перемешивании. Затем добавляли сорбент, Ni-NTA-сефарозу («Qiagen», Германия) и инкубировали 1 час в тех же условиях. Сорбент промывали и проводили элюцию белков в соответствии с протоколом производителя. Контрольный эксперимент для анализа не специфически взаимодействующих с сорбентом белков проводили аналогично, но без добавления PTCD2. Элюированные белки осаждали с помощью метанол-хлороформной преципитации.

3.18.2. Подготовка образцов для сравнительной протеомики

Полученные осадки белка после метанол-хлороформной экстракции растворяли в загрузочном буфере Лэммли и инкубировали 5 минут при 95°C. Образцы наносили на полиакриламидный гель (10% разделяющий гель). Электрофорез останавливали, когда краситель бромфеноловый синий проходил около 5 мм разделяющего геля. Участок геля, содержащий полосу красителя вырезали и нарезали на куски ~3х3мм.

Фрагменты геля дважды промывали раствором 40% ацетонитрила и 50 мМ NH_4HCO_3 , инкубируя по 10 минут, затем дегидротировали добавлением 100% ацетонитрила в течение 10 минут. Ацетонитрил удаляли и к фрагментам геля добавляли 100 мМ NH_4HCO_3 и 20 мМ DTT для восстановления тиоловых групп в белках. После инкубации при 56°C в течение 30 минут, раствор отбирали. Затем образцы инкубировали в буфере, содержащем 100 мМ NH_4HCO_3 и 20 мМ йодоацетамида, 20 мин в темноте для алкилирования тиоловых групп. Затем раствор отбирали, дважды промывали водой и трижды – раствором 40% ацетонитрила и 50 мМ NH_4HCO_3 . Образцы геля дегидротировали в 100% ацетонитриле 10 минут. Трипсинолиз проводили в течение 6 часов при 37°C с помощью 1 мкг Trypsin Gold (в 50 мМ уксусной кислоте; «Promega», США) в буфере, содержащем 40мМ NH_4HCO_3 и 10% ацетонитрил. Для остановки протеолиза добавляли трифторуксусную кислоту до 2%.

Пептиды обессоливали при помощи Pierce C18 Tips («Thermo Fisher Scientific», США), в соответствии с инструкцией производителя. Элюированные пептиды высушивали на вакуумном концентраторе и ресуспендировали в 0,1% муравьиной кислоте.

3.18.3. Очистка пептидов и масс-спектрометрический анализ

Полученные образцы пептидов в объеме 1-4 мкл очищали и концентрировали на микро-предколонке (Acclaim 5µm PepMap 300 µ-Precolumns Cartridge Columns; 0,5 мм × 3 мм, размер частиц 5 мкм, «Thermo Scientific», США) в изократическом режиме с мобильной фазой, содержащей 2% ацетонитрил и 0.1% муравьиную кислоту. Затем пептиды разделяли высокоэффективной жидкостной хроматографией при помощи прибора Ultimate 3000 Nano LC System («Thermo Scientific», США) на колонке C18 длиной 15 см (Acclaim PepMap RSLC; внутренний диаметр 75 мкм, «Thermo Fisher», США).

Элюцию проводили при скорости потока 0.3 мкл/мин. Первые 4 минуты колонку уравнивали 0.1% муравьиной кислотой, затем элюировали пептиды в течение 65 минут градиентом ацетонитрила (от 5 до 35%) в присутствии 0.1% муравьиной кислотой. Далее 6 минут увеличивали концентрацию ацетонитрила до 99% и промывали 99% ацетонитрилом и 0.1% муравьиной кислотой 10 минут. Затем в течение 5 минут уменьшали количество ацетонитрила до нуля.

Масс-спектрометрический анализ проводили в трех повторностях на гибридном масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass spectrometer («Thermo Scientific», США). Пептиды ионизировали при 2.1 кВ и температуре капилляра 240°C. Сигналы прекурсоров (ионов-предшественников, MS) регистрировали в диапазоне m/z (отношение массы к заряду) 300–1500 с разрешением 120000. Тандемные масс-спектры фрагментов (MS/MS) получали с разрешением 15000 в диапазоне от 100 m/z до значения m/z , определяемого зарядом соответствующего прекурсора (но не более 2000 m/z). Максимальное время накопления сигнала составляло 50 мс для прекурсоров и 110 мс для фрагментов, соответственно. Целевое значение числа ионов (AGC) установили на 1×10^6 для прекурсоров и 2×10^5 для фрагментированных ионов.

Для фрагментации с помощью высокоэнергетической коллизионной диссоциации (HCD) использовали нормированную энергию столкновений 29% (29 NCE). Минимальной интенсивностью сигнала при отборе прекурсоров для дальнейшей фрагментации считали 50000 (в условных единицах — «counts»). Отбирали до 20 наиболее интенсивных ионов-прекурсоров. Прекурсоры с зарядом +1 и более +5 исключали из анализа, а все измеренные прекурсоры динамически исключали из повторной фрагментации на 20 секунд.

3.18.4. Анализ данных протеомики

Полученные необработанные данные анализировали с использованием программы MaxQuant [120] со встроенным поисковым алгоритмом Andromeda [121]. Все образцы одного биологического повторения анализировали в рамках одного запуска. Для идентификации белков в Andromeda использовали последовательности полного протеома человека из базы данных Uniprot (идентификатор UP000005640). В качестве постоянной модификации задавали карбамидометилирование цистеинов; ацетилирование N-конца белков и окисление метионинов задавали как переменные модификации. Максимальное допустимое отклонение между теоретическим и экспериментально измеренным значением m/z (отношения массы к заряду иона) было установлено на уровне 4.5 ppm для прекурсоров и 20 ppm для фрагментов. Допускалось до двух пропущенных сайтов протеолиза при обработке трипсином. Долю ложных идентификаций (FDR) устанавливали на уровне 1%. Для количественного анализа без использования стабильных изотопных меток (LFQ) использовали уникальные пептиды (соответствующие только одному белку); для пептидов, которые могут соответствовать нескольким белкам, алгоритмически подбирался наиболее вероятный белок.

3.19. Количественная ПЦР в реальном времени

Для проведения анализа количества митохондриальных мРНК использовали метод количественной ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Для этого из линии клеток человека выделяли РНК и получали комплиментарную ДНК, как описано выше.

Количественную ПЦР проводили с помощью набора SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix («BioRad», США) в 10 мкл, 0.5 мкл полученной кДНК использовали в качестве матрицы. Для каждой отдельной митохондриальной мРНК была подобрана пары праймеров таким образом, чтобы амплифицируемый участок имел длину не более 300 нуклеотидов. В качестве внутреннего контроля для нормировки данных на уровень экспрессии ядерно кодируемого гена использовали стабильно экспрессируемый (референсный) ген, кодирующий β -актин. Таким образом, с каждым образцом комплементарной ДНК ставили реакции с праймерами, специфичными к последовательностям, соответствующим зрелым мРНК митохондриально кодируемых генов и к последовательности, соответствующей транскрипту гена белка β -актин. Концентрация каждого праймера в реакционной смеси составляла 1 мкМ. Последовательности праймеров приведены в таблице 9.

Таблица 9. Олигонуклеотиды для анализа количества митохондриальных мРНК методом ПЦР в реальном времени.

| Название олигонуклеотида | Последовательность олигонуклеотида |
|--------------------------|------------------------------------|
| ATP6-Fw | CCATACACAACACTAAAGGACG |
| ATP6-Rv | GTGTAGGTGTGCCTTGTGG |
| ATP8-Fw | CCACCATAATTACCCCCATACTCC |
| ATP8-Rv | ATGGGCTTTGGTGAGGG |
| COX1-Fw | GGCACAGCTCTAAGCCTCC |
| COX1-Rv | CTCCGGCCTCCACTATAGC |
| COX2-Fw | CTACAAGACGCTACTTCCCC |
| COX2-Rv | CGATGAGGACTAGGATGATGGC |
| COX3-Fw | GCCCTCTCAGCCCTCC |
| COX3-Rv | GGCTCAGAAAAATCCTGCG |
| CYTB-Fw | AAAATTAATTAACCACTCATTCATCGACC |
| CYTB-Rv | CCGATGTGTAGGAAGAGGCAG |
| ND1-Fw | CCACCTCTAGCCTAGCCGTTTA |
| ND1-Rv | GGGTCATGATGGCAGGAGTAAT |
| ND2-Fw | CCAACCCGTCATCTACTCTACC |
| ND2-Rv | TGATGAGTATTGATTGGTAGTATTGG |
| ND3-Fw | ACACCCTCCTAGCCTTACTAC |
| ND3-Rv | GGATGACATAACTATTAGTGGCAGG |
| ND4-Fw | TATTACTACCACTGACATGACTTTCC |
| ND4-Rv | TTGTAGGGAGATTAGTATAGAGAGGTAGAG |
| ND5-Fw | CCTTACCACCCTCGTTAACCC |
| ND5-Rv | CACAGTGAGAATTCTATGATGGACC |
| ND6-Fw | TTGTTTCTGTTGAGTGTGGGTTTAG |
| ND6-Rv | CCCCCATGCCTCAGGATAC |
| RNR1-Fw | TAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGAT |
| RNR1-Rv | CGACCCTTAAGTTTCATAAGGGCTA |
| RNR2-Fw | GGAATAACCCCTATACCTTCTGC |
| RNR2-Rv | TTTAGAGGGTTCTGTGGGC |
| ACTIN-Fw | CACCATTTGGCAATGAGCGGTTC |
| ACTIN-Rv | AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT |

Каждая реакция проводилась в трех биологических повторностях; каждую биологическую повторность анализировали в трех технических повторностях. В качестве контроля на отсутствие геномной (как ядерной, так и митохондриальной) ДНК в образцах вместо комплементарной ДНК, как матрицу для ПЦР, использовали образец РНК.

ПЦР-смесь инкубировали при 95 °С 3 минуты, затем 40 циклов со следующим температурным режимом: 95 °С 10 секунд, 55 °С 10 секунд, 72 °С 10 секунд. Значения пороговых

циклов (Ct) были взяты из программного обеспечения CFX Maestro 2.0 (версия 5.0.021.0616). Количество мРНК, кодируемых митохондриальным геномом, относительно количества мРНК актина рассчитывали в программе Microsoft Excel по следующей формуле:

$$\Delta Ct = 2^{-(Ct(\text{мРНК}) - Ct(\text{актин}))},$$

где Ct(мРНК) – пороговое значение цикла для реакции с праймерами к митохондриальным мРНК; Ct(актин) – пороговое значение цикла для реакции с праймерами к гену β-актина.

Для амплификации использовали прибор CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System («BioRad», США). Такие соотношения были рассчитаны для всех указанных митохондриально кодируемых мРНК в клетках дикого типа и клетках, нокаутных по гену SLIRP. Планки ошибок для биологических реплик рассчитывали как стандартные отклонения (SD) в программе Microsoft Excel. Для статистического анализа применяли параметрический t-test с использованием R-Studio.

3.20. Биоинформатический анализ эволюционной истории

Аминокислотные последовательности белков ZMYND17 человека и Mss51 пекарских дрожжей были найдены в базе данных NCBI non-redundant (nr) protein database. Для поиска белков, гомологичных анализируемым белкам, использовали алгоритмы BLAST [122] на сайте NCBI [123] с ограничением поиска по таксономическим группам в базе данных NCBI non-redundant (nr) protein database, а также веб-сервис HMMER [124]. В ходе работы анализировали последовательности белков представителей различных групп эукариот, перечисленные в таблице 10.

Таблица 10. Идентификаторы последовательностей белков, использованных для филогенетического анализа. Перечень видов и идентификаторов последовательностей, использованных для филогенетического анализа. Во втором столбце приведены условные обозначения, используемые для соответствующих таксонов на рисунке 6А.

| Название вида | Название, соответствующее рисунку 6А | Идентификаторы (RefSeq ID или GenBank ID) |
|----------------------------------|--|---|
| <i>Furculomyces boomerangus</i> | Mss51 Furculomyces boomerangus Zoopagomycota | PVU90659.1 |
| <i>Gigaspora margarita</i> | Mss51 Gigaspora margarita Mucoromycota | KAF0491980.1 |
| <i>Laccaria amethystina</i> | Mss51 Laccaria amethystina Basidiomycota Agar | KIK06599.1 |
| <i>Lachnellula occidentalis</i> | Mss51 Lachnellula occidentalis Ascomycota Pezizomycotina | TVY47903.1 |
| <i>Microbotryum saponariae</i> | Mss51 Microbotryum saponariae Basidiomycota Puccin | SCZ97411.1 |
| <i>Mollisia scopiformis</i> | Mss51 Mollisia scopiformis Ascomycota Pezizomycotina | XP_018075436.1 |
| <i>Neolecta irregularis</i> | Mss51 Neolecta irregularis Ascomycota Taphrinomycotina | OLL24470.1 |
| <i>Rhizophagus clarus</i> | Mss51 Rhizophagus clarus Mucoromycota | GBC01307.1 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Mss51 Saccharomyces cerevisiae Ascomycota Saccharomycotina | NP_013304.1 |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | Mss51 Schizosaccharomyces pombe Ascomycota Taphrinomycotina | NP_594464.1 |
| <i>Smittium culicis</i> | Mss51 Smittium culicis Zoopagomycota | OMJ26599.1 |
| <i>Yarrowia sp</i> | Mss51 Yarrowia sp Ascomycota Saccharomycotina | KAG5365679.1 |
| <i>Laccaria amethystina</i> | MYND Laccaria amethystina Basidiomycota Agar | KIK01769.1 |
| <i>Chytrium confervae</i> | MYND Chytrium confervae Chytridiomycota | TPX77429.1 |
| <i>Gigaspora margarita</i> | MYND Gigaspora margarita Mucoromycota | KAF0340287.1 |

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей было получено при помощи алгоритма Mafft в программе Jalview [125]. Дерево гомологичных белков построено

методом Maximum likelihood в программе MEGA 7.0.21 [126] и укоренено в среднюю точку. Визуализацию проводили при помощи сервиса ITOL [127].

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

Сложная система регуляции экспрессии генов мтДНК и работы дыхательной цепи зависит от множества факторов и «диалога» между двумя компартментами: ядром и митохондрией. Дисфункция отдельных элементов этой сложной системы приводит к серьезным нарушениям митохондриального дыхания и клеточного метаболизма.

Данная работа посвящена изучению роли белков ZMYND17, SLIRP и PTCD2 в тонкой регуляции митохондриальной трансляции. Для функциональной характеристики исследуемых белков был применен комплексный экспериментальный подход, включающий получение клеточных линий с функциональной делецией в гене соответствующего белка и анализ фенотипа, ассоциированного с отсутствием изучаемого полипептида.

4.1. Получение линии клеток HeLa с делецией в гене *ZMYND17*

Для получения линий клеток человека HeLa с нефункциональным белком ZMYND17 использовалась система редактирования генома CRISPR-Cas9. Данная система работает следующим образом: нуклеаза Cas9, направляемая молекулой РНК, часть которой комплементарна участку последовательности гена-мишени, вносит двуцепочечный разрыв в ДНК гена. В процессе последующей репарации путем негомологичного соединения концов может происходить сдвиг рамки считывания, что приводит к потере функциональности белка.

Для внесения делеции в ген *ZMYND17* был выбран участок первого экзона, продукт трансляции которого присутствует во всех известных изоформах белка, при этом сохраняли нативный стартовый кодон, чтобы предотвратить появление альтернативных сайтов инициации трансляции и синтез усеченных форм. Длину удаляемого фрагмента подбирали таким образом, чтобы она не была кратна трем нуклеотидам и приводила к сдвигу рамки считывания с образованием нефункциональных продуктов.

Был получен вектор pCas9-IRES-EGFP, экспрессирующий РНК-управляемую эндонуклеазу Cas9 и зеленый флуоресцентный белок EGFP. Последовательности, кодирующие направляющие РНК, были клонированы в составе плазмидного вектора pU6-gRNA, где находились под контролем конститутивного U6 промотора.

Клетки дикого типа линии HeLa ко-трансфицировали плазмидами с компонентами CRISPR-Cas9 системы, затем с помощью клеточного сортера отбирали клетки, экспрессирующие зеленый флуоресцирующий белок и выводили моноклональные линии. Из клеток моноклональных линий выделяли ДНК и проводили анализ эффективности редактирования генома методом ПЦР. Продукты амплификации, соответствующие по молекулярной массе отредактированным участкам гена, анализировали секвенированием.

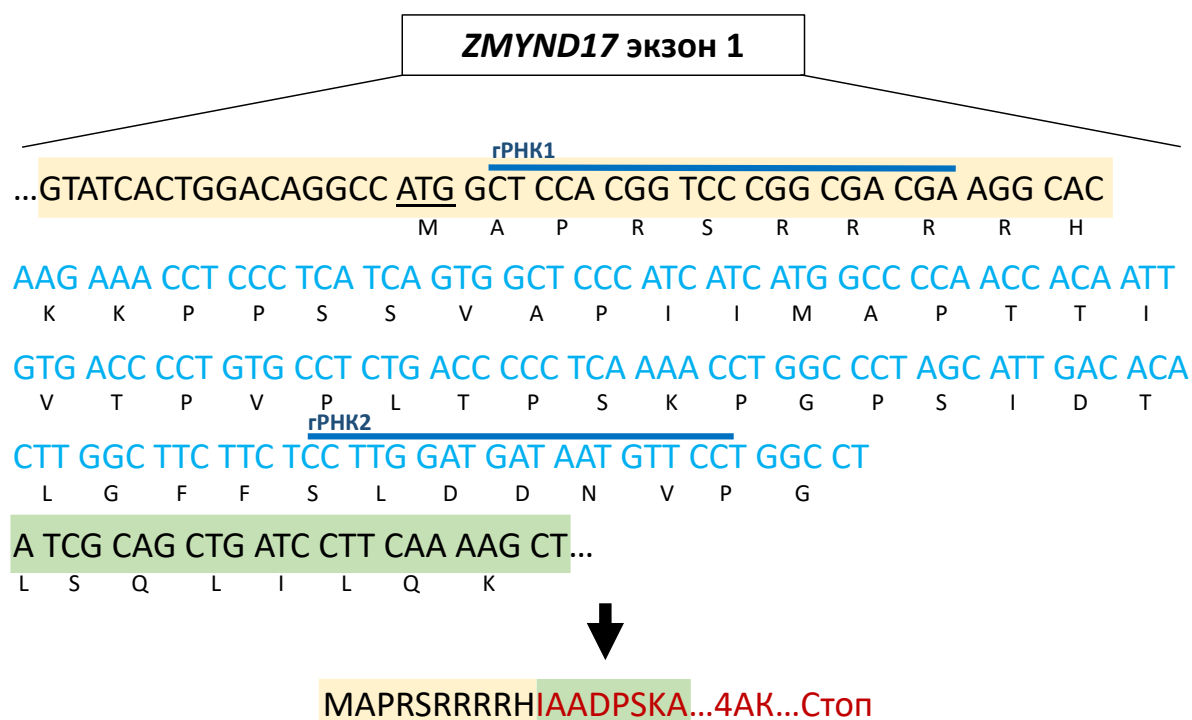


Рисунок 1. Схема внесения делеции в ген *ZMYND17*. Голубым цветом выделен делетированный участок гена.

Таким образом было отобрано 2 клонa, содержащих делецию в первом экзоне гена белка *ZMYND17*, отвечающую вышеописанным требованиям (рисунок 1). Длина удаленного участка составила 137 пар нуклеотидов, в отсутствие которых происходил сдвиг рамки считывания и образование стоп-кодона на расстоянии 40 пар нуклеотидов от места сдвига рамки.

4.2. Оценка эффективности митохондриальной трансляции в клетках человека с функциональной делецией в гене белка *ZMYND17*

В линии клеток, содержащей делецию в гене белка *ZMYND17* была оценена эффективность митохондриальной трансляции *in vivo* методом радиоактивного мечення митохондриально кодируемых полипептидов (рисунок 2).

Метод радиоактивного мечення был разработан в 1971 году и, с небольшими модификациями, до сих пор используется как единственный *in vivo* метод анализа синтеза митохондриальных белков [128]. Используемый в работе метод основан на включении метионина, содержащего радиоактивный изотоп серы ^{35}S , в растущие полипептиды. Присутствие ингибитора трансляции в цитозоле – циклогексимида – позволяет помечать только кодируемые митохондриальной ДНК белки. Реакцию мечення останавливали добавлением немеченой аминокислоты. После лизиса клеток и разделения белков электрофоретически в денатурирующих условиях гель высушивали. Радиоактивно меченные полипептиды затем визуализировали радиоавтографически. Таким образом, метод радиоактивного мечення

позволяет оценить индивидуальные и глобальные скорости синтеза белка в течение интервала мечения [129].

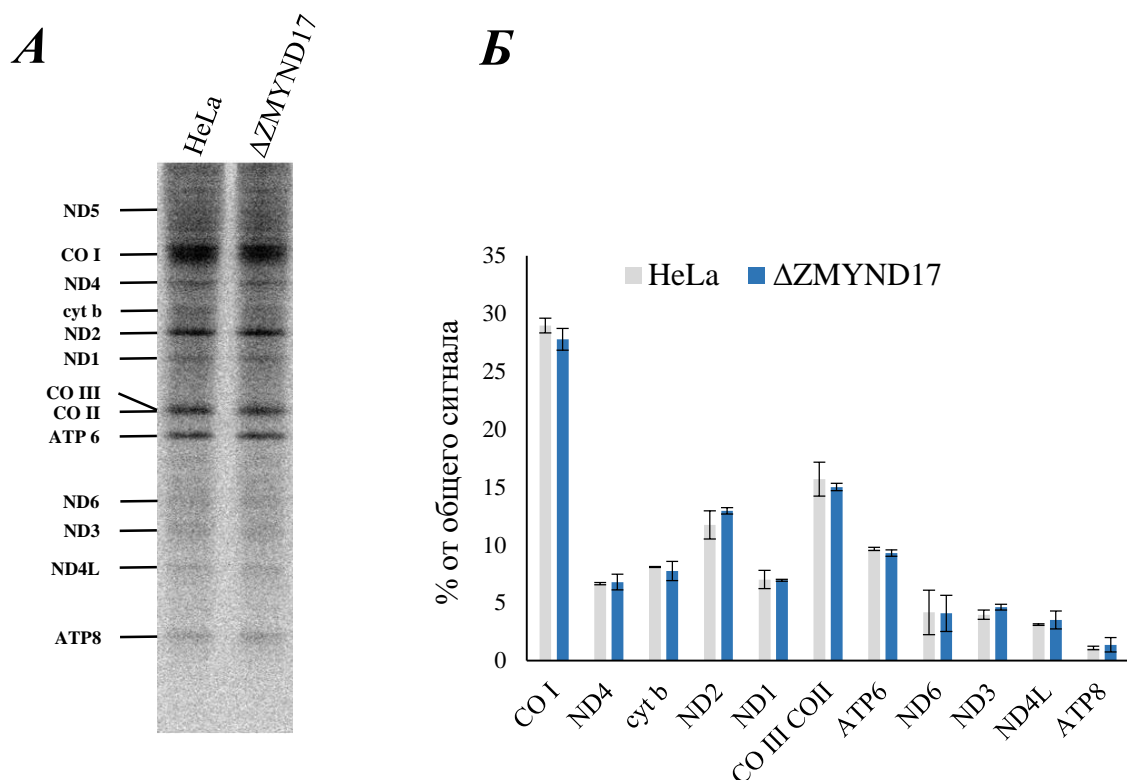


Рисунок 2. Анализ митохондриальной трансляции *in vivo*. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HeLa», из клеток нокаутной линии – «ΔZMYND17». **А)** Радиоавтограф продуктов митохондриальной трансляции. Радиоактивно меченные митохондриальные полипептиды обозначены слева. Представлен результат типичного эксперимента. **Б)** Гистограмма, отражающая средние значения эффективности трансляции для каждого митохондриально кодируемого белка (белки обозначены снизу). По вертикали – % от общего сигнала. Было проведено по 3 независимых эксперимента с каждой из двух полученных моноклональных линий клеток и с линией клеток дикого типа. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего значения ($M \pm SD$).

Исходя из полученных данных, отсутствие белка ZMYND17 не приводит к значимым изменениям эффективности синтеза ни одного из 13 митохондриально кодируемых белков.

4.3. Анализ скорости поглощения кислорода и активности цитохром с оксидазы в клетках с делецией в гене *ZMYND17*

Для оценки влияния отсутствия белка ZMYND17 на активность митохондриального дыхания полярографически при помощи электрода Кларка была измерена скорость поглощения кислорода клетками нокаутной линии и линии дикого типа.

Оценка скорости потребления кислорода клетками (OCR, Oxygen Consumption Rate) является ключевым методом изучения функциональной активности митохондрий. Базальное дыхание отражает базовый уровень интенсивности поглощения кислорода IV комплексом, необходимый для поддержания АТФ-продукции и других энергозависимых процессов в клетке. Для оценки максимального дыхания использовали разобщитель карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (CCCP), который устраняет протонный градиент. В присутствии разобщителя активность цитохром с оксидазы не ограничена протонным градиентом, в результате чего определяют максимально возможную скорость потребления кислорода. Добавление цианида калия ингибирует комплекс IV, в результате чего митохондриальное дыхание полностью блокируется.

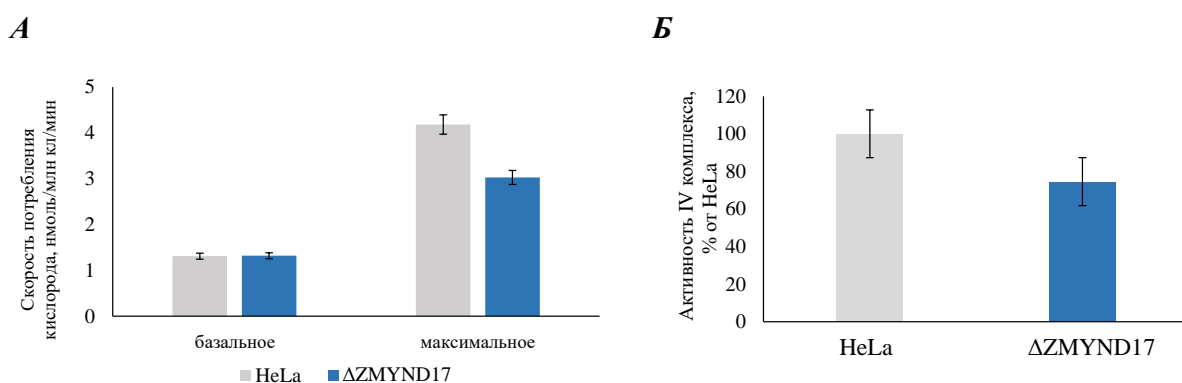


Рисунок 3. Митохондриальное дыхание и активность цитохром с оксидазы в клетках нокаутной по гену *ZMYND17* линии ($\Delta ZMYND17$) и линии дикого типа (HeLa). **А)** Скорость потребления кислорода, выраженная в нМ/10⁶ клеток/мин. Данные основаны на результатах четырех независимых экспериментов. **Б)** Активность цитохром с оксидазы в митохондриях. Представлены гистограммы, отражающие средние значения % активности IV комплекса от клеток HeLa, рассчитанные по результатам пяти независимых экспериментов. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего ($M \pm SD$).

По результатам проведенных измерений, уровень базального дыхания не различается у клеток нокаутной и исходной линий (рисунок 3А). Однако, отсутствие функционального белка *ZMYND17* приводит к снижению максимального (разобщенного) дыхания на ~27%, относительного такового у линии дикого типа. Уменьшение скорости потребления кислорода в присутствии разобщителя может свидетельствовать о нарушении активности цитохром с оксидазы.

Чтобы проверить, как влияет нокаут по гену *ZMYND17* на функционирование IV комплекса ЭТЦ, его активность была измерена спектрофотометрически в изолированных митохондриях мутантной и исходной линий клеток (рисунок 3Б). Согласно полученным данным,

действительно, в отсутствие ZMYND17 активность цитохром с оксидазы снижается на ~23% по сравнению с нормой.

4.4. Определение влияния делеции в гене *ZMYND17* на распределение активности НАДН-дегидрогеназы в суперкомплексах ЭТЦ различного порядка

Чтобы оценить взаимное влияние снижения активности цитохром с оксидазы, наблюдаемое в отсутствие ZMYND17, и формирования суперкомплексов, мы использовали Blue-Native электрофорез. Для этого образцы митохондрий, выделенные из нокаутной линии клеток и клеток дикого типа, солюбилизировали, а затем разделяли комплексы и суперкомплексы цепи переноса электронов электрофоретически в неденатурирующих условиях. Затем проводили качественную реакцию на активность НАДН-дегидрогеназы (рисунок 4).

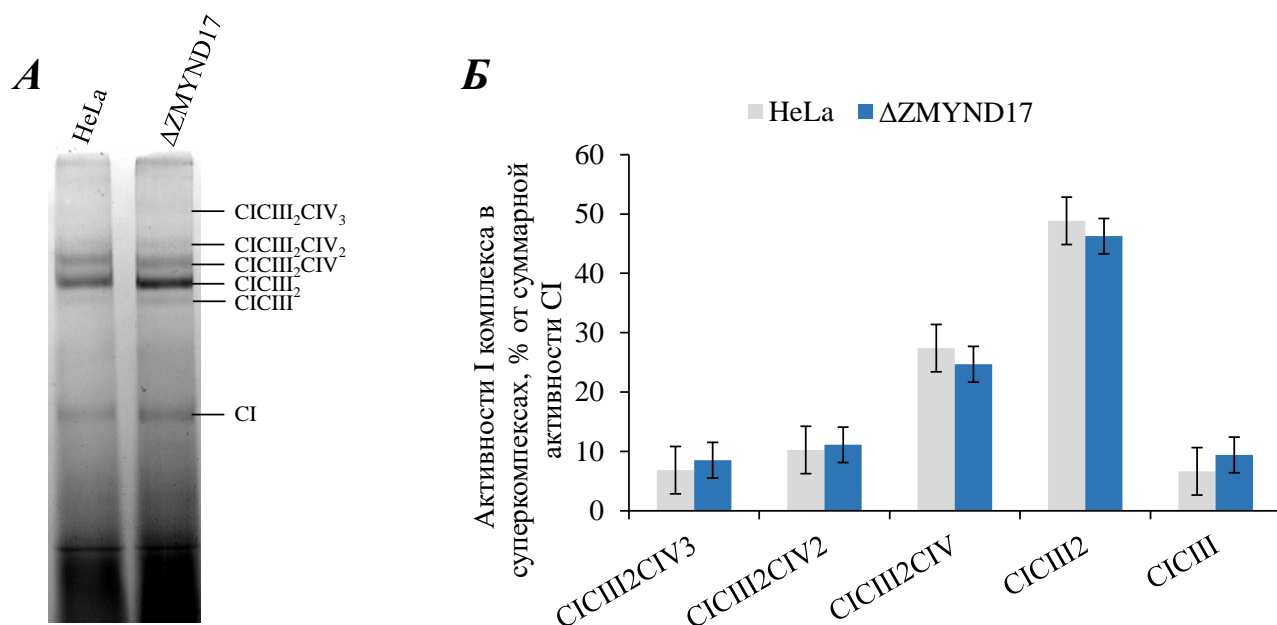


Рисунок 4. Активность НАДН-дегидрогеназы в митохондриях клеток исходной линии HeLa и нокаутной линии по гену *ZMYND17*. Суперкомплексы различной стехиометрии обозначены справа. **А)** Качественная реакция на активность НАДН-дегидрогеназы. Представлен результат типичного эксперимента. **Б)** Количественная оценка распределения активности НАДН-дегидрогеназы по суперкомплексам различного стехиометрического состава. Анализ проводили в трех повторностях. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего ($M \pm SD$).

В митохондриях клеток с нокаутом гена *ZMYND17* и исходной линии не было выявлено значимых различий в активности I комплекса электрон-транспортной цепи при анализе её распределения между суперкомплексами различной структурной организации.

4.5. Анализ активности в геле АТФ-синтазы в митохондриях клеток нокаутной и исходной линий клеток HeLa

Далее мы оценили субъединичный состав АТФ-синтазы, не входящей в состав суперкомплексов, в митохондриях клеток исходной линии HeLa и линии с делецией в гене *ZMYND17*.

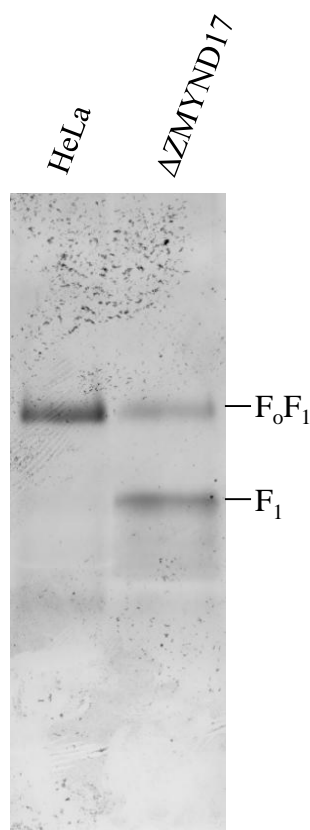


Рисунок 5. Качественная реакция на активность АТФ-синтазы митохондрий клеток исходной линии HeLa (HeLa) и нокаутной линии по гену *ZMYND17* (Δ ZMYND17) в геле после нативного электрофореза. Субъединицы АТФ-синтазы обозначены справа. Представлен результат типичного эксперимента.

Оказалось, что в митохондриях мутантной линии клеток активность полного F₀F₁-фермента снижено относительно такового в митохондриях дикого типа, в то время как количество свободной F₁ субъединицы существенно увеличено (рисунок 5).

4.6. Биоинформатический анализ эволюции белков Mss51 и ZMYND17

По данным литературы известно, что белок человека ZMYND17 – ортолог белка Mss51 пекарских дрожжей. Однако, по полученным нами данным и данным литературы, в отличие от Mss51, отсутствие ZMYND17 не приводит к снижению количества синтезируемого Cox1 и не влияет на сборку суперкомплексов дыхательной цепи. Чтобы выяснить, чем обусловлены различия в функциях двух белков, мы проследили эволюцию этих полипептидов с помощью

методов биоинформатики, так как подробное изучение эволюционного происхождения Mss51 и ZMYND17 не проводилось.

Глобальное парное выравнивание показало, что белки Mss51 и ZMYND17 имеют всего 19% идентичных аминокислот (94/504). Белок Mss51 дрожжей *S. cerevisiae* содержит одноименный домен, а ZMYND17 – домен MYND, относящиеся к суперсемейству TRASH (Pfam ID: CL0175). Суперсемейство объединяет домены, содержащие консервативные остатки цистеина, включая домены типа «цинковый палец», такие как zf-Mss51 (Pfam ID: PF13824) и zf-MYND (Pfam ID: PF01753).

В ходе биоинформатического анализа белки, гомологичные дрожжевому Mss51 и человеческому ZMYND17, были найдены в транслированных геномах представителей крупных супергрупп эукариот (Archaeplastida, Excavata, «SAR», Unikonta), что может указывать на то, что последний общий предок эукариот (LECA; Last Eukaryote Common Ancestor) также имел белок, гомологичный исследуемым.

Далее внимание было сосредоточено на супергруппе Unikonta, а именно на группе Obazoa, объединяющей таксоны Breviatea, Apusomonadida и Opisthokonta, к которой относятся и пекарские дрожжи, и млекопитающие. Белки, гомологичные дрожжевому Mss51 и человеческому ZMYND17, были найдены в транслированных геномах различных представителей группы Opisthokonta и транслированном геноме одного представителя Apusomonadida – *Thecamonas trahens*. На основании анализа этих белковых последовательностей был восстановлен предположительный сценарий эволюции белков, гомологичных исследуемым, а также сценарий эволюции доменной архитектуры.

Были выбраны 24 аминокислотные последовательности гомологичных белков, принадлежащих представителям различных групп царства грибов, а также представителю таксона Apusomonadida, *Thecamonas trahens*, таксона Ichthyosporea, *Sphaeroforma arctica*, и представителя Choanoflagellata, *Monosiga brevicollis*.

При помощи алгоритма Mafft было получено множественное выравнивание отобранных последовательностей. На рисунке 6А представлено дерево гомологичных белков, построенное на основании выравнивания первичных структур отобранных белков. Дерево белков построено методом Maximum likelihood и укоренено в среднюю точку. Последовательности белков обозначены названием домена, содержащимся в белке, названием вида, к которому относится данный белок, и названием таксономической группы.

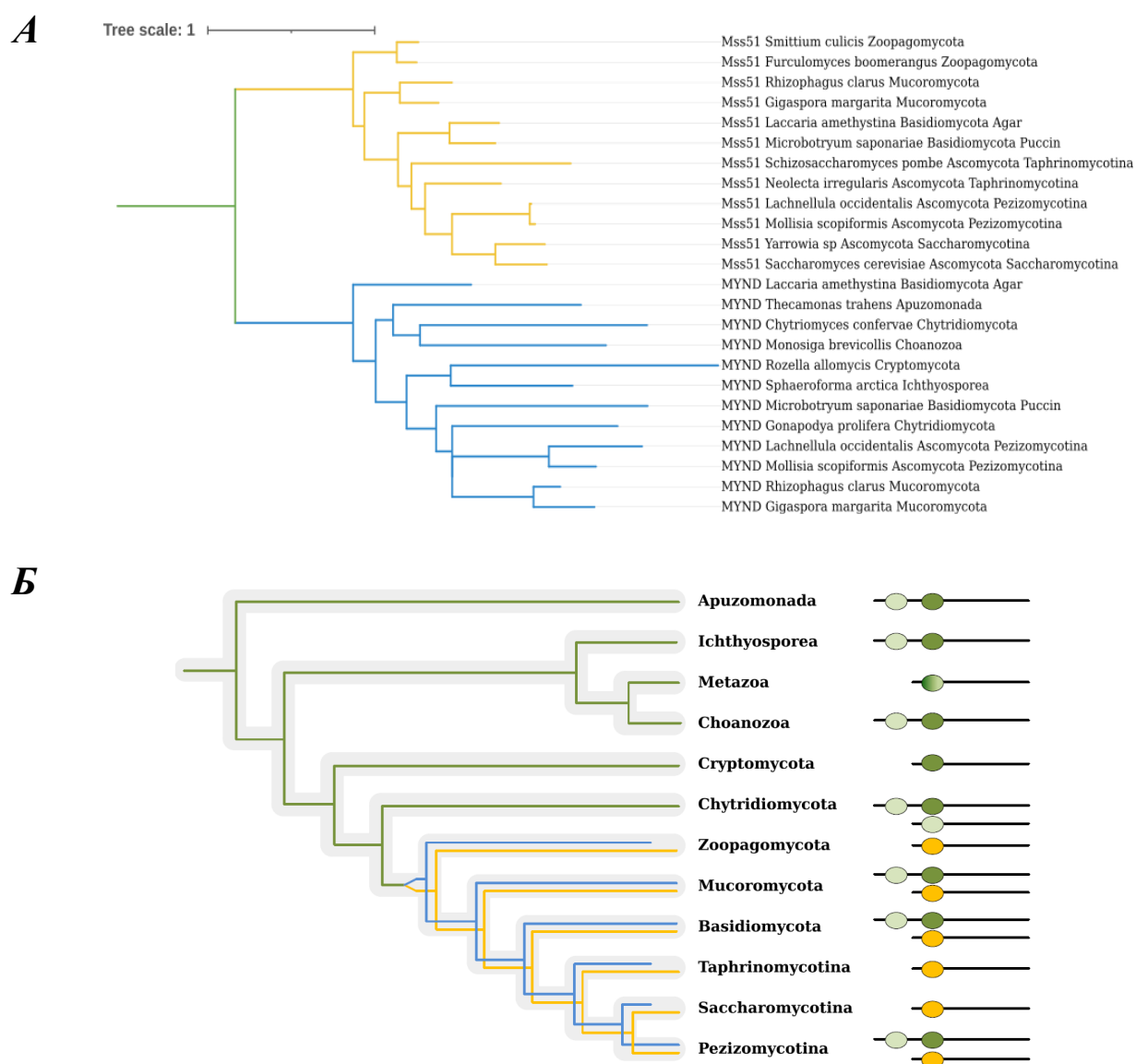


Рисунок 6. Биоинформатический анализ белков, гомологичных Mss51 и ZMYND17. **A)** Дерево гомологичных белков, построенное методом Maximum likelihood и укорененное в среднюю точку. Клада, объединяющая белки, содержащие домен zf-Mss51, выделена желтым; белки, содержащие домен zf-MYND – синим, точка укоренения – зеленым. Последовательности белков обозначены названием домена, содержащимся в белке, названием вида, к которому относится данный белок, и названием таксономической группы. **Б)** Схема эволюционной истории гомологичных Mss51 и ZMYND17 белков и доменная архитектура, характерная для различных групп. Зеленым обозначены клады, содержащие белок с доменом zf-MYND до дубликации соответствующего гена. Желтым и синим обозначены клады, содержащие белки с доменами zf-Mss51 и zf-MYND, соответственно, после дубликации соответствующего гена. Зеленые и светлозеленые овалы – домены zf-MYND, желтые овалы – домены zf-Mss51.

На дереве (рисунок 6А) выделяются две клады: клада белков, содержащих домен zf-Mss51 (включает также дрожжевой белок Mss51), и клада белков, содержащих домен zf-MYND. Первая клада включает только белки представителей царства грибов, в то время как во второй кладе присутствуют как белки грибов, так и видов других групп.

Такая топология дерева гомологичных белков говорит о линей-специфичной дупликации (lineage specific duplication) – дупликации гена предкового белка, произошедшая внутри клады грибов после дивергенции с группой Holozoa.

На рисунке 6Б схематично изображена эволюционная история белков, гомологичных дрожжевому Mss51 и человеческому ZMYND17, а также доменная архитектура белков, характерная для различных групп.

Исходя из полученных данных, вероятно, белок общего предка групп Arusomonadida и Opisthokonta имел два домена zf-MYND (на рисунке 6Б обозначены зелеными овалами). Основываясь на анализе последовательностей одного белка *Sphaeroforma arctica*, представителя Ichthyosporea и одного белка *Monosiga brevicollis*, представителя Choanoflagellata (единственные найденные белки из этих групп, гомологичные исследуемым), можно предположить, что в рано дивергировавших ветвях клады Holozoa гомологичные исследуемым белкам сохраняют также два домена zf-MYND. Далее в процессе эволюции один из доменов zf-MYND был утрачен, причем какой именно, установить не удалось (на рисунке 6Б обозначен овалом смешанного зеленого цвета).

Гомолог изучаемых белков был найден у одного представителя рано дивергировавшей ветви филогенетического дерева грибов Cryptomycota – *Rozella allomycis*. Расположенный ближе к N-концу (относительно предкового белка) домен zf-MYND, вероятно, был потерян. В группе Chytridiomycota некоторые виды сохранили оба домена zf-MYND, в то время как некоторые утратили домен, располагающийся ближе к C-концу (относительно предкового белка). «Выше по дереву» произошла дупликация гена исходного белка, в результате чего образовалось 2 паралогичных белка, которые затем эволюционировали независимо. Такие белки-паралоги обнаружены в отделах Mucoromycota, Ascomycota и Basidiomycota. Одна группа паралогов сохранила доменную архитектуру, характерную для предкового белка, а также характеризуется бóльшим процентом идентичных аминокислот. Во второй группе паралогов произошла перестройка доменной архитектуры, заключающаяся в потере одного из доменов zf-MYND (вероятно, располагающегося ближе к N-концу относительно предкового белка), в то время как последовательность второго «цинкового пальца» стала характерной для домена zf-Mss51. Именно к такой группе паралогов принадлежит белок Mss51 *S. cerevisiae*.

Стоит отметить, что в отделе Zoopagomycota белок, относящийся к 1 группе, то есть содержащий 2 домена zf-MYND, был потерян. Среди подотделов Ascomycota только

представители *Pezizomycotina* сохранили оба паралога. Представители *Taphrinomycotina* и *Saccharomycotina* в процессе эволюции утратили белки, относящиеся к первой группе, то есть содержащие домены zf-MYND. В группе *Ustilagomycotina*, относящейся к *Basidiomycota*, потерян белок с доменом zf-MYND; на рисунке 6 эта информация не отражена.

Белок Mss51 *S. cerevisiae* является гем-связывающим белком. Одноименный домен белка Mss51 содержит два Cys-Pro-X мотива, которые играют ключевую роль в связывании гемма. Белки второй группы паралогов, содержащие домен Mss51, также имеют два таких мотива, что может говорить о сходстве их функций с функциями белка пекарских дрожжей.

Два zf-MYND-домена, содержащихся в одном белке различаются между собой. Для белка представителя *Arbusomonadida*, *Thecamonas trahens*, и белков второй группы паралогов представителей царства грибов характерно наличие одного Cys-Pro-X мотива в домене, располагающегося ближе к С-концу.

Таким образом, белки человека ZMYND17 и пекарских дрожжей Mss51, произошли от общего предкового белка и являются ортологами. В процессе эволюции последовательности этих белков претерпели значительные изменения, также произошла перестройка доменной архитектуры, в результате чего белки стали выполнять разные функции.

4.7. Получение линии клеток HEK293T с делецией в гене *SLIRP*

Моноклональная линия клеток HEK293T с делецией в гене *SLIRP* была получена с использованием системы CRISPR-Cas9 по аналогичной с предыдущим экспериментом методике. В первом экзоне гена был удален участок длиной 32 пары нуклеотидов, что привело к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона при сохранении стартового (рисунок 7А).

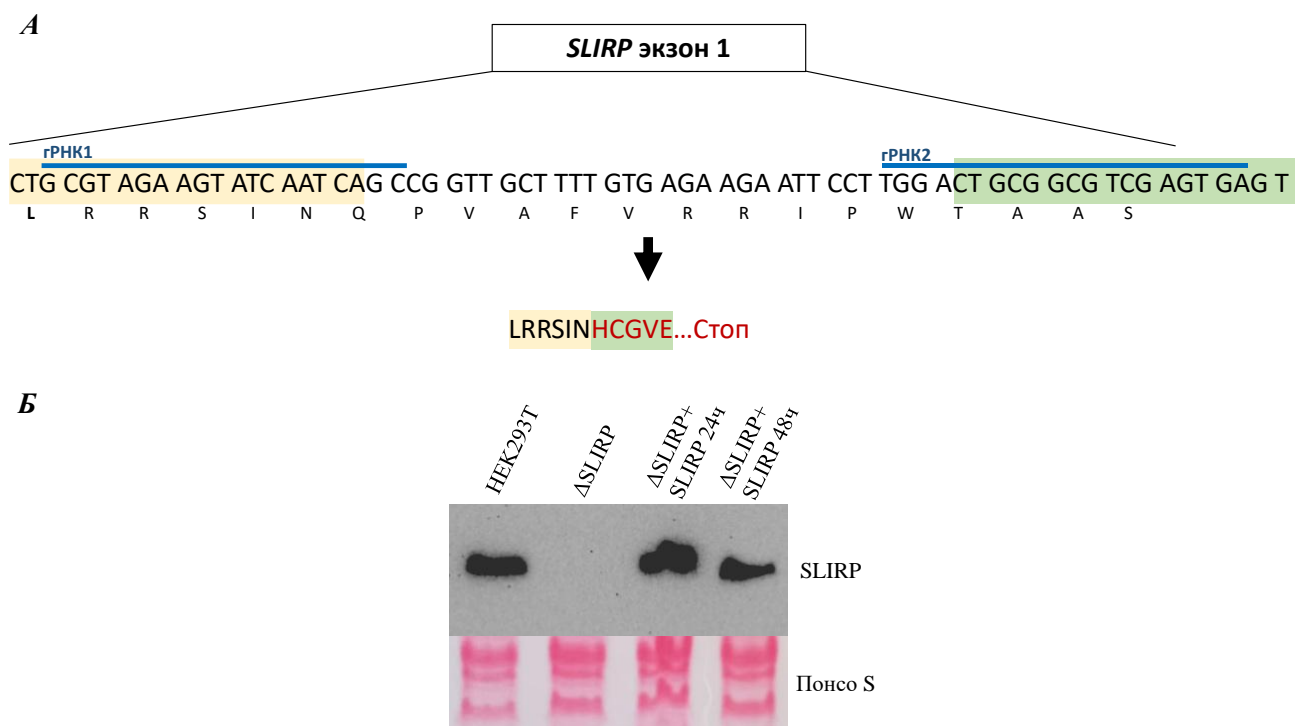


Рисунок 7. А) Схема внесения делеции в ген *SLIRP*. Голубым цветом выделен делетированный участок гена. **Б)** Визуализация иммуноблоттинга с антителами против белка *SLIRP* и участок соответствующего геля, покрашенный Понсо S. «HEK293T» обозначен образец, полученный из клеток дикого типа. « Δ SLIRP» – нокаутной по гену *SLIRP* линии. « Δ SLIRP + SLIRP 24ч» и « Δ SLIRP + SLIRP 48ч» – линии, с восстановленной экспрессией гена *SLIRP*, через 24 и 48 часов после трансфекции, соответственно.

Отсутствие полноразмерного белка *SLIRP* в мутантной линии верифицировали методом иммуноблоттинга (рисунок 7Б).

Для оценки специфичности наблюдаемого фенотипа в ходе дальнейших экспериментов была создана линия клеток с временной экспрессией *SLIRP*. Для этого кодирующую последовательность гена *SLIRP* клонировали в составе плазмидного вектора pcDNA5/FRT/TO. После трансфекции нокаутной по гену *SLIRP* линии клеток количество белка оценивали с помощью иммуноблоттинга.

Результаты иммуноблоттинга показали, что через 24 и 48 часов после индукции количество белка *SLIRP* достигает уровня, характерного для нередактированной клеточной линии (рисунок 7Б).

4.8. Анализ скорости поглощения кислорода, продукции АТФ и пролиферативной активности при функциональной делеции в гене *SLIRP*

С помощью анализатора клеточного метаболизма Seahorse XF HS MINI проанализировали митохондриальные функции клеток дикого типа, нокаутной линии и линии с временной экспрессией *SLIRP*. Для этого определили скорости потребления кислорода клетками в ответ на

последовательное добавление олигомицина (ингибитора F_0 -субъединицы АТФ-синтазы), разобщителя карбонилцианида 4-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP), ротенона и антимицина А (ингибиторов комплексов I и III ЭТЦ, соответственно) (рисунок 8). Разница между базальным и олигомицин-ингибированным дыханием характеризует проницаемость внутренней мембраны для протонов вне связи с АТФ-синтазой, а разница между максимальным и базальным дыханием представляет собой запасную дыхательную емкость митохондрий. Добавление ротенона блокирует комплекс I, а антимицина А – комплекс III, таким образом ингибируя поглощение кислорода митохондриями в целом.

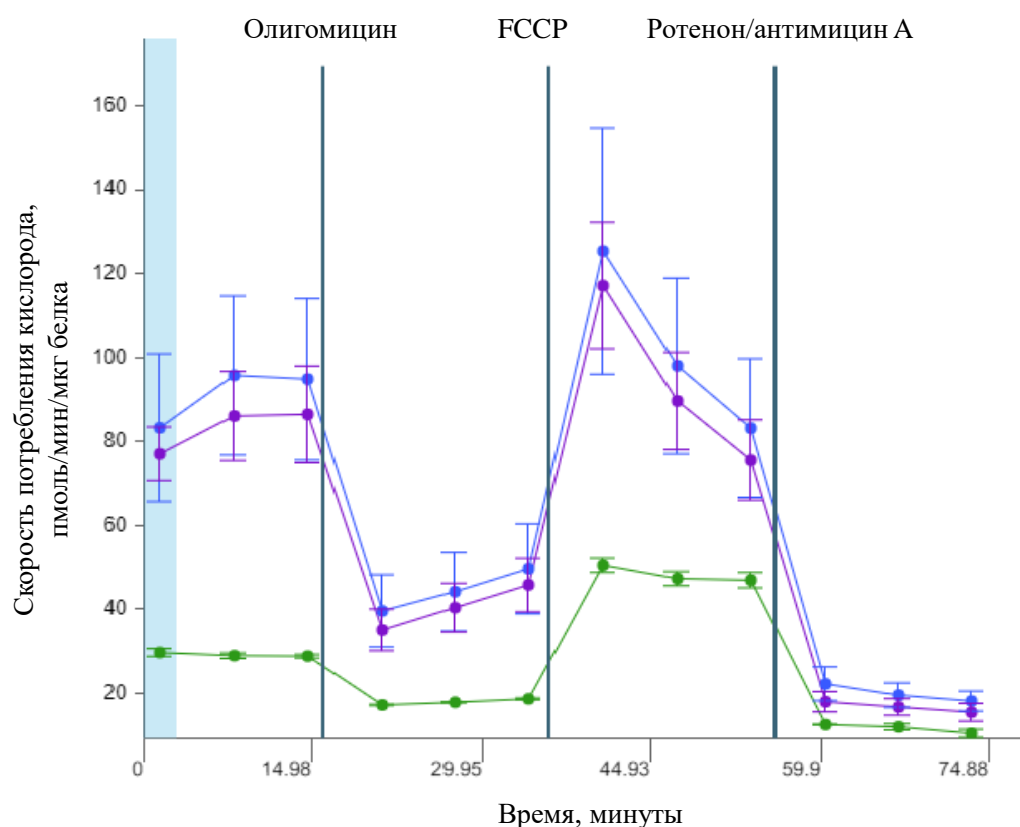


Рисунок 8. Анализ митохондриального дыхания с помощью биоанализатора Seahorse XF HS Mini. На графике представлена кинетика потребления кислорода (OCR) клетками в нормальных условиях и после добавления олигомицина, FCCP и ротенона/антимицина А (указаны сверху). Точки соответствуют измерениям OCR, соединены линейной интерполяцией. Синей линией показаны результаты измерения для клеток дикого типа, зеленой - нокаутных клеток по гену *SLIRP*, фиолетовой - нокаутных клеток по гену *SLIRP* с восстановленным уровнем экспрессии гена *SLIRP*. Данные представлены как средние значения по результатам анализа трех биологических реплик. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего значения ($M \pm SD$). Значения нормализовали на общее содержание белка, определенное методом Брэдфорда.

Согласно полученным данным, в отсутствие белка SLIRP снижено как базальное, так и максимальное митохондриальное дыхание, по сравнению с нормой. Уменьшение скорости потребления кислорода в присутствии разобщителя свидетельствует о нарушении функциональности цитохром с оксидазы. Также было продемонстрировано, что восстановление количества функционального белка SLIRP в нокаутной линии восстанавливает метаболический фенотип. Полученные результаты свидетельствуют о критической роли белка SLIRP в поддержании нормальной функции дыхательной цепи митохондрий.

При помощи Seahorse XF HS MINI мы также оценили скорость синтеза АТФ, сопряженного с митохондриальным дыханием (рисунок 9).

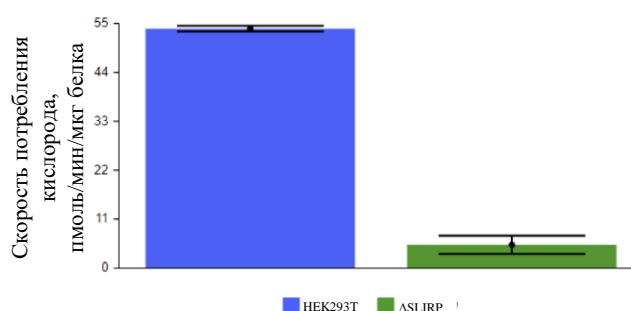


Рисунок 9. Анализ скорость продукции АТФ, сопряженного с дыханием. Высота столбцов гистограммы соответствует разности между скоростью потребления кислорода в базальных условиях и в присутствии ингибитора АТФ-синтазы, олигомицина. Измерения проводили с помощью биоанализатора Seahorse FX Mini. Представлены усредненные данные, полученные по результатам трех независимых экспериментов. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего значения ($M \pm SD$). Значения нормализовали на общее содержание белка, определенное методом Брэдфорда.

По результатам измерений, митохондриальная продукция АТФ в клетках, нокаутных по гену *SLIRP*, снижена более чем в пять раз, по сравнению с таковой в клетках дикого типа.

Также мы сравнили пролиферативную активность клеток дикого типа и мутантной линии. Для этого инкубировали клетки соответствующих линий в среде с высоким содержанием глюкозы и в среде, содержащей галактозу. Каждые 24 часа измеряли количество жизнеспособных клеток методом исключения трипанового синего с использованием автоматического клеточного счетчика (рисунок 10).

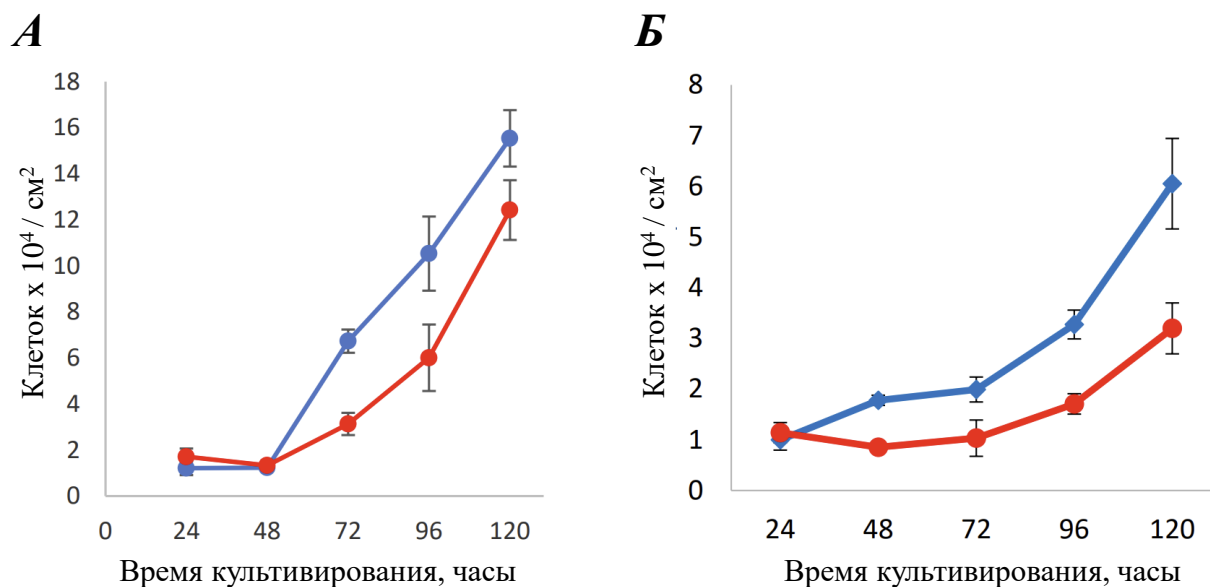


Рисунок 10. Кинетика пролиферации клеточных линий на среде, содержащей глюкозу (А) и галактозу (Б). На графике представлена зависимость количества клеток (по вертикальной оси) от времени культивирования (по горизонтальной оси). Точки соответствуют средним значениям количества клеток, соединены линейной интерполяцией. Синяя кривая соответствуют линии клеток дикого типа, красная – нокаутной по гену *SLIRP* линии. Представлены усредненные данные трех независимых биологических повторностей. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего значения ($M \pm SD$). Значения нормализовали на количество клеток, измеренное методом исключения трипанового синего с помощью автоматического счетчика клеток TC-20.

При культивировании в галактозосодержащей среде нокаутные по гену *SLIRP* клетки демонстрировали значительное снижение скорости пролиферации по сравнению с клетками дикого типа. Аналогичный эффект наблюдался и в среде, содержащей глюкозу в качестве источника углерода, в течение первых 96 часов культивирования. Однако после 120 часов инкубации различия нивелировались, и количество клеток нокаутной линии достигало значений, сопоставимых с контролем.

Результаты оценки скорости роста клеток различных линий и сопряженной с митохондриальным дыханием продукции АТФ позволяют предположить, что для удовлетворения энергетических потребностей клетки происходит переключение энергетического метаболизма преимущественно на гликолитический путь.

4.9. Оценка эффективности биосинтеза белка в митохондриях методом биоортогональной клик-химии

Мечение радиоактивными аминокислотами имеет ряд недостатков, таких как высокая цена, сложность синтеза и быстрый распад самого изотопа ^{35}S , опасность работы с радиацией, длительное время, необходимое для визуализации (в некоторых случаях до 10 дней). В данной работе, помимо радиоактивного мечения, мы также использовали более быстрый, недорогой и безопасный метод для анализа митохондриальной трансляции *in vivo* с помощью биоортогональной клик-химии.

Биоортогональные функциональные группы используются для мечения белков и других макромолекул *in vivo* [130]. Азиды и алкины являются одними из наиболее распространенных реакционноспособных групп, используемых для мечения, благодаря их коммерческой доступности и простоте проведения клик-реакции [131]. Эти молекулы стабильны, не нарушают внутреннее биохимические и молекулярные процессы в клетках и не участвуют в побочных реакциях. В результате катализируемого медью азидо-алкинового циклоприсоединения, биомолекула и экзогенная визуализируемая метка, содержащие реактивные группы, ковалентно связываются друг с другом.

Возможность использования широкого спектра флуорофоров или других репортеров, а также различные методы визуализации делают клик-химию мощным инструментом для анализа биомолекул. В исследовании мы использовали гомопропаргилглицин (HPG) – неканоническую аминокислоту, содержащую алкиновый остаток. Как и канонические аминокислоты, HPG транспортируется в митохондрии, при этом активируется митохондриальной метионил-тРНК-синтетазой [132]. Поэтому процедура мечения митохондриально кодируемых полипептидов HPG проводится аналогично описанному выше радиоактивному мечению. Последующая конъюгация с флуоресцентным зондом AF488-азид позволяет визуализировать в геле новосинтезированные полипептиды, кодируемые в митохондриях, минуя сушку и длительную экспозиции с люминофорным экраном.

Чтобы выявить влияние делеции в гене *SLIRP* на эффективность синтеза белка в митохондриях, использовали описанный выше метод мечения митохондриально кодируемых полипептидов HPG с последующей визуализацией с помощью флуорофора AF488 (рисунок 11А).

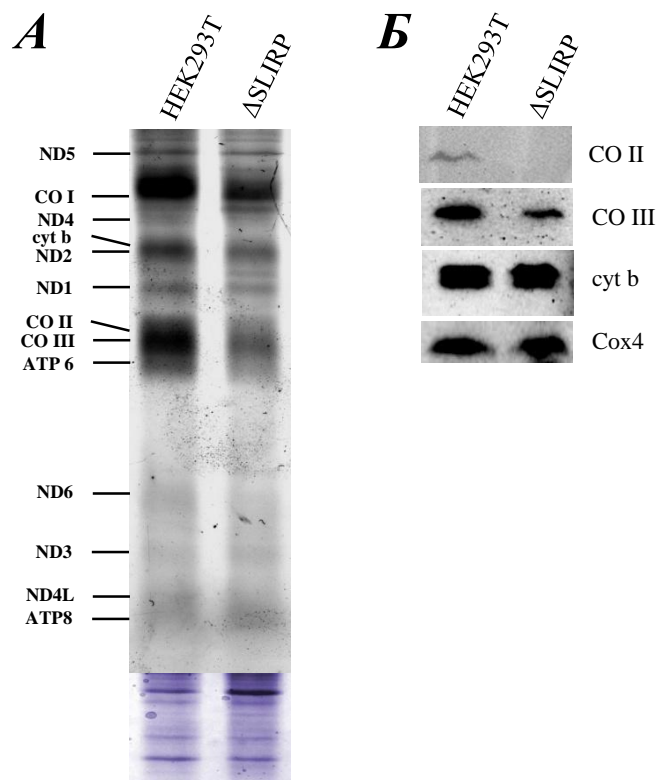


Рисунок 11. Анализ митохондриальной трансляции. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HEK293T», из клеток нокаутной линии – « Δ SLIRP». Представлены результаты типичных экспериментов. **А)** Флуоресцентная визуализация продуктов митохондриальной трансляции (сверху) и участок соответствующего геля, покрашенного кумасси (снизу). Флуоресцентно меченные митохондриальные полипептиды обозначены слева. **Б)** Иммуноблоттинг клеточных лизатов с антителами, специфичными к митохондриально кодируемым белкам COII, COIII, CytB и ядерно кодируемому Cox4 (указаны справа). Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

Для сравнения количества митохондриально кодируемых белков ЭТЦ в органеллах линии дикого типа и мутантной линии, провели иммуноблоттинг. Использовали специфические антитела к COII и COIII (субъединицы цитохром с-оксидазы), цитохрому b (коровый компонент комплекса III). В качестве контроля использовали ядерно кодируемую субъединицу IV комплекса Cox4 (рисунок 11Б).

Результаты экспериментов указывают на селективное нарушение эффективности трансляции в митохондриях при нокауте по гену *SLIRP*. Отсутствие SLIRP приводит к значительному уменьшению количества новосинтезированных компонентов комплекса IV: CO I, CO II и COIII, но не влияет на количество ядерно кодируемого Cox4. Эффективность синтеза других белков либо не отличалась от таковой в интактной линии клеток, например, цитохрома b, либо была снижена незначительно.

4.10. Оценка количества и активности комплексов дыхательной цепи митохондрий в отсутствие белка SLIRP

Для комплексной оценки влияния нокаута гена *SLIRP* на состав и функциональную активность отдельных комплексов ЭТЦ использовали Blue-Native электрофорез. После разделения комплексов в нативных условиях, проводили визуализацию активностей НАДН-дегидрогеназы и АТФ-синтазы в геле (рисунок 12А). Для определения количества отдельных комплексов также использовали иммуноблоттинг с антителами к их ключевым субъединицам (рисунок 12Б).

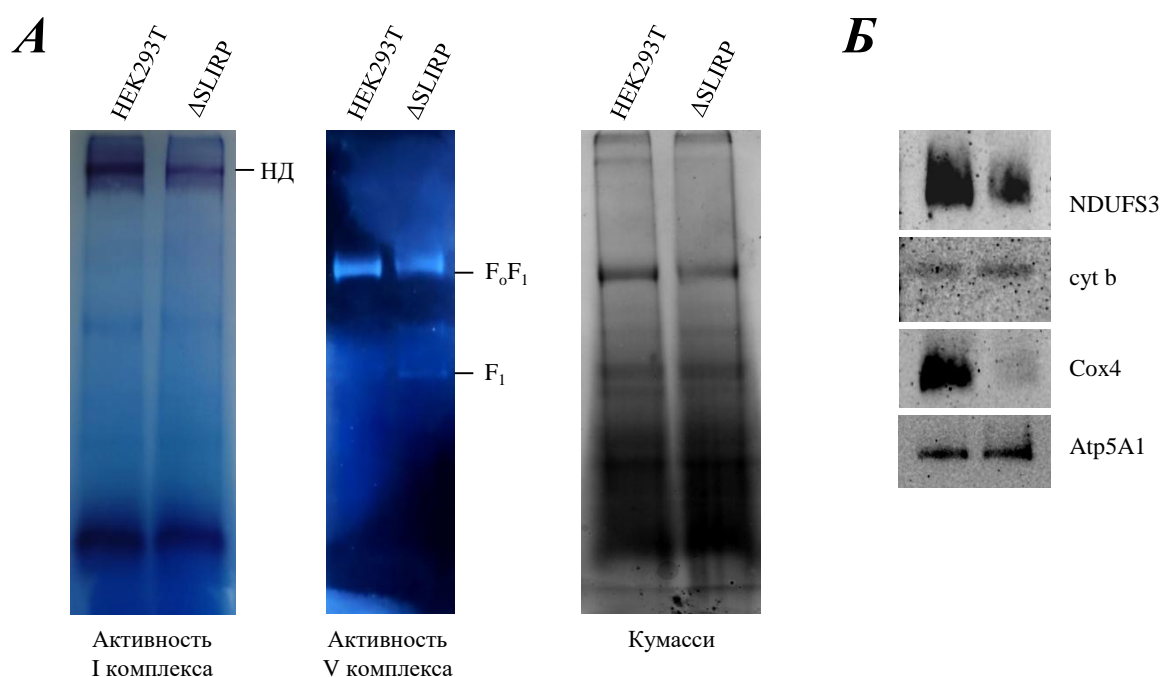


Рисунок 12. Анализ количества и активности комплексов и суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HEK293T», из клеток нокаутной линии – « Δ SLIRP». Представлены результаты типичных экспериментов. **А)** Качественная реакция на активность НАДН-дегидрогеназы (НД, слева), АТФ-синтазы (посередине) и окраска кумасси (справа) после нативного электрофореза. **Б)** Иммуноблоттинг нативных комплексов дыхательной цепи с антителами, специфичными к субъединицам комплексов дыхательной цепи митохондрий: NDUF5S3, CytB, Cox4 и Atp5A1 (указаны справа). Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

Согласно полученным данным, делеция в гене *SLIRP* приводит к критическому снижению количества IV комплекса, что согласуется с результатами респираторных тестов. Более того, снижение количества белка *SLIRP* в клетках существенно влияет на комплекс I, приводя к почти двукратному снижению его количества и, как следствие, активности в сравнение с контрольной

линией клеток. Также наблюдалось увеличение количества свободной F₁-субъединицы V комплекса. Тем не менее, количество III комплекса не коррелировало с количеством SLIRP в клетках с делецией в гене этого белка в сравнение с клетками дикого типа.

4.11. Сравнение количества митохондриальных транскриптов в клетках линий с нокаутом по гену *SLIRP* и дикого типа

Поскольку комплекс LRPPRC-SLIRP известен как фактор стабильности митохондриальных мРНК [94], мы сравнили количество индивидуальных транскриптов в митохондриях клеток дикого типа и нокаутной по гену *SLIRP* линии с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве матрицы использовали комплементарную ДНК, полученную с помощью обратной транскрипции. На рисунке 13 представлены средние результаты ПЦР-анализа в реальном времени экспрессии белок кодирующий генов и генов рРНК, закодированных мтДНК.

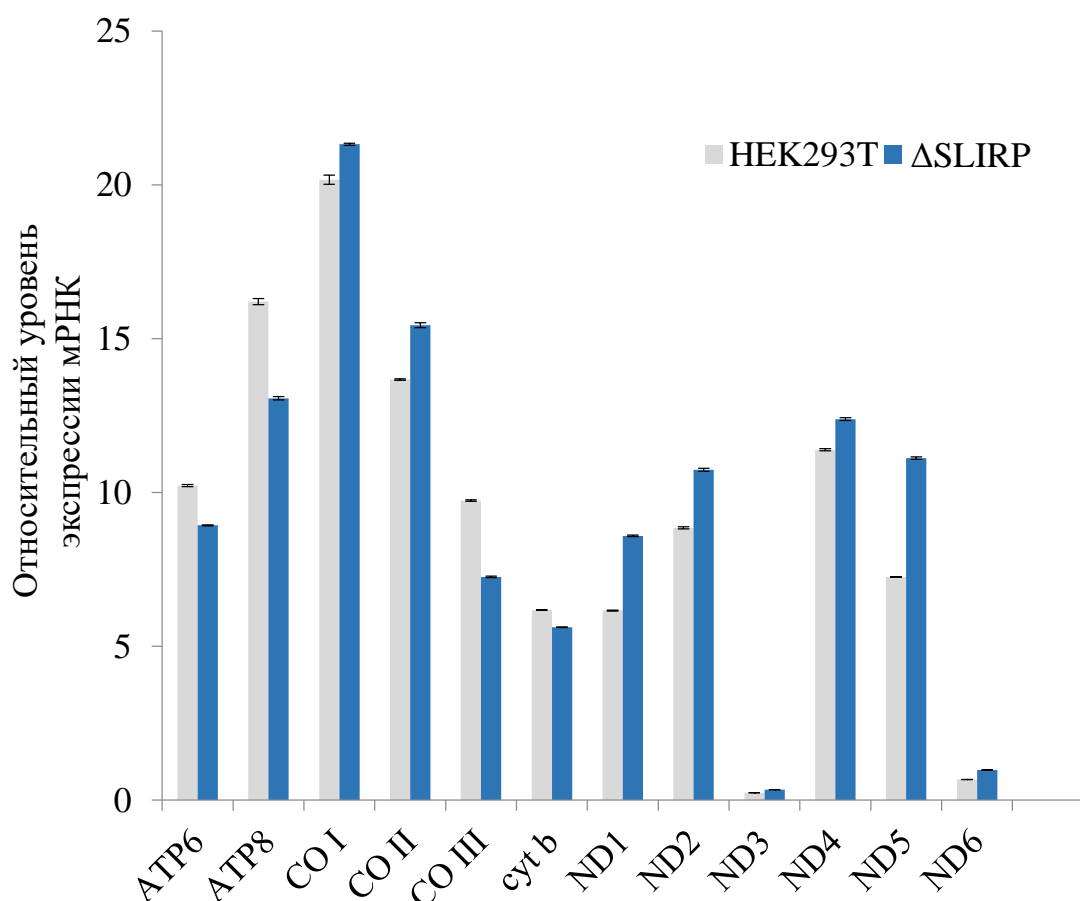


Рисунок 13. Анализ количества митохондриальных транскриптов методом ПЦР в реальном времени. Высота столбцов гистограммы соответствует относительному количеству мРНК митохондриальных генов, нормализованному по уровню экспрессии ядерно кодируемого гена белка β -актин. Данные приведены для двух клеточных линий: контрольной (HEK293T) и с нокаутом целевого гена (Δ SLIRP). Эксперимент выполняли в трех биологических повторностях с тремя техническими репликами для каждой. Для контроля возможной контаминации геномной ДНК (как ядерной, так и митохондриальной) в качестве матрицы в параллельных реакциях использовали тотальную РНК без этапа обратной транскрипции. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего значения ($M \pm SD$), вычисленные для трех биологических реплик. Во всех случаях стандартное отклонение между техническими повторностями не превышало 1%. Статистический анализ с использованием непарного t-критерия Стьюдента для каждой исследуемой мРНК показал отсутствию достоверных различий между сравниваемыми образцами (p -значения >0.05).

Проведенный анализ не выявил статистически значимых различий в уровне митохондриальных транскриптов между клетками исходной и нокаутной линиями.

4.12. Анализ соосаждения белка SLIRP с миторибосомами

По данным криоэлектронной микроскопии SLIRP в комплексе с LRPPRC ассоциирован с малыми субъединицами митохондриальных рибосом. Для верификации этого утверждения мы также провели эксперимент по со-осаждению белка SLIRP с миторибосомами с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Для этого клетки лизировали, осветленный лизат затем наслаивали на линейный градиент плотности сахарозы (10-30%) и подвергали ультрацентрифугированию. Небольшой объем осветленного лизата сохраняли и использовали в качестве контроля нанесения. Во фракциях градиента с помощью иммуноблоттинга анализировали распределение субъединиц рибосомы и исследуемого белка. Использовали антитела, специфичные к белкам большой (39S; маркерный белок MRPL44) и малой (28S; маркерный белок MRPS27) миторибосомных субъединиц и белку SLIRP. Также сравнили профиль миторибосом в клетках дикого типа и линии с нокаутом гена *SLIRP*, чтобы оценить роль белка SLIRP в сборке рибосомных субчастиц в митохондриях. На рисунке 14 представлены результаты иммуноблоттинга.

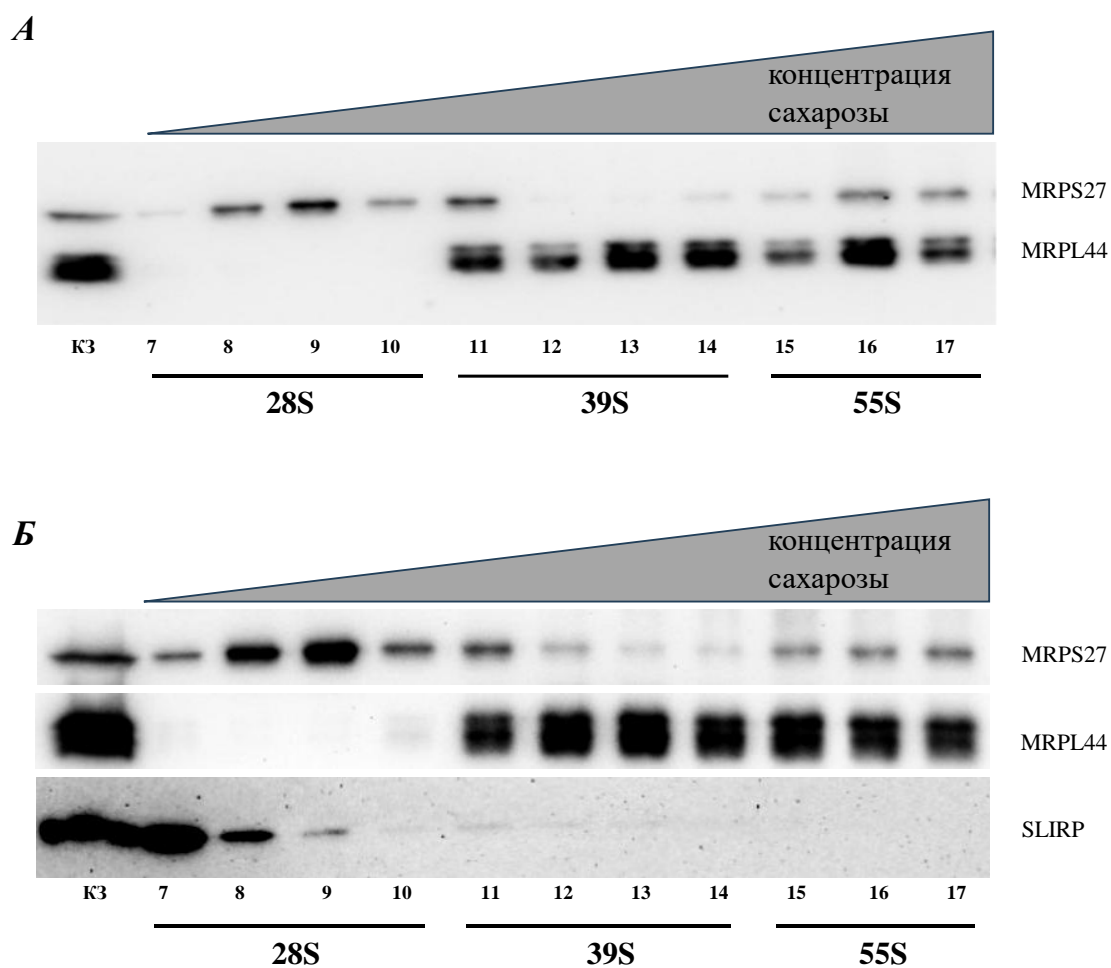


Рисунок 14. Анализ профиля миторибосом в клетках нокаутной по гену *SLIRP* линии (А) и линии дикого типа (Б). Иммуноблоттинг фракций линейного градиента сахарозы после ультрацентрифугирования с антителами, специфичными к MRPS27, MRPL44 и SLIRP (указаны справа). Нумерация фракций приведена снизу. Контроль загрузки (КЗ) соответствует нанесенному 0,1% от общего объема лизата. Малая субъединица миторибосомы обозначена – 28S; большая субъединица – 39S; ассоциированная миторибосома – 55S. Представлен результат типичного эксперимента. Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

Эксперимент продемонстрировал, что SLIRP находится только во фракциях, соответствующих малым субъединицам митохондриальных рибосом, что соотносится с данными литературы. При этом, распределение миторибосомных субчастиц в отсутствие SLIRP не отличается от такого в клетках исходной линии. Такой результат свидетельствует о том, что исследуемый белок не необходим для сборки миторибосом.

Методом анализа электрофоретической подвижности комплексов (EMSA) не было выявлено прямого взаимодействия исследуемого белка с митохондриальными мРНК COII и Cytb.

Полученные данные позволяют предположить, эффективное связывание возможно только в присутствии дополнительных белковых факторов, таких как LRPPRC.

4.13. Получение линии клеток HeLa с делецией в гене *PTCD2*

Для внесения делеции в ген *PTCD2* был выбран участок первого экзона (54 пары нуклеотидов), продукт трансляции которого присутствует во всех известных изоформах белка, и следующего за ним интрона (10 пар нуклеотидов). Согласно дизайну эксперимента, стартовый кодон сохранялся, делеция захватывала консенсусную последовательность донорного сайта сплайсинга (на стыке 3'-участка экзона и 5'-участка интрона), длину удаляемого фрагмента подбирали таким образом, чтобы она не была кратна трем нуклеотидам. В результате, такая делеция предотвращала инициацию трансляции белка с альтернативного стартового кодона, приводила к сдвигу рамки считывания и нарушению созревания мРНК.

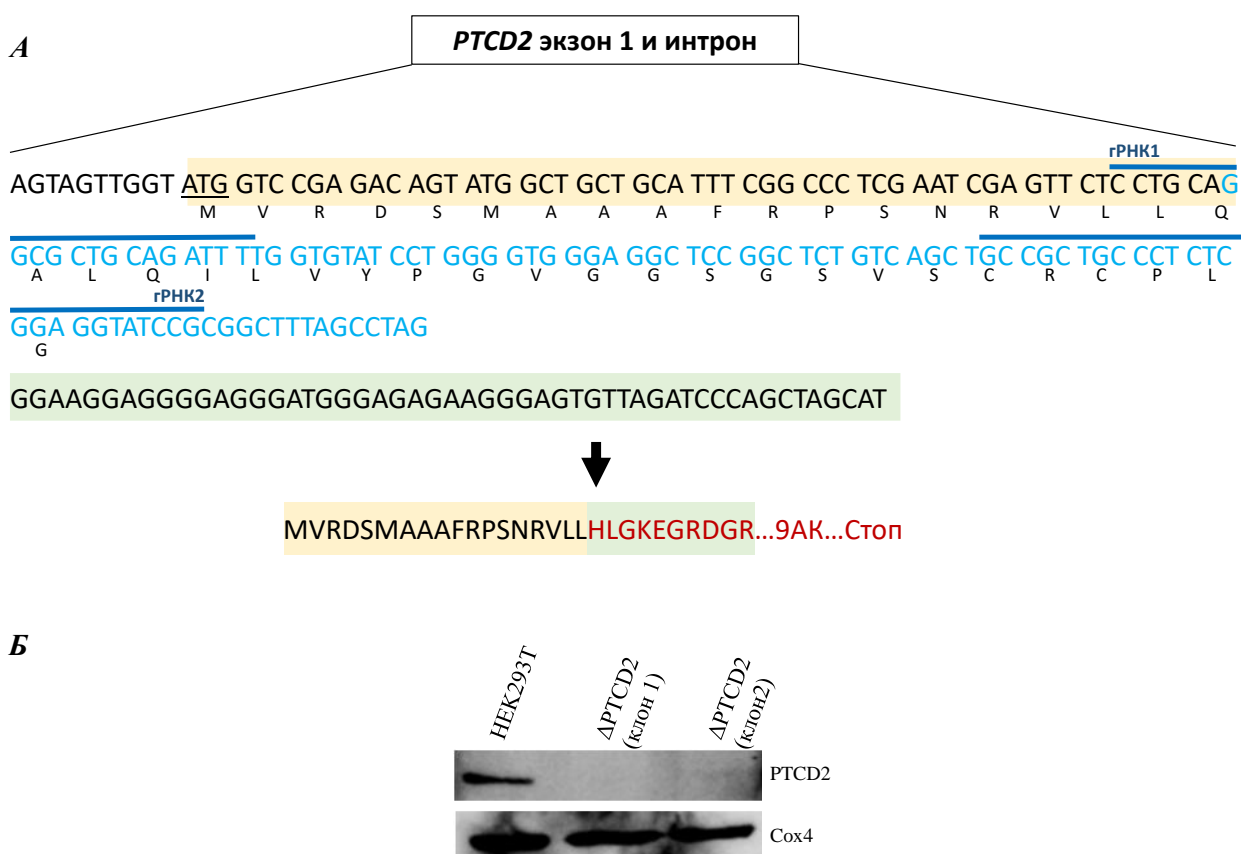


Рисунок 15. А) Схема внесения делеции в ген *PTCD2*. Голубым цветом выделен делетированный участок гена. **Б)** Иммуноблоттинг клеточных лизатов с антителами, специфичными к *PTCD2* и *Cox4* (указаны справа). Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HEK293T», из клеток нокаутной линии – « Δ *PTCD2*». Представлен результат типичного эксперимента. Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

С использованием системы CRISPR-Cas9, были получены две моноклональные линии клеток, нокаутные по гену *PTCD2*. В результате редактирования генома в клетках была выявлена гомозиготная делеция, захватывающая первый экзон (71 пара нуклеотидов) и прилегающий

интронный участок (21 пара нуклеотидов). Несмотря на то, что сайт вырезания сместился относительно исходного дизайна, делеция привела к сдвигу рамки считывания при сохранении исходного стартового кодона, отсутствию мотива, необходимого для сплайсинга, а также появлению преждевременного стоп-кодона в открытой рамке (рисунок 15А).

Отсутствие белка PTCD2 в клеточных линиях с такой делецией было подтверждено иммуноблоттингом с использованием антител, специфичных к соответствующему белку (рисунок 15Б).

4.14. Анализ эффективности митохондриальной трансляции *in vivo* в клетках с делецией в гене *PTCD2*

Чтобы выяснить, как отсутствие белка PTCD2 влияет на биосинтез белка в митохондриях, мы оценили эффективность митохондриальной трансляции *in vivo* методом радиоактивного мечения, описанным выше, в нокаутной и исходной линиях клеток.

На рисунке 16А представлены радиоавтографы электрофоретического разделения радиоактивно меченых продуктов митохондриальной трансляции *in vivo* линии клеток с делецией в гене *PTCD2* и линии дикого типа. На рисунке 16Б приведена гистограмма, демонстрирующая количественные различия в эффективности синтеза митохондриально кодируемых белков.

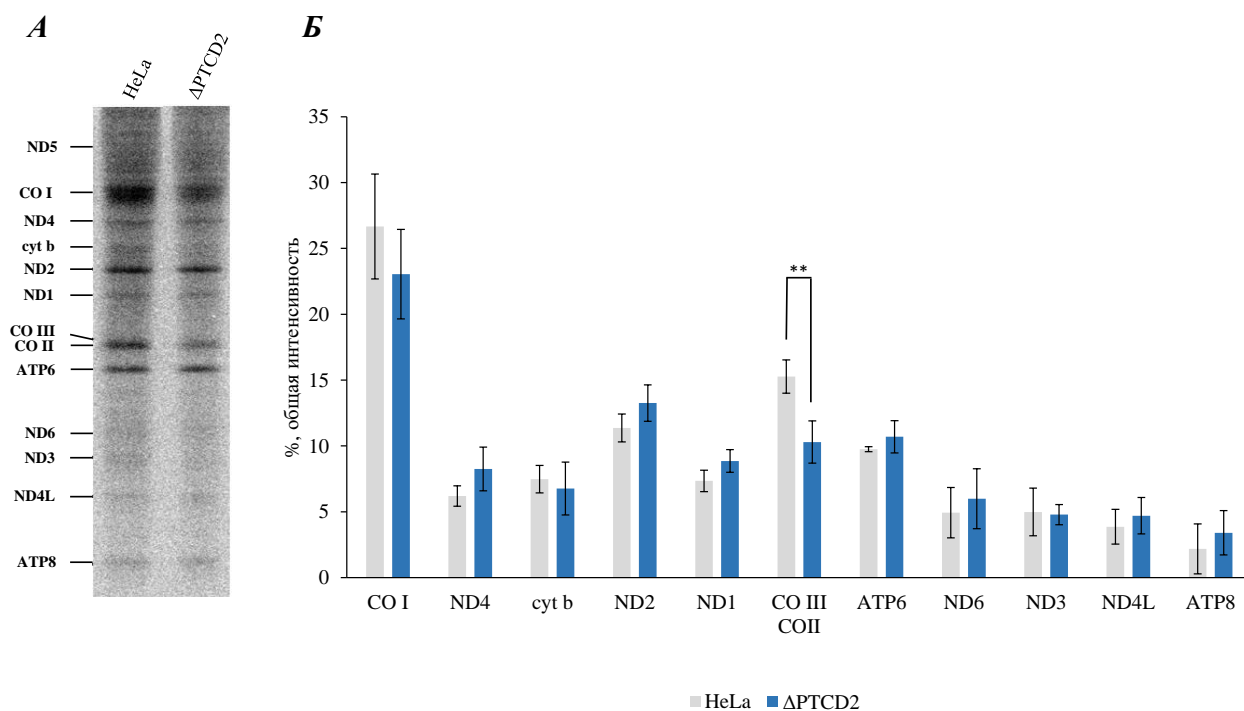


Рисунок 16. Анализ митохондриальной трансляции *in vivo*. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HeLa», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2». **А)** Радиоавтограф продуктов митохондриальной трансляции. Радиоактивно меченные митохондриальные полипептиды обозначены справа. Представлен результат типичного эксперимента. **Б)** Гистограмма, отражающая средние значения эффективности трансляции для каждого митохондриально кодируемого белка (белки обозначены снизу). По вертикали – % от общего сигнала. Данные основаны на результатах четырех независимых экспериментов. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего значения ($M \pm SD$). ** $p < 0.005$ (непарный t-тест Стьюдента).

Согласно результатам эксперимента, отсутствие белка PTCD2 в митохондриях приводит к снижению интенсивности полосы, соответствующей белкам COII и COIII ~40%. Однако, белки COII и COIII проявляют сходную электрофоретическую подвижность в полиакриламидном геле, в результате чего их радиоавтографы перекрываются.

Чтобы выяснить, интенсивность синтеза какого из них, COII и/или COIII, нарушена, мы провели иммуноблоттинг с антителами к обоим белкам (рисунок 17).

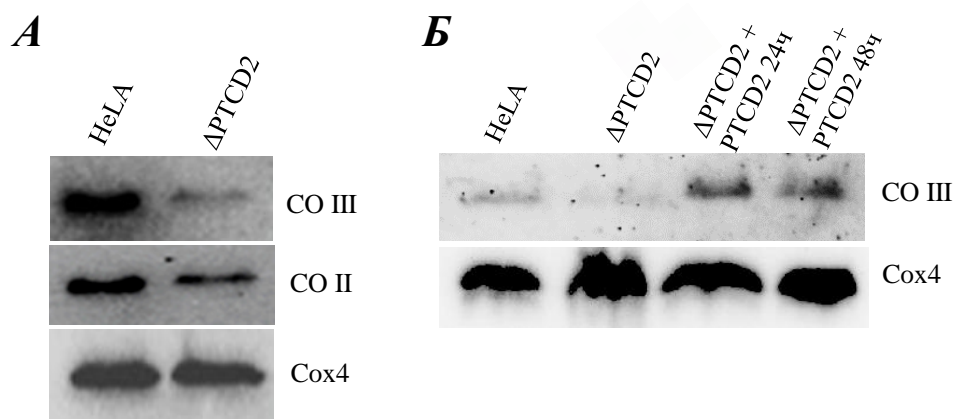


Рисунок 17. Анализ количества субъединиц IV комплекса ЭТЦ. Представлены результаты типичных экспериментов. Визуализацию проводили методом хемилюминесценции. **А)** Иммуноблоттинг клеточных лизатов с антителами, специфичными к COII, COIII и Cox4 (указаны справа). Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «НЕК293Т», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2». **Б)** Иммуноблоттинг клеточных лизатов с антителами, специфичными к COIII и Cox4 (указаны справа). Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «НЕК293Т», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2», из нокаутной линии клеток с восстановленной экспрессией *PTCD2* после индукции доксициклином в течение 24 и 48 часов – «ΔPTCD2 + PTCD2 24ч» и «ΔPTCD2 + PTCD2 48ч», соответственно.

По нашим данным, стабильные уровни обоих белков снижены в отсутствие PTCD2, но наиболее выражено снижение количества новосинтезированного COIII.

Чтобы подтвердить, что наблюдаемый фенотип, снижение эффективности трансляции COIII, специфичен для нокаута гена *PTCD2*, кодирующую область *PTCD2* повторно ввели в геном нокаутной линии клеток с помощью системы Sleeping Beauty.

Транспозоны Sleeping Beauty представляют собой синтетические мобильные генетические элементы, модифицированные из эволюционно «молчащих» последовательностей в геномах рыб. Sleeping Beauty используют как инструмент генной инженерии позвоночных животных. Система Sleeping Beauty включает два ключевых компонента: транспозон – ДНК-кассета с целевым геном, фланкированная инвертированными повторами, которые распознаются транспозазой, и транспозазу – фермент, катализирующий вырезание транспозона и его встраивание в геном. В генной инженерии система Sleeping Beauty основана на разделении компонентов (транспозона и гена транспозазы) между двумя плазмидными векторами. Наиболее широко применяют высокоэффективную транспозазу SB100X, вектор-производную pSBbi для конститутивной экспрессии целевого гена, и векторы-производные pSBtet для экспрессии, индуцируемой доксициклином [133,134]. Мы использовали векторы pCMV(CAT)T7-SB100, где

ген транспозазы SB100X находится под контролем конститутивного CMV промотера, и вектор pSBtet-Neo, содержащий транспозон.

Для получения линии клеток с восстановленной экспрессией PTCD2, кодирующую область гена *PTCD2* с последовательностью с-Мус эпитопа клонировали в составе плазмидного вектора pSBtet-Neo. Собранный вектор включал экспрессируемый конститутивно ген устойчивости к антибиотику G418 и целевой ген под контролем регулируемого доксициклином промотера TRE в составе транспозона. Клоны, содержащие встроенный в геном транспозон, отбирали в результате селекции в течение 10 дней в присутствии антибиотика G418 в концентрации 1 мкг/мл. После индукции экспрессии *PTCD2* доксициклином в течение 24 и 48 часов оценивали количество СОIII с помощью иммуноблоттинга (рисунок 17Б). В качестве контроля равномерности нанесения образцов использовали ядерно кодируемый белок Sox4, поскольку дефекты митохондриальной трансляции не влияют на его экспрессию.

При инкубация полученной клеточной линии в присутствии доксициклина в течение 24 и 48 часов количество СОIII в митохондриях становилось сопоставимо с количеством в митохондриях клеток дикого типа. Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые дефекты синтеза белка в органелле связаны именно с отсутствием PTCD2.

4.15. Оценка влияния нокаута по гену *PTCD2* на митохондриальное дыхание и активность цитохром с оксидазы

Чтобы выяснить, как отсутствие PTCD2 влияет на функциональность митохондрий, мы измерили скорость потребления кислорода клетками с делецией в гене *PTCD2* и клетками HeLa дикого типа (рисунок 18).

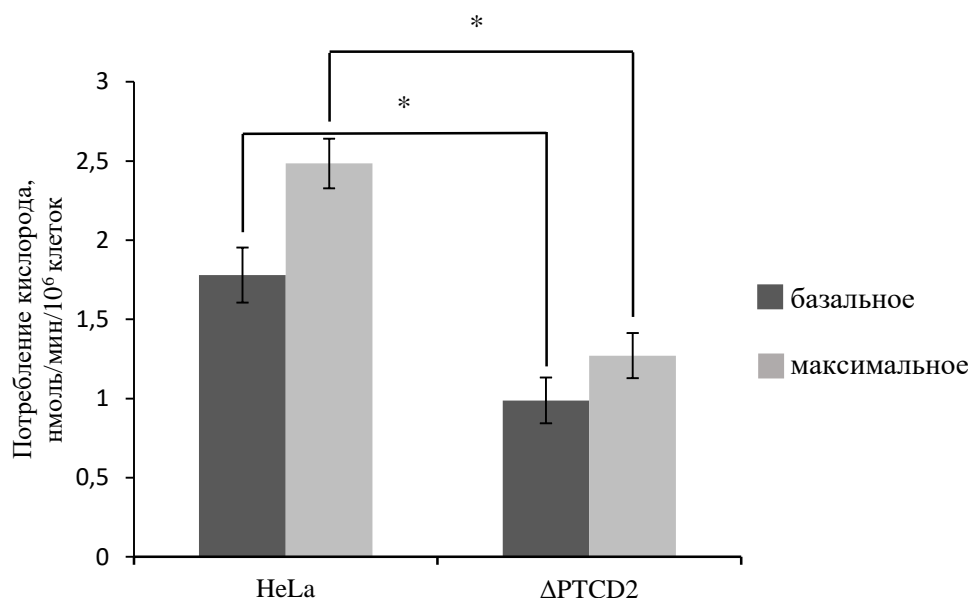


Рисунок 18. Анализ митохондриального дыхания. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HeLa», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2». Высота столбцов гистограммы соответствует средней скорости потребления кислорода, рассчитанной по результатам шести независимых экспериментов. Выражено в нМ/10⁶ клеток/мин. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего ($M \pm SD$). * $p < 0.05$ (непарный t-тест Стьюдента).

Согласно полученным данным, в отсутствие функционального PTCD2 интенсивность базального дыхания снижена на ~45% и максимального дыхания – на ~50% по сравнению с клетками дикого типа.

При этом, в мутантной линии клеток базальное и разобщенное дыхание несущественно различались по интенсивности, что свидетельствует о максимальной нагрузке на IV комплекс в отсутствие разобщающего реагента.

Такие результаты могут свидетельствовать о нарушении функций цитохром с оксидазы, поэтому далее мы проанализировали активность комплекса IV в нокаутных клетках и в клетках дикого типа при помощи спектрофотометрии. Усредненные по четырем независимым экспериментам результаты представлены на рисунке 19.

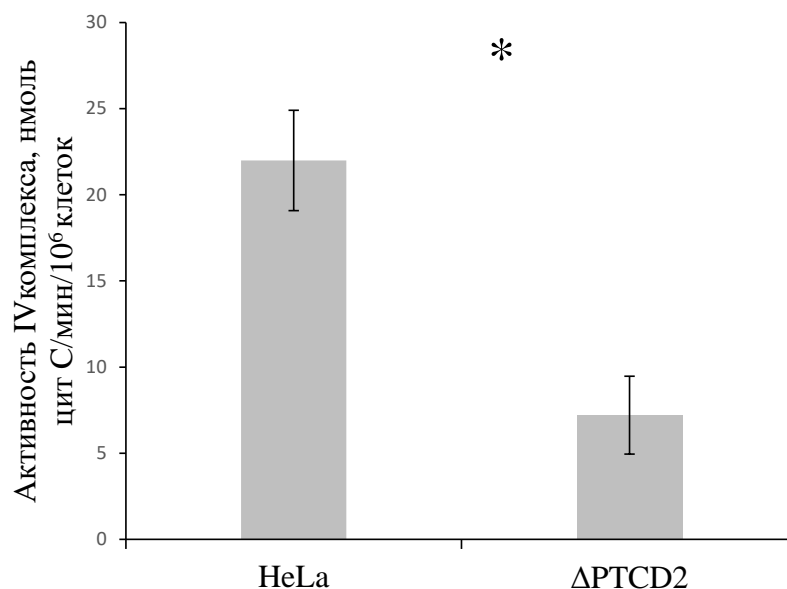


Рисунок 19. Оценка активности цитохром с оксидазы. Высота столбцов гистограммы отражает средние значения активности IV комплекса, рассчитанные по результатам четырёх независимых экспериментов. Значения выражены в нмоль(цитохрома с)/10⁶ клеток /мин. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего ($M \pm SD$). * $p < 0.05$ (непарный t-тест Стьюдента).

Согласно полученным данным, в клетках с делецией в гене *PTCD2* активность IV комплекса снижена примерно в три раза по сравнению с таковой в клетках дикого типа.

4.16. Распределение активности НАДН-дегидрогеназы в отсутствие белка PTCD2

Мы также сравнили состав суперкомплексов дыхательной цепи в митохондриях нокаутной и исходной клеточных линий и проанализировали распределение активности НАДН-дегидрогеназы в составе суперкомплексов (рисунок 20).

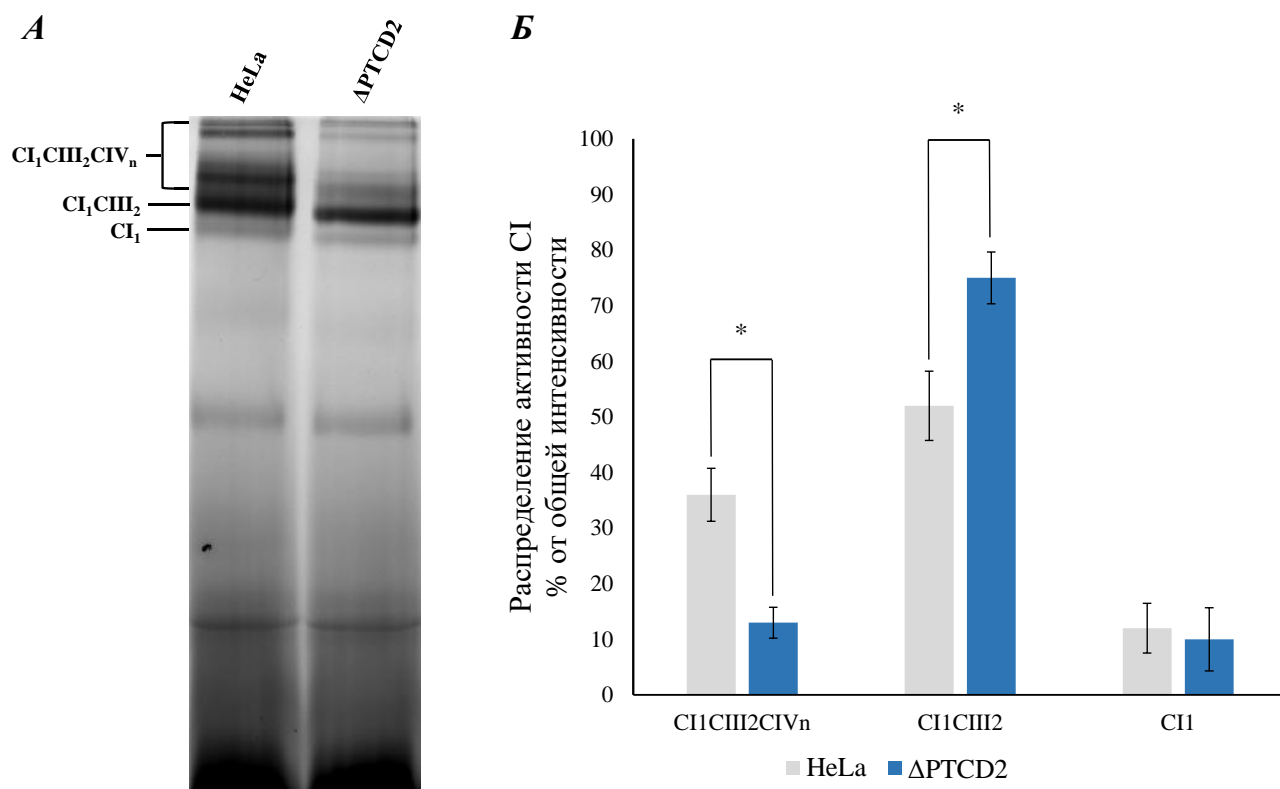


Рисунок 20. Анализ активности НАДН-дегидрогеназы. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HeLa», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2». Представлены результаты типичных экспериментов. **А)** Качественная реакция на активность НАДН-дегидрогеназы в геле после нативного электрофореза. Состав суперкомплексов указан слева. **Б)** Гистограмма, отражающая распределение активности НАДН-дегидрогеназы в составе суперкомплексов различной стехиометрии (указаны снизу). Приведены средние значения по результатам четырех независимых экспериментов. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего значения ($M \pm SD$). * $p < 0.05$ (непарный t-тест Стьюдента).

По результатам исследования, в отсутствие белка PTCD2 количество суперкомплексов высокого порядка в митохондриях значительно снижено. При этом, активность I комплекса ЭТЦ в большей степени сосредоточена в суперкомплексах со стехиометрией CI_1CIII_2 , что свидетельствует о значительной разбалансировке формирования суперкомплексов.

4.17. Анализ белковых взаимодействий PTCD2 и ассоциации с миторибосомой

Согласно литературным данным, белок PTCD2 участвует в созревании мРНК апоцихрома b и ND5, а в присутствии искусственной усеченной изоформы у мышей наблюдалась тканеспецифичная разбалансировка дыхательных функций митохондрий [135]. При этом, в рамках нашей работы было показано, что отсутствие PTCD2 приводит к снижению эффективности синтеза COII, явно указывает его участие в митохондриальной трансляции.

Нами был проведен анализ интерактома PTCD2 с помощью ко-иммунопреципитации и последующей масс-спектрометрии. Выявление взаимодействий PTCD2, особенно с белками, вовлеченными в митохондриальную трансляцию, поможет установить молекулярные основы регуляторной роли PTCD2 в биосинтезе белка.

Для анализа интерактома белка PTCD2, рекомбинантный белок, содержащий полигистидиновую метку, инкубировали с растворимыми фракциями лизата митохондрий клеток линии HeLa дикого типа. Для иммобилизации PTCD2 и связанных с ним белков применяли Ni-NTA-сефарозу. Сорбент представляет собой сефарозу, конъюгированную с нитрилотриуксусной кислотой, хелатирующей ионы никеля и образующий комплекс с гистидиновым тегом. В нативных условиях гистидиновый тег рекомбинантного PTCD2 специфично взаимодействует с никелем на сорбенте, фиксируя белок и его белковые комплексы. После отмывки несвязавшихся компонентов PTCD2 элюировали вместе с ассоциированными партнёрами и анализировали с помощью протеомики. Для исключения из анализа белков, не специфически взаимодействующих с сорбентом в условиях эксперимента, проводили аналогичный эксперимент без добавления рекомбинантного белка PTCD2.

На рисунке 21 представлены результаты анализа масс-спектрометрических данных, полученных в трех независимых экспериментах.

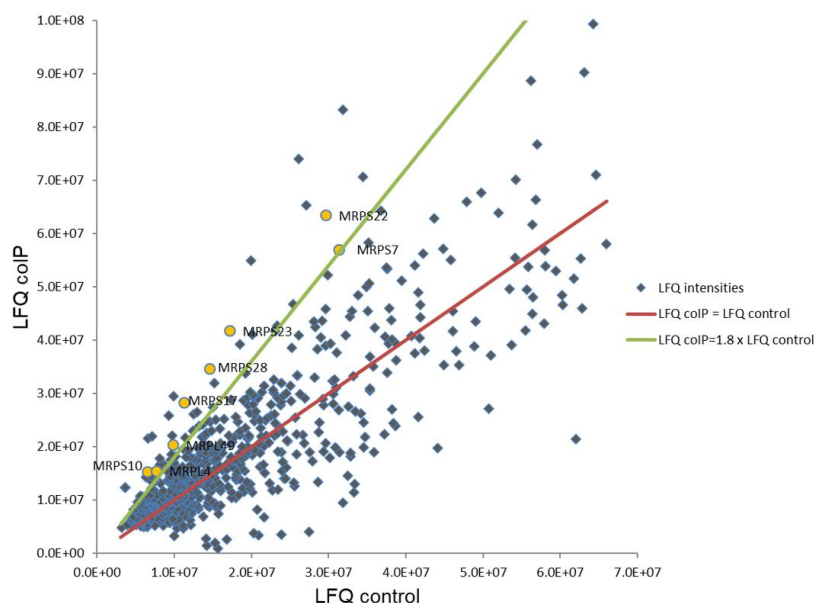


Рисунок 21. Результаты масс-спектрометрического анализа белков, ко-иммунопреципитированных с PTCD2. По вертикальной оси расположены значения интенсивность сигналов белков (LFQ) в опытном образце (с PTCD2), по горизонтальной оси – соответствующие значения в контрольном образце (без добавления рекомбинантного PTCD2). Красная линия соответствует равным уровням обогащения в обоих образцах, зеленая линия – порог значимого обогащения: 1.8-кратное увеличение в опыте по сравнению с контролем. Синие точки соответствуют всем идентифицированным белкам, желтые точки выделяют те митохондриальные рибосомальные белки, которые показали статистически значимое обогащение ($\geq 1.8x$) в присутствии рекомбинантного PTCD2.

Согласно данным, полученным после проведения ко-иммунопреципитации и последующей протеомики, PTCD2 взаимодействует с белками митохондриальной рибосомы, причем как с белками малой, так и большой субъединиц.

Мы также провели эксперимент по со-осаждению белка PTCD2 с рибосомными субчастицами с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы (10-30%), для подтверждения взаимодействия изучаемого белка с миторибосомами. Градиент затем фракционировали и с помощью иммуноблоттинга с антителами к маркерным белкам определили распределение малой (28S) и большой (39S) субчастиц миторибосомы, а также PTCD2 по фракциям.

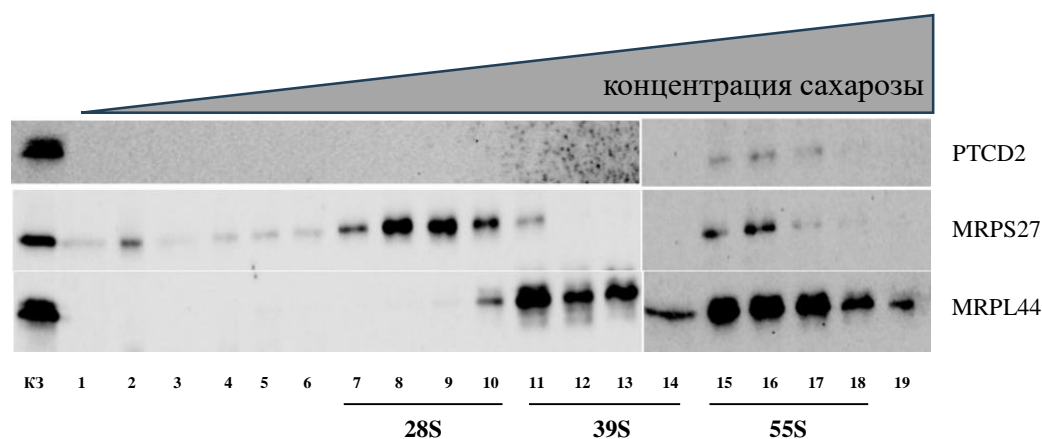


Рисунок 22. Анализ профиля миторибосом в клетках дикого типа HeLa. Иммуноблоттинг фракций линейного градиента сахарозы после ультрацентрифугирования с антителами, специфичными к MRPS27, MRPL44 и SLIRP (указаны справа). Нумерация фракций приведена снизу. Контроль загрузки (КЗ) соответствует нанесенному 0,1% от общего объема лизата. Малая субъединица миторибосомы обозначена – 28S; большая субъединица – 39S; ассоциированная миторибосома – 55S. Представлен результат типичного эксперимента. Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

Результаты показали, что PTCD2 колокализуется исключительно во фракциях, соответствующих ассоциированной миторибосоме (55S) (рисунок 22), что соотносится с данными масс-спектрометрического анализа продуктов ко-иммунопреципитации с PTCD2.

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондрии сохранили собственный геном и систему его поддержания и экспрессии, унаследованные от бактериального предка. Хотя митохондриальные геномы кодируют очень небольшой набор белков (например, 8 у дрожжей и 13 у человека), эти белки являются преимущественно ключевыми компонентами комплексов цепи окислительного фосфорилирования, и функции митохондрий напрямую зависят от их синтеза.

Митохондриальный трансляционный аппарат очень сложен: помимо специализированной митохондриальной рибосомы и набора факторов трансляции, биосинтез белка в митохондриях зависит от многочисленных дополнительных факторов, роль которых в этом процессе не всегда ясна. Долгое время считалось, что система регуляции синтеза белка в митохондриях через трансляционные активаторы, выявленная у дрожжей, отсутствует в клетках человека. Трансляционные активаторы пекарских дрожжей часто взаимодействуют с протяженными 5'-нетранслируемыми областями мРНК, в то время как митохондриальные мРНК млекопитающих имеют короткие или полностью редуцированные 5'-нетранслируемые участки. Однако, новые данные, в частности описание белка TACO1 как трансляционного активатора белка COI, ставят под сомнение это предположение и открывают новые перспективы для поиска факторов тонкой регуляции инициации митохондриальной трансляции у высших эукариот.

5.1. ZMYND17

Белок ZMYND17, согласно данным литературы, является ортологом дрожжевого Mss51 – трансляционного активатора субъединицы 1 цитохром c оксидазы, что также подтверждается биоинформатическим анализом, проведенным в ходе данной работы. ZMYND17 также, как и его дрожжевой гомолог, локализован в митохондриях и содержит домен цинковый палец. Согласно некоторым данным литературы, отсутствие *Zmynd17* приводит к аномальной морфологии митохондрий у мышей, в том числе – уменьшению количества крист, а также снижению интенсивности митохондриальных функций [13]. Ряд исследований, напротив, свидетельствует об увеличении клеточной продукции АТФ, интенсификации митохондриального дыхания и гликолиза при нокауте гена *Zmynd17* при сохранении морфологии органелл [11,12]. Результаты этих исследований свидетельствуют в пользу того, что ZMYND17 выполняет роль глобального регулятора клеточного метаболизма. Однако, в частных деталях работы противоречат друг другу. Сравнительный анализ литературных данных выявляет существенные различия в подходах к выбору возраста и пола экспериментальных животных. В исследовании Fujita et al. (2018) эксперименты проводились на мышах стандартизированного возраста (8-12 недель), что соответствует взрослому возрасту особей, и исключительно мужского пола. Такой подход позволяет минимизировать вариабельность, связанную с онтогенетическими

изменениями и половыми особенностями метаболизма, и обеспечивает воспроизводимость результатов.

В отличие от этого, в работе Gonzalez et al. (2019) часть экспериментов проводилась на самках, часть - на самцах без должного биологического обоснования и параллельного анализа половых различий. Влияние отсутствия *Zmynd17* на массу тела, жировой и мышечной ткани проводили на самках; при этом, оценку потребления кислорода мышечными клетками в норме и в мутантной линии – на самцах. Влияние диеты с низким содержанием жира, например, оценивалось на самках, в то время как диеты с высоким содержанием жира – на самцах. Однако в рамках других исследований был показан полозависимый характер реакции на диету и физическую нагрузку. Например, самцы мышей демонстрируют более значительное увеличение массы тела по сравнению с самками при содержании на высокожировой диете. Также известно, что у самок существуют механизмы адаптации митохондриальных функций жировой ткани при метаболических нарушениях, в отличие от самцов [136,137].

Оценка биохимических и физиологических параметров в работе Gonzalez et al. (2019) выполнялась на животных с принципиально разным физиологическим статусом: использовался расширенный возрастной диапазон (от 3 недель до 6 месяцев), охватывающий как ювенильных особей, так и животных в стадии зрелости. Следует отметить, что вариабельность возраста животных в данном исследовании не была обусловлена целью анализа зависимых от возраста процессов, а введена произвольно, что затрудняет интерпретацию данных и их сопоставление с другими работами. Как убедительно показано в многочисленных исследованиях морфофункциональные характеристики митохондрий зависят от возраста. В частности, воздействие стрессовых факторов и генетических мутаций на митохондриальные функции существенно варьирует между ювенильными и взрослыми животными. Кроме того, даже в пределах одной возрастной группы выявляются четкие половые различия [138]. Также, было показано, что в юном и в зрелом возрасте в мышечной ткани мышей даже распределение, топология и морфология митохондрий различаются [139].

Результаты сравнительного анализа ультраструктурных изменений митохондрий при нокауте *Zmynd17* в исследованиях Gonzalez et al. (2019) и Fujita et al. (2018) также расходятся. В работе Gonzalez et al. (2019) не было обнаружено нарушений морфологии митохондрий ни в камбаловидной мышце (*soleus*), ни в длинном разгибателе пальцев (*extensor digitorum longus*). Fujita et al. (2018) так же не наблюдали изменений ультраструктуры органелл в камбаловидной мышце (*soleus*), однако обнаружили патологическую морфологию митохондрий в подошвенной мышце (*plantaris*) нокаутных мышей, по сравнению с контрольной линией, включая вакуолизацию и нарушение организации крист. Такие результаты коррелируют с тканеспецифичным паттерном экспрессии *Zmynd17*, обнаруженным Fujita et al. (2018). Согласно

данным, максимальный уровень экспрессии характерен для быстрых гликолитических мышц. При этом, в подошвенной мышце (*plantaris*) экспрессия *Zmynd17* оказалась максимальной, и более чем в 10 раз превышала экспрессию в длинном разгибателе пальцев (*extensor digitorum longus*). В окислительных мышцах, таких как камбаловидная мышца (*soleus*), уровень экспрессии *Zmynd17*, напротив, оказался низок. Логично предполагать, что степень нарушений митохондриальной ультраструктуры коррелирует с уровнем экспрессии *Zmynd17* в разных типах мышц, и в исследовании Gonzalez et al. (2019), где анализировали мышцы с низкой экспрессией белка, значимых изменений морфологии выявлено не было.

Таким образом, работа Gonzalez et al. (2019) содержала существенные методологические ограничения (смещение полов и возрастов, использование мышц с низкой экспрессией *Zmynd17*), что делает ее данные менее надежными для сравнительного анализа.

Существенные методологические недостатки исследования Gonzalez et al. (2019) не только затрудняет интерпретацию результатов внутри самой статьи, но и делает невозможным их сравнение с другими исследованиями, особенно выполненными на иных модельных системах. В связи с этим для сравнительного анализа полученных нами данных мы будем опираться исключительно на работу Fujita et al. (2018).

В данной работе мы изучили влияния белка *Zmynd17* на биосинтез белка, функционирование митохондрий и отдельных дыхательных комплексов в клетках человека. Для этого с помощью системы редактирования генома CRISPR-Cas9 была получена линия клеток HeLa с нефункциональным белком *ZMYND17*. В клетках с нокаутом гена исследуемого белка мы проанализировали эффективность синтеза отдельных митохондриально кодируемых полипептидов, а также уровень митохондриальной трансляции в целом, используя метод радиоактивного мечения *in vivo*. Оказалось, что отсутствие *ZMYND17* не влияет на уровень синтеза белка в митохондриях клеток человека. Такой результат указывает на принципиальное различие функций между человеческим *ZMYND17* и его дрожжевым ортологом, поскольку отсутствие функционального *Mss51* приводит к драматическому снижению эффективности трансляции *Cox1* [140].

Далее мы полярографически исследовали влияние делеции в гене белка *ZMYND17* на митохондриальные функции. Наши данные демонстрируют, что делеция в гене *ZMYND17* приводит к снижению максимального дыхания в клетках HeLa, что согласуется с результатами Fujita et al. (2018), полученными на сателлитных клетках мыши. Однако, в отличие от данных этой работы, мы не наблюдали снижения базального дыхания, что может отражать различия между первичными и иммортализованными клеточными линиями. В частности, *in vivo* микроокружение мышечной ткани, может накладывать дополнительные метаболические требования, что усиливает зависимость от *ZMYND17* даже в базальных условиях.

С помощью спектрофотометрического анализа мы подтвердили, что уменьшение разобщенного дыхания связано с уменьшением активности цитохром с оксидазы. При этом в работе Fujita et al. (2018) показано снижение количества COI в мышцах нокаутной линии мышей примерно в 2 раза, по сравнению с нормой. В то же время наши данные свидетельствуют об отсутствии значимого влияния ZMYND17 на уровень трансляции COI, полученные результаты позволяют предположить, что данный белок участвует в посттрансляционной регуляции, контролируя стабильность COI субъединицы или процесс сборки IV комплекса. Возможно, в отсутствие ZMYND17 нарушается инкорпорация COI в IV комплекс или другие этапы сборки цитохром с оксидазы, что приводит к его ускоренной деградации. Это объясняет снижение общего пула COI в работе Fujita et al. (2018), а также уменьшение активности цитохром с оксидазы и разобщенного дыхания в наших исследованиях.

Кроме того, известно, что организация комплексов цепи окислительного фосфорилирования в структуры более высокого порядка, суперкомплексы, может влиять на активность отдельных комплексов ЭТЦ [141]. Так и наоборот, нарушение функций одного из комплексов может приводить к аномалиям формирования других комплексов и суперкомплексов, а также их активности. В частности, было показано, что нарушение сборки и функционирования IV комплекса может дестабилизировать также сборку и активность I комплекса [142,143]. При этом НАДН-дегидрогеназа является коровым комплексом для всех суперкомплексов дыхательной цепи.

Для анализа возможной взаимосвязи между снижением активности IV комплекса и процессами сборки митохондриальных суперкомплексов мы использовали Blue-Native электрофорез с последующей окраской на активность НАДН-дегидрогеназы. Эксперимент не выявил значимых различий в количестве и стехиометрическом составе суперкомплексов митохондриальных мембран между мутантной и исходной клеточными линиями. Это указывает на то, что ZMYND17 не влияет на биогенез надмолекулярных структур ЭТЦ, а снижение активности и количества IV комплекса, вероятно, не достигает порога, необходимого для дестабилизации суперкомплексов и активности I комплекса.

Также с помощью электрофоретического разделения белков в нативных условиях и постановки качественной реакции, изучили влияние отсутствия ZMYND17 на сборку и активность АТФ-синтазы. Проведенный анализ выявил снижение полноценного F₀F₁-комплекса при накоплении свободной F₁-субчастицы в митохондриях нокаутной по гену *ZMYND17* линии клеток, по сравнению с нормой. Такой результат указывает на роль ZMYND17 в процессе сборки или стабилизации V комплекса. Интересно, что в работе Fujita et al. (2018) было показано противоположное направление изменений: снижение количества субъединицы ATP5A (компонента F₁) в мышечных клетках. Противоречие может быть объяснено накоплением

свободной F_1 из-за нарушенной сборки полноценной АТФ-синтетазы в активно пролиферирующих клетках таких как HeLa. В дифференцированных постмитотических мышечных клетках длительное отсутствие ZMYND17 вызывает постепенную деградацию свободной F_1 , что объясняет снижение количества АТФ5А.

Снижение количества полноценных F_0F_1 -комплексов в ZMYND17-нокаутных клетках может приводить к хроническому повышению мембранного потенциала, что заставляет IV комплекс работать в режиме, близком к максимальному даже в базальных условиях. Это объясняет лишь умеренный рост дыхательной активности, наблюдавшийся нами при разобщении окислительного фосфорилирования: резерв для усиления работы IV комплекса оказывается ограниченным как снижением его абсолютного количества вследствие нарушенной сборки, так и исходно высоким уровнем функциональной нагрузки. Дополнительным фактором может быть недостаточная доступность восстановленного цитохрома c, чей пул истощается при постоянной нагрузке на ЭТЦ.

Дисбаланс активности и сборки комплексов цепи окислительного фосфорилирования также согласуется с результатами работы Fujita et al. (2018) [13]. В исследовании было показано, что отсутствие Zmynd17 приводит к уменьшению количества крист внутренней мембраны митохондрий, что может быть связано с нарушениями сборки АТФ-синтазы, так как их образование обуславливается олигомеризацией V комплекса.

Ортолог ZMYND17, белок Mss51 пекарских дрожжей, является одним из трансляционных активаторов Cox1, митохондриально-закодированной субъединицы цитохром c оксидазы. Mss51 взаимодействует с миторибосомой, опосредует корректное позиционирование мРНК Cox1 в составе инициаторного комплекса, регулирует элонгацию трансляции, а также необходим для фолдинга Cox1 и его ассоциации с другими субъединицами IV комплекса ЭТЦ. Чтобы выяснить, чем обусловлены различия функций ZMYND17 и Mss51, мы провели подробный биоинформатический анализ эволюционной истории этих белков.

Филогенетический анализ свидетельствует, что исследуемые белки, ZMYND17 человека и Mss51 пекарских дрожжей, дивергировали от общего предкового белка, содержавшего два цинк-связывающих домена. Однако в ходе эволюции оба белка претерпели значительные структурные изменения: у каждого из них произошла редукция одного из цинковых пальцев. При этом, внутри клады грибов произошла дупликация гена предкового белка с формированием двух белков-паралогов, эволюционирующих независимо в группах, один из которых впоследствии был утрачен представителями группы Saccharomycotina. Примечательно, что доменная архитектура и аминокислотная последовательность сохранившегося паралога, Mss51, пекарских дрожжей, оказались менее похожими на предковую форму, чем утраченного. Более того, учитывая значительную эволюционную дистанцию между таксонами, нельзя однозначно

утверждать, что сохранившиеся домены современных белков происходят от одного и того же предкового домена.

Несмотря на сохранение отдельных консервативных элементов, молекулярные функции Mss51 и ZMYND17 радикально дивергировали. В то время как Mss51 имеет специализацию в качестве трансляционного активатора Cox1, его человеческий ортолог, ZMYND17, приобрел принципиально новые регуляторные роли, не связанные с контролем митохондриальной трансляции.

Таким образом, несмотря на общее происхождение, ZMYND17 и Mss51 представляют собой пример эволюционной дивергенции функций ортологичных белков. ZMYND17 сохранил функциональную связь с биогенезом цитохром с оксидазы, но регулирует более поздние посттрансляционные этапы созревания комплекса, приобретая также новую роль в сборке V комплекса цепи окислительного фосфорилирования. Такие данные позволят рассматривать ZMYND17 как многофункциональный регулятор метаболизма митохондрий, хотя молекулярные механизмы, лежащие в основе этих функций, требуют проведения дальнейших исследований.

5.2. SLIRP

В последние годы криоэлектронная микроскопия высокого разрешения позволила идентифицировать многие особенности организации трансляционного аппарата митохондрий. В одной из таких работ была обнаружена электронная плотность в районе входного туннеля мРНК миторибосомы человека, в которую удачно вписывается структура комплекса LRPPRC-SLIRP. При этом, LRPPRC взаимодействует с рибосомными белками mS31 и mS39, а белок SLIRP образует внешнюю часть входного туннеля для мРНК. Белок LRPPRC в гетеродимерном комплексе с белком SLIRP известен как глобальный пост-транскрипционный регулятор экспрессии генов в митохондриях млекопитающих. LRPPRC стабилизирует митохондриальную мРНК, необходим для полиаденилирования и поддержания пула нетранслируемых мРНК, а ассоциация комплекса SLIRP и LRPPRC с миторибосомой предположительно указывает на его участие в митохондриальной трансляции. Особый интерес представляет именно белок SLIRP, который, обладая консервативным РНК-связывающим доменом, непосредственно контактирует с мРНК и регулирует ее привлечение к инициаторному комплексу.

Мы получили линию клеток человека HEK293T, нокаутную по гену *SLIRP*, и методом иммуноблоттинга подтвердили отсутствие в ней функционального белка. При анализе митохондриальных функций оказалось, что отсутствие SLIRP приводит к снижению митохондриального дыхания, как базального, так и разобщенного. С помощью иммуноблоттинга и качественных реакций на активности отдельных комплексов цепи окислительного фосфорилирования мы выяснили, что снижение митохондриальных функций на молекулярном уровне обусловлено дефицитом IV и I комплексов, а также снижением активности НАДН-

дегидрогеназы. Наши данные согласуются с клиническими наблюдениями: мутации в гене *SLIRP* у человека приводят к митохондриальной энцефаломиопатии, сопровождающейся также снижением количества I и IV комплексов ЭТЦ [111].

Для оценки эффективности митохондриальной трансляции мы разработали метод, основанный на анализе флуоресценции. Новый подход заключается в добавлении неканонической аминокислоты, содержащей реактивную группу, которая встраивается в зарождающиеся полипептидные цепи митохондриально кодируемых белков, и последующей конъюгации с флуорофором. Такой способ мечения продуктов митохондриальной трансляции имеет ряд существенных преимуществ перед традиционным мечением ^{35}S -метионином, включая более низкую стоимость реактивов, высокую скорость выполнения и безопасность. Однако, мониторинг митохондриальной трансляции на основе HPG-мечения на настоящем этапе разработки является качественным и полуколичественным методом, позволяющим сравнивать количество отдельных новосинтезируемых белков между образцами, но не эффективность синтеза разных белков в пределах одного образца.

Применив новый подход анализа трансляционного профиля, мы обнаружили, что при сохранении общего уровня эффективности синтеза белка в митохондриях в отсутствие *SLIRP* специфически снижается количество новосинтезированных субъединиц цитохром с оксидазы: COI, COII и COIII.

Комплекс LRPPRC-SLIRP является глобальным пост-транскрипционным регулятором экспрессии в митохондриях млекопитающих: участвует в поддержании стабильности нетранслируемых мРНК и процессинге пре-мРНК. Также было показано, что подавление экспрессии гена *SLIRP* на стадии транскрипции с помощью РНК-интерференции приводит к значительному снижению количества почти всех мРНК в митохондриях [94]. Согласно литературным данным, *SLIRP* также препятствует протеолизу LRPPRC [96]. В то же время в отсутствие LRPPRC происходит нарушение полиаденилирования митохондриальных транскриптов и снижение стабильности мРНК, в частности COI, COII и COIII, что приводит к снижению количества продуктов их трансляции [95]. Исходя из вышеперечисленных сведений, можно предположить, что наблюдаемое снижение эффективности синтеза митохондриально кодируемых белков при нокауте по гену *SLIRP* является следствием дестабилизации LRPPRC, приводящей к уменьшению количества соответствующих мРНК. Однако, наши данные ПЦР в реальном времени опровергают эту гипотезу, в отличие от ранее описанных систем, где нокаут *SLIRP* приводил к снижению уровня мРНК. Отсутствие *SLIRP* в линии клеток человека HEK293T значимо не влияет на стабильный уровень митохондриальных мРНК, что позволяет оценить участие *SLIRP* непосредственно в регуляции биосинтеза белка в органеллах, разграничив с влиянием LRPPRC на стабильность транскриптов.

Значимое снижение эффективности синтеза COI, COII и COIII объясняет уменьшение количества IV комплекса и, как следствие, снижение как базального, так и разобщенного митохондриального дыхания. Снижение активности и количества I комплекса может объясняться нарушением синтеза его митохондриально закодированных субъединиц, нарушением сборки надмолекулярных структур или совокупностью этих факторов. Дефицит IV комплекса может приводить к нарушению биогенеза суперкомплексов и, как следствие, быть причиной снижения активности НАДН-дегидрогеназы, корового фермента для суперкомплексов. Кроме того, даже умеренное снижение эффективности синтеза ND5, которое мы наблюдали при анализе митохондриальной трансляции, может лимитировать сборку полноразмерного I комплекса, учитывая важность ND5 в сборке мембранного домена [144]. В митохондриях нокаутной линии клеток мы также наблюдали снижение активности полноценных F_0F_1 -комплексов и увеличение активности свободной F_1 субъединицы, что объясняется разбалансировкой синтеза митохондриально и ядерно кодируемых субъединиц V комплекса. При сохранении нормального уровня ядерно кодируемого компонента F_1 (ATP5A) наблюдается умеренное снижение уровня трансляции митохондриально кодируемой субъединицы F_0 – ATP6. В результате, стехиометрический дисбаланс между F_1 - и F_0 -компонентами приводит к избытку F_1 -частиц относительно F_0 , что и объясняет наблюдаемое их накопление в свободном виде.

Наблюдаемые при отсутствии SLIRP нарушения энергетического и молекулярного гомеостаза митохондрий закономерно ставят вопрос о механизмах, с помощью которых этот белок осуществляет избирательный контроль трансляции митохондриальных транскриптов. Данные криоэлектронной микроскопии позиционируют белок SLIRP у входного туннеля миторибосомы, при этом взаимодействие SLIRP с малой миторибосомной субъединицей опосредовано белком LRPPRC, который выступает в роли структурного адаптера. Сам белок SLIRP не имеет контактов с миторибосомными белками, но взаимодействует с поступающей во входной туннель мРНК [18]. Мы провели анализ распределения белка SLIRP во фракциях миторибосом и выявили совместную миграцию SLIRP с малыми субъединицами рибосом, но не с ассоциированными миторибосомами. Совместно со структурными данными, полученный результат указывает на участие SLIRP в ранних этапах инициации трансляции.

Существующие литературные данные о механизме инициации трансляции в митохондриях млекопитающих остаются противоречивыми. В работе Remes et al. (2023), демонстрируется возможность инициации с терминальных стартовых кодонов ассоциированной 55S рибосомой без участия mtIF3. Однако эти результаты могли быть обусловлены спецификой *in vitro* системы, где искусственно высокие концентрации компонентов (в том числе инициаторной тРНК), использование бактериальных тРНК и отсутствие элонгационных тРНК смешивают равновесие в сторону инициации моносомой. При этом было убедительно показано, что

mtIF3 обладает дискриминирующей активностью, подобно бактериальному IF3, и способствует корректной и эффективной инициации трансляции в митохондриях млекопитающих [76]. Эти данные опровергают гипотезу о том, что mtIF3 препятствует присоединению инициаторной тРНК, будучи связанным с малой субчастицей митоторибосомы [79]. Из совокупности сведений можно предположить, что *in vivo* инициация трансляции безлидерных мРНК в митохондриях начинается с формирования пре-инициаторного комплекса на 28S-субъединице, содержащего mtIF2-метионил-тРНК и mtIF3. mtIF3, при этом, модулирует сродство к стартовому кодону и способствует конформационным изменениям рРНК малой субъединицы, необходимым для распознавания метиониновой тРНК. После образования стабильного кодон-антикодонного взаимодействия, mtIF3 диссоциирует, что делает возможным присоединение 39S-субъединицы и образование трансляционно активной митоторибосомы.

Исходя из такой модели, мы предполагаем, что SLIRP, взаимодействуя с 28S, облегчает релаксацию вторичных структур на мРНК в области стартового кодона [145] и увеличивает локальную концентрацию специфических мРНК у малой субъединицы, модулируя сродство пре-инициаторного комплекса к транскриптам. После завершения пре-инициаторного этапа SLIRP диссоциирует, что объясняет его отсутствие в составе ассоциированных митоторибосом.

Структурные данные и функциональных последствий нокаута по гену *SLIRP* позволяют сделать вывод, что именно SLIRP осуществляет транскрипт-специфический контроль доставки мРНК к митоторибосоме и напрямую влияет на эффективность трансляции митохондриально кодируемых белков, в частности субъединиц IV комплекса ЭТЦ. При этом дисбаланс биосинтеза белков в органелле при нокауте гена *LRPPRC*, сохраняющийся даже после нормировки на уровень транскриптов, обусловлен нарушением ассоциации SLIRP с митоторибосомой.

Несмотря на наличие РНК-связывающих мотивов, в эксперименте *in vitro* SLIRP не взаимодействует с митохондриальными мРНК, что согласуется с нашей моделью, где его функция реализуется через опосредованное LRPPRC взаимодействие с рибосомой.

Полученные результаты позволяют пересмотреть роль белка SLIRP в экспрессии генов митохондриально кодируемых белков. Наша работа убедительно демонстрирует, что SLIRP выполняет не вспомогательную, как считалось ранее, а регуляторную функцию, непосредственно координируя синтез митохондриально кодируемых белков на раннем этапе инициации трансляции.

5.3. PTCD2

Многие трансляционные активаторы дрожжей принадлежат к семейству белков, содержащих пентатрикопептидные повторы, или PPR-мотивы. PPR-мотивы обладают РНК-связывающей активностью, что обуславливает их роль в пост-транскрипционных процессах, таких как сплайсинг и редактирование РНК, гидролиз РНК и трансляция. Все 7 PPR-белков человека обнаруживаются в митохондриях. Одним из таких белков является PTCD2, чья функциональная характеристика до сих пор не проводилась на модели с полноценным нокаутом. Было показано влияние делеции нескольких кодирующих экзонов гена *PTCD2* на созревание митохондриальных транскриптов, однако его роли в регуляции синтеза белка продемонстрировано не было.

Для того чтобы прояснить роль PTCD2 в регуляции трансляции в митохондриях, мы получили клеточную линию с функциональной делецией в гене данного белка, подтвержденной иммуноблоттингом. Согласно анализу эффективности трансляции *in vivo* в митохондриях и результатам иммуноблоттинга, отсутствие PTCD2 приводит к снижению стабильного уровня субъединиц цитохром с оксидазы, COIII и COII. При этом, уменьшение количества COIII оказалось более выраженным, по сравнению с COII. Незначительное снижение количества COII может объясняться косвенным влиянием отсутствия PTCD2: нарушение сборки в результате дефицита COIII и активности IV комплекса ЭТЦ приводит к уменьшению стабильности и времени жизни его субъединицы COII. Действительно, по нашим данным активность цитохром с оксидазы значительно снижена в отсутствие PTCD2. Аналогичный эффект наблюдается, например, при нокауте гена *TACO1*, кодирующего трансляционный активатор белка COI [146].

Снижение количества ключевых каталитических субъединиц, COII и COIII, закономерно привело к нарушению работы IV комплекса, что проявилось в снижении скорости потребления кислорода клетками нокаутной линии по сравнению с исходной, как на базальном уровне, так и в случае разобщения мембранного потенциала. При этом оказалось, что уровни базального и максимально дыхания в отсутствие PTCD2 различались незначительно, что объясняется максимальной нагрузкой на IV комплекс даже в базальных условиях из-за снижения его суммарной активности. При помощи нативного электрофореза и последующей качественной реакции на активность НАДН-дегидрогеназы мы показали, что в митохондриях нокаутной линии клеток IV комплекс практически не входит в состав суперкомплексов, вероятно, в результате нарушения его сборки и функций. Существенное уменьшение количества цитохром с оксидазы и суперкомплексов нарушает структурную организацию и функциональное сопряжение всей дыхательной цепи митохондрий. Такое серьезное нарушение энергетического метаболизма объясняет отсутствие как жизнеспособных нокаутных моделей по гену *PTCD2* у млекопитающих, так и клинически зарегистрированных случаев дисфункции этого гена у

человека. Нарушение работы PTCD2, вероятно, приводит к эмбриональной летальности на ранних стадиях развития.

Для выяснения механистических аспектов функционирования PTCD2 мы исследовали его взаимодействия с протеомом органелл и непосредственно миторибосомами. Согласно результатам эксперимента по соосаждению PTCD2 с рибосомными субчастицами в градиенте плотности сахарозы, PTCD2 обнаруживается во фракциях, соответствующих исключительно ассоциированным 55S рибосомам, что подтвердилось и в эксперименте по ко-иммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией. Взаимодействие PTCD2 с моносомой предполагает его участие либо в инициации трансляции (но не пре-инициации, в отличие от SLIRP), либо в регуляции трансляции на этапе элонгации. Участие PTCD2 в регуляции элонгации представляется менее вероятным, поскольку в этом случае следовало бы ожидать накопления абортивных пептидных фрагментов. Однако наши данные демонстрируют нормальное распределение полноразмерных продуктов трансляции, что скорее поддерживает гипотезу о действии PTCD2 на поздних этапах инициации.

Интерес представляет сходство PTCD2 с миторибосомным белком mS27, располагающимся на периферии малой субъединицы. Оба белка содержат PPR-мотивы и имеют ~18% идентичных аминокислот [135]. Показано, что при подавлении экспрессии гена белка mS27 на уровне мРНК, происходит незначительное уменьшение количества субъединиц цитохром с оксидазы [16]. Можно предположить, что PTCD2 и mS27 конкурируют за общие сайты связывания на миторибосоме, при этом ассоциация с PTCD2, по-видимому, обеспечивает более эффективную трансляцию именно COIII, по сравнению с комплексом, содержащим mS27.

Полученные данные демонстрируют, что PTCD2 играет роль в поддержании митохондриальной биоэнергетики через специфическую регуляцию синтеза субъединицы COIII цитохром с оксидазы за счет ассоциации с трансляционно активной митохондриальной рибосомой.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Организация митохондриальной трансляции человека может создавать иллюзию упрощенной версии бактериальной системы, однако при ближайшем рассмотрении эта кажущаяся простота оборачивается сложностью и утонченностью механизмов регуляции. Функционирование в условиях окислительного стресса и зависимость клетки от бесперебойной работы цепи окислительно фосфорилирования обусловили формирование уникальных систем контроля и нетривиальных взаимосвязей митохондриальных и ядерно-цитозольных молекулярных процессов. Такая многофакторная организация делает механизмы регуляции митохондриальной трансляции чрезвычайно уязвимыми к нарушениям и одновременно трудными для изучения.

Мы поставили перед собой цель выяснить, каким образом выбранные белки-кандидаты ZMYND17, SLIRP и PTCD2 интегрированы в эту сложную сеть регуляторных элементов, и какие конкретные аспекты митохондриальной трансляции и посттрансляционной сборки дыхательных комплексов они модулируют. На первом этапе исследования для каждого из генов были созданы стабильные нокаутные клеточные линии с использованием системы CRISPR-Cas9, что позволило перейти к функциональному анализу. Последовательность подходов включала первоначальную оценку функционального состояния электрон-транспортной цепи через измерение дыхательной активности митохондрий. Поскольку исходная гипотеза предполагала участие изучаемых белков в регуляции трансляции, на втором этапе мы непосредственно оценивали эффективность митохондриального синтеза белка радиоизотопным и биоортогональным мечением *in vivo*. Дальнейшие исследования касались функциональности цепи окислительного фосфорилирования на молекулярном уровне; мы оценивали эффекты нокаутов на сборку и активность дыхательных комплексов и формированию надмолекулярных структур с помощью нативного электрофореза и иммуноблоттинга. Для выявления молекулярных механизмов выявленных нарушений, на заключительном этапе исследований, были привлечены методы ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте и ко-иммунопреципитации, позволившие исследовать взаимодействие целевых белков с компонентами трансляционного аппарата. Мы также применяли методы биоинформатического анализа для выяснения возможных причин функционального расхождения между белками-ортологами человека и дрожжей и реконструкции их эволюционной истории.

Согласно полученным результатам, в отличие от своего дрожжевого ортолога Mss51, который действует как специфический трансляционный активатор Cox1, ZMYND17 человека не проявляет аналогичной избирательной регуляции синтеза этой субъединицы. Однако данные позволяют предположить, что ZMYND17, аналогично Mss51, может взаимодействовать с синтезируемым COI, регулируя его интеграцию, что объясняет наблюдаемую дестабилизацию

IV комплекса при нокауте *ZMYND17*. Непосредственные молекулярные механизмы этой регуляции, как и регуляции ассоциации субчастиц АТФ-синтазы, требуют дальнейшего изучения, в частности, анализа конкретных дефектов сборки обоих комплексов. Тем не менее, наши данные впервые раскрывают молекулярные основы патологических фенотипов, ранее описанных на мышинных моделях.

В случае SLIRP наши результаты не только подтверждают данные криоэлектронной микроскопии о его ассоциации с миторибосомой, но и впервые демонстрируют его специфическое влияние на трансляцию, выявляя роль в регуляции синтеза всех трех каталитических митохондриально кодируемых субъединиц IV комплекса. Касательно PTCD2, впервые полученная линия с полной функциональной делецией гена позволила однозначно установить, что нарушения дыхания и активности комплексов являются прямым следствием селективного воздействия белка на эффективность трансляции мРНК COIII. Совокупность биохимических данных и результатов структурных исследований создает основу для дальнейшего раскрытия точных молекулярных механизмов и идентификации РНК-мишеней для SLIRP и PTCD2.

Таким образом, представленная работа не только расширяет понимание фундаментальных принципов организации системы митохондриальной трансляции у человека, но и закладывает основу для разработки новых направлений изучения функционирования органелл и терапии митохондриальных заболеваний. В частности, выявление полной "карты" взаимосвязей регуляторных сетей митохондриальной трансляции позволит в перспективе создать полноценную *in vitro* систему биосинтеза белка в органелле. Разработка такой системы откроет новые возможности для скрининга митохондриальной токсичности антибиотиков и других фармакологических препаратов, а также для разработки персонализированной терапии, направленной на коррекцию специфических дефектов биосинтеза белка в митохондриях человека.

На основании результатов наших исследований можно сделать следующие выводы:

- 1) Делеция в гене белка *ZMYND17* не приводит к изменениям профиля митохондриальной трансляции, при этом оказывая влияние на митохондриальную функцию.
- 2) Несмотря на общность происхождения в ходе эволюции белок человека *ZMYND17* и его дрожжевой ортолог *Mss51* приобрели различные функции.
- 3) Делеция в гене белка SLIRP приводит к снижению эффективности трансляции митохондриальных мРНК, кодирующих субъединицы цитохром с оксидазы.
- 4) Белок PTCD2 взаимодействует с ассоциированной миторибосомой. Делеция в кодирующем его гене приводит к снижению эффективности трансляции и количества субъединицы цитохром с оксидазы COIII, что фенотипически проявляется в снижении скорости

потребления кислорода и удельной активности комплекса IV. В совокупности эти данные указывают на то, что PTCD2 является трансляционным регулятором мРНК СОIII.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gray M.W. Mitochondrial Evolution // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. Т. 4, № 9. С. a011403–a011403.
2. Sharma M.R. и др. Structure of the Mammalian Mitochondrial Ribosome Reveals an Expanded Functional Role for Its Component Proteins // Cell. 2003. Т. 115, № 1. С. 97–108.
3. Desai N. и др. The structure of the yeast mitochondrial ribosome // Science. 2017. Т. 355, № 6324. С. 528–531.
4. Brischigliaro M. и др. Mitochondrial ribosome biogenesis and redox sensing // FEBS Open Bio. 2024. Т. 14, № 10. С. 1640–1655.
5. Boß L. и др. Crucial role and conservation of the three [2Fe-2S] clusters in the human mitochondrial ribosome // J. Biol. Chem. 2025. Т. 301, № 2. С. 108087.
6. Kuzmenko A. и др. Aim-less translation: loss of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation initiation factor mIF3/Aim23 leads to unbalanced protein synthesis // Sci. Rep. 2016. Т. 6, № 1. С. 18749.
7. Chicherin I.V. и др. Initiation Factor 3 is Dispensable For Mitochondrial Translation in Cultured Human Cells // Sci. Rep. 2020. Т. 10, № 1. С. 7110.
8. Remes C. и др. Translation initiation of leaderless and polycistronic transcripts in mammalian mitochondria // Nucleic Acids Res. 2023. Т. 51, № 2. С. 891–907.
9. Derbikova K.S. и др. Activation of Yeast Mitochondrial Translation: Who Is in Charge? // Biochem. Mosc. 2018. Т. 83, № 2. С. 87–97.
10. Richman T.R. и др. Loss of the RNA-binding protein TACO1 causes late-onset mitochondrial dysfunction in mice // Nat. Commun. 2016. Т. 7, № 1. С. 11884.
11. Moyer A.L., Wagner K.R. Mammalian *Mss5l* is a Skeletal Muscle-Specific Gene Modulating Cellular Metabolism // J. Neuromuscul. Dis. 2015. Т. 2, № 4. С. 371–385.
12. Rovira Gonzalez Y.I. и др. Mss5l deletion enhances muscle metabolism and glucose homeostasis in mice // JCI Insight. 2019. Т. 4, № 20. С. e122247.
13. Fujita R. и др. Zmynd17 controls muscle mitochondrial quality and whole-body metabolism // FASEB J. 2018. Т. 32, № 9. С. 5012–5025.
14. Pinker F. и др. PPR proteins shed a new light on RNase P biology // RNA Biol. 2013. Т. 10, № 9. С. 1457–1468.
15. Rackham O. и др. Pentatricopeptide repeat domain protein 1 lowers the levels of mitochondrial leucine tRNAs in cells // Nucleic Acids Res. 2009. Т. 37, № 17. С. 5859–5867.
16. Davies S.M.K. и др. MRPS27 is a pentatricopeptide repeat domain protein required for the translation of mitochondrially encoded proteins // FEBS Lett. 2012. Т. 586, № 20. С. 3555–3561.
17. Lightowlers R.N., Chrzanowska-Lightowlers Z.M.A. PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression // Biochem. J. 2008. Т. 416, № 1. С. e5–e6.
18. Singh V. и др. Structural basis of LRPPRC–SLIRP-dependent translation by the mitoribosome // Nat. Struct. Mol. Biol. 2024. Т. 31, № 12. С. 1838–1847.
19. Xu F. и др. The role of the *LRPPRC* (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome *c* oxidase) I and COX III mRNA // Biochem. J. 2004. Т. 382, № 1. С. 331–336.
20. Shaw J.M., Nunnari J. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast // Trends Cell Biol. 2002. Т. 12, № 4. С. 178–184.
21. Lackner L.L. Shaping the dynamic mitochondrial network // BMC Biol. 2014. Т. 12, № 1. С. 35.
22. Becker T., Wagner R. Mitochondrial Outer Membrane Channels: Emerging Diversity in Transport Processes // BioEssays. 2018. Т. 40, № 7. С. 1800013.
23. Giacomello M. и др. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. Т. 21, № 4. С. 204–224.

24. Reichert A.S., Neupert W. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria—role in protein transport // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2002. T. 1592, № 1. C. 41–49.
25. Zick M., Rabl R., Reichert A.S. Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2009. T. 1793, № 1. C. 5–19.
26. Papa S. и др. The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria // *Advances in Mitochondrial Medicine* / под ред. Scatena R., Bottoni P., Giardina B. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. T. 942. C. 3–37.
27. Fernández-Vizarra E., Tiranti V., Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2009. T. 1793, № 1. C. 200–211.
28. Jonckheere A.I., Smeitink J.A.M., Rodenburg R.J.T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2012. T. 35, № 2. C. 211–225.
29. Dudkina N.V. и др. Structure and function of mitochondrial supercomplexes // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2010. T. 1797, № 6–7. C. 664–670.
30. Kohler A. и др. The functional significance of mitochondrial respiratory chain supercomplexes // *EMBO Rep.* 2023. T. 24, № 11. C. e57092.
31. Novack G.V. и др. Mitochondrial Supercomplexes: Physiological Organization and Dysregulation in Age-Related Neurodegenerative Disorders // *Front. Endocrinol.* 2020. T. 11. C. 600.
32. Strauss M. и др. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane // *EMBO J.* 2008. T. 27, № 7. C. 1154–1160.
33. Brand M.D. и др. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease: Mitochondrial function in ageing and disease // *Br. J. Dermatol.* 2013. T. 169. C. 1–8.
34. Yang Y. и др. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. T. 104, № 17. C. 7253–7258.
35. Ahlqvist K.J., Suomalainen A., Hämäläinen R.H. Stem cells, mitochondria and aging // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2015. T. 1847, № 11. C. 1380–1386.
36. Shutt T., Gray M. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins // *Trends Genet.* 2006. T. 22, № 2. C. 90–95.
37. Formaggioni A., Luchetti A., Plazzi F. Mitochondrial Genomic Landscape: A Portrait of the Mitochondrial Genome 40 Years after the First Complete Sequence // *Life.* 2021. T. 11, № 7. C. 663.
38. Burger G. и др. Strikingly Bacteria-Like and Gene-Rich Mitochondrial Genomes throughout Jakobid Protists // *Genome Biol. Evol.* 2013. T. 5, № 2. C. 418–438.
39. Yang J. и др. The Development of Mitochondrial Gene Editing Tools and Their Possible Roles in Crop Improvement for Future Agriculture // *Adv. Genet.* 2022. T. 3, № 1. C. 2100019.
40. Sloan D.B. и др. Rapid Evolution of Enormous, Multichromosomal Genomes in Flowering Plant Mitochondria with Exceptionally High Mutation Rates // *PLoS Biol.* / под ред. Gray M.W. 2012. T. 10, № 1. C. e1001241.
41. Gagat P., Mackiewicz D., Mackiewicz P. Peculiarities within peculiarities – dinoflagellates and their mitochondrial genomes // *Mitochondrial DNA Part B.* 2017. T. 2, № 1. C. 191–195.
42. Berná L., Rego N., Francia M.E. The Elusive Mitochondrial Genomes of Apicomplexa: Where Are We Now? // *Front. Microbiol.* 2021. T. 12. C. 751775.
43. Makiuchi T., Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa // *Biochimie.* 2014. T. 100. C. 3–17.
44. Yahalomi D. и др. A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: *Henneguya*) lacks a mitochondrial genome // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020. T. 117, № 10. C. 5358–5363.
45. John U. и др. An aerobic eukaryotic parasite with functional mitochondria that likely lacks a mitochondrial genome // *Sci. Adv.* 2019. T. 5, № 4. C. eaav1110.
46. Kayal E., Smith D.R. Is the Dinoflagellate *Amoebophrya* Really Missing an mtDNA? // *Mol. Biol. Evol.* / под ред. Ouangraoua A. 2021. T. 38, № 6. C. 2493–2496.

47. Novák L.V.F. и др. Genomics of Preaxostyla Flagellates Illuminates the Path Towards the Loss of Mitochondria // PLOS Genet. / под ред. Dutcher S.K. 2023. Т. 19, № 12. С. e1011050.
48. Butenko A. и др. Mitochondrial genomes revisited: why do different lineages retain different genes? // BMC Biol. 2024. Т. 22, № 1. С. 15.
49. Gissi C., Iannelli F., Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species // Heredity. 2008. Т. 101, № 4. С. 301–320.
50. Pereira S.L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics // Genet. Mol. Biol. 2000. Т. 23, № 4. С. 745–752.
51. Montaña-Lozano P. и др. Comparative genomic analysis of vertebrate mitochondria reveals a differential of rearrangements rate between taxonomic class // Sci. Rep. 2022. Т. 12, № 1. С. 5479.
52. Lightowlers R.N., Rozanska A., Chrzanowska-Lightowlers Z.M. Mitochondrial protein synthesis: Figuring the fundamentals, complexities and complications, of mammalian mitochondrial translation // FEBS Lett. 2014. Т. 588, № 15. С. 2496–2503.
53. Chrzanowska-Lightowlers Z., Rorbach J., Minczuk M. Human mitochondrial ribosomes can switch structural tRNAs – but when and why? // RNA Biol. 2017. Т. 14, № 12. С. 1668–1671.
54. Agrawal R.K. и др. Structure and function of organellar ribosomes as revealed by cryo-EM // Ribosomes / под ред. Rodnina M.V., Wintermeyer W., Green R. Vienna: Springer Vienna, 2011. С. 83–96.
55. Brown A. и др. Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria // Science. 2014. Т. 346, № 6210. С. 718–722.
56. Amunts A. и др. The structure of the human mitochondrial ribosome // Science. 2015. Т. 348, № 6230. С. 95–98.
57. Englmeier R., Pfeffer S., Förster F. Structure of the Human Mitochondrial Ribosome Studied In Situ by Cryoelectron Tomography // Structure. 2017. Т. 25, № 10. С. 1574-1581.e2.
58. Itoh Y. и др. Mechanism of membrane-tethered mitochondrial protein synthesis // Science. 2021. Т. 371, № 6531. С. 846–849.
59. Tan B.G. и др. The human mitochondrial genome contains a second light strand promoter // Mol. Cell. 2022. Т. 82, № 19. С. 3646-3660.e9.
60. Bouda E., Stapon A., Garcia-Diaz M. Mechanisms of mammalian mitochondrial transcription // Protein Sci. 2019. Т. 28, № 9. С. 1594–1605.
61. Basu U. и др. Structure, mechanism, and regulation of mitochondrial DNA transcription initiation // J. Biol. Chem. 2020. Т. 295, № 52. С. 18406–18425.
62. Milón P., Rodnina M.V. Kinetic control of translation initiation in bacteria // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2012. Т. 47, № 4. С. 334–348.
63. Gualerzi C.O., Pon C.L. Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects // Cell. Mol. Life Sci. 2015. Т. 72, № 22. С. 4341–4367.
64. Villegas A., Kropinski A.M. An analysis of initiation codon utilization in the Domain Bacteria – concerns about the quality of bacterial genome annotation // Microbiology. 2008. Т. 154, № 9. С. 2559–2661.
65. Sussman J.K., Simons E.L., Simons R.W. ***Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo** // Mol. Microbiol. 1996. Т. 21, № 2. С. 347–360.
66. Hecht A. и др. Measurements of translation initiation from all 64 codons in E. coli // Nucleic Acids Res. 2017. Т. 45, № 7. С. 3615–3626.
67. Fearnley I.M., Walker J.E. Initiation codons in mammalian mitochondria: differences in genetic code in the organelle // Biochemistry. 1987. Т. 26, № 25. С. 8247–8251.
68. Anderson S. и др. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // Nature. 1981. Т. 290, № 5806. С. 457–465.
69. Van Etten W.J., Janssen G.R. An AUG initiation codon, not codon–anticodon complementarity, is required for the translation of unleadered mRNA in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 1998. Т. 27, № 5. С. 987–1001.
70. Laursen B.S. и др. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005. Т. 69, № 1. С. 101–123.

71. Lancaster L., Noller H.F. Involvement of 16S rRNA Nucleotides G1338 and A1339 in Discrimination of Initiator tRNA // *Mol. Cell*. 2005. T. 20, № 4. C. 623–632.
72. Hartz D. и др. Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by *Escherichia coli* IF3. // *Genes Dev*. 1990. T. 4, № 10. C. 1790–1800.
73. Leiva L.E., Katz A. Regulation of Leaderless mRNA Translation in Bacteria // *Microorganisms*. 2022. T. 10, № 4. C. 723.
74. Tedin K. и др. Translation initiation factor 3 antagonizes authentic start codon selection on leaderless mRNAs // *Mol. Microbiol*. 1999. T. 31, № 1. C. 67–77.
75. Christian B.E., Spremulli L.L. Preferential Selection of the 5'-Terminal Start Codon on Leaderless mRNAs by Mammalian Mitochondrial Ribosomes // *J. Biol. Chem*. 2010. T. 285, № 36. C. 28379–28386.
76. Lee M. и др. Selection of initiator tRNA and start codon by mammalian mitochondrial initiation factor 3 in leaderless mRNA translation // *Nucleic Acids Res*. 2025. T. 53, № 3. C. gkaf021.
77. Moran J.C. и др. The human mitochondrial mRNA structurome reveals mechanisms of gene expression // *Science*. 2024. T. 385, № 6706. C. eadm9238.
78. Kummer E. и др. Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM // *Nature*. 2018. T. 560, № 7717. C. 263–267.
79. Khawaja A. и др. Distinct pre-initiation steps in human mitochondrial translation // *Nat. Commun*. 2020. T. 11, № 1. C. 2932.
80. Roloff G.A., Henry M.F. Mam33 promotes cytochrome *c* oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria // *Mol. Biol. Cell* / под ред. Fox T.D. 2015. T. 26, № 16. C. 2885–2894.
81. Hillman G.A., Henry M.F. The yeast protein Mam33 functions in the assembly of the mitochondrial ribosome // *J. Biol. Chem*. 2019. T. 294, № 25. C. 9813–9829.
82. Zamudio-Ochoa A. и др. The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial *COX1* transcript in yeast // *RNA Biol*. 2014. T. 11, № 7. C. 953–967.
83. Perez-Martinez X. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p // *EMBO J*. 2003. T. 22, № 21. C. 5951–5961.
84. Zamudio-Ochoa A. и др. Insights into the Translational Activation Mechanisms of the *COX1* mRNA in Yeast Mitochondria. *Molecular Biology*, 2024.
85. Herrmann J.M., Woellhaf M.W., Bonnefoy N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res*. 2013. T. 1833, № 2. C. 286–294.
86. Schmitzlinneweber C., Small I. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression // *Trends Plant Sci*. 2008. T. 13, № 12. C. 663–670.
87. Lipinski K.A. и др. 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. T. 28, № 10. C. 2935–2948.
88. Gutmann B., Gobert A., Giegé P. Mitochondrial Genome Evolution and the Emergence of PPR Proteins // *Advances in Botanical Research*. Elsevier, 2012. T. 63. C. 253–313.
89. Manna S. An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications // *Biochimie*. 2015. T. 113. C. 93–99.
90. Yagi Y. и др. Construction of a Versatile, Programmable RNA-Binding Protein Using Designer PPR Proteins and Its Application for Splicing Control in Mammalian Cells // *Cells*. 2022. T. 11, № 22. C. 3529.
91. Cui J. и др. LRPPRC: A Multifunctional Protein Involved in Energy Metabolism and Human Disease // *Front. Physiol*. 2019. T. 10. C. 595.
92. Weikum E.R., Liu X., Ortlund E.A. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective // *Protein Sci*. 2018. T. 27, № 11. C. 1876–1892.
93. Hatchell E.C. и др. SLIRP, a Small SRA Binding Protein, Is a Nuclear Receptor Corepressor // *Mol. Cell*. 2006. T. 22, № 5. C. 657–668.

94. Chujo T. и др. LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria // *Nucleic Acids Res.* 2012. Т. 40, № 16. С. 8033–8047.
95. Ruzzenente B. и др. LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs: LRPPRC regulates mitochondrial translation // *EMBO J.* 2012. Т. 31, № 2. С. 443–456.
96. Lagouge M. и др. SLIRP Regulates the Rate of Mitochondrial Protein Synthesis and Protects LRPPRC from Degradation // *PLOS Genet.* / под ред. Barsh G.S. 2015. Т. 11, № 8. С. e1005423.
97. Rubalcava-Gracia D. и др. LRPPRC and SLIRP synergize to maintain sufficient and orderly mammalian mitochondrial translation // *Nucleic Acids Res.* 2024. Т. 52, № 18. С. 11266–11282.
98. Soto I.C. и др. A Heme-Sensing Mechanism in the Translational Regulation of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis // *Cell Metab.* 2012. Т. 16, № 6. С. 801–813.
99. Gebicka L. Redox reactions of heme proteins with flavonoids // *J. Inorg. Biochem.* 2020. Т. 208. С. 111095.
100. Hickman M.J., Winston F. Heme Levels Switch the Function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between Transcriptional Activator and Transcriptional Repressor // *Mol. Cell. Biol.* 2007. Т. 27, № 21. С. 7414–7424.
101. Chen J.-J. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias // *Blood.* 2007. Т. 109, № 7. С. 2693–2699.
102. Mense S.M., Zhang L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases // *Cell Res.* 2006. Т. 16, № 8. С. 681–692.
103. Padmanaban G., Venkateswar V., Rangarajan P.N. Haem as a multifunctional regulator // *Trends Biochem. Sci.* 1989. Т. 14, № 12. С. 492–496.
104. Gorman G.S. и др. Mitochondrial diseases // *Nat. Rev. Dis. Primer.* 2016. Т. 2, № 1. С. 16080.
105. Balwani M., Desnick R.J. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment // *Blood.* 2012. Т. 120, № 23. С. 4496–4504.
106. Morava E., De Meirleir L., Carrozzo R. Disorders of the Pyruvate Metabolism and the Krebs Cycle // *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* / под ред. Blau N. и др. Cham: Springer International Publishing, 2022. С. 739–763.
107. Ast T. и др. METTL17 is an Fe-S cluster checkpoint for mitochondrial translation // *Mol. Cell.* 2024. Т. 84, № 2. С. 359-374.e8.
108. Oldfors A., Tulinius M. Mitochondrial Encephalomyopathies // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003. Т. 62, № 3. С. 217–227.
109. Weraarpachai W. и др. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome // *Nat. Genet.* 2009. Т. 41, № 7. С. 833–837.
110. Borna N.N. и др. Mitochondrial ribosomal protein PTC3 mutations cause oxidative phosphorylation defects with Leigh syndrome // *neurogenetics.* 2019. Т. 20, № 1. С. 9–25.
111. Guo L. и др. Pathogenic SLIRP variants as a novel cause of autosomal recessive mitochondrial encephalomyopathy with complex I and IV deficiency // *Eur. J. Hum. Genet.* 2021. Т. 29, № 12. С. 1789–1795.
112. Wang F. и др. Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Т. 9. С. 675465.
113. Hughes L.A., Rackham O., Filipovska A. Illuminating mitochondrial translation through mouse models // *Hum. Mol. Genet.* 2024. Т. 33, № R1. С. R61–R79.
114. Schlieben L.D., Prokisch H. The Dimensions of Primary Mitochondrial Disorders // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. Т. 8. С. 600079.
115. Zhang G., Gurtu V., Kain S.R. An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Т. 227, № 3. С. 707–711.

116. Green M.R., Sambrook J. The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: "Ultracompetent" Cells // Cold Spring Harb. Protoc. 2020. T. 2020, № 6. C. pdb.prot101196.
117. Ivics Z. и др. Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells // Cell. 1997. T. 91, № 4. C. 501–510.
118. Clayton D.A., Shadel G.S. Isolation of Mitochondria from Tissue Culture Cells // Cold Spring Harb. Protoc. 2014. T. 2014, № 10. C. pdb.prot080002.
119. Wittig I., Braun H.-P., Schägger H. Blue native PAGE // Nat. Protoc. 2006. T. 1, № 1. C. 418–428.
120. 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. T. 26, № 12. C. 1367–1372.
121. Cox J. и др. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment // J. Proteome Res. American Chemical Society, 2011. T. 10, № 4. C. 1794–1805.
122. Altschul S.F. и др. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. T. 215, № 3. C. 403–410.
123. Sayers E.W. и др. Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2023 // Nucleic Acids Res. 2023. T. 51, № D1. C. D29–D38.
124. Finn R.D., Clements J., Eddy S.R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching // Nucleic Acids Res. 2011. T. 39, № suppl. C. W29–W37.
125. Waterhouse A.M. и др. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench // Bioinformatics. 2009. T. 25, № 9. C. 1189–1191.
126. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. T. 33, № 7. C. 1870–1874.
127. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation // Bioinformatics. 2007. T. 23, № 1. C. 127–128.
128. Weiss H., Sebald W., Bücher T. Cycloheximide Resistant Incorporation of Amino Acids into a Polypeptide of the Cytochrome Oxidase of *Neurospora crassa* // Eur. J. Biochem. 1971. T. 22, № 1. C. 19–26.
129. Sasarman F., Shoubridge E.A. Radioactive Labeling of Mitochondrial Translation Products in Cultured Cells // Mitochondrial Disorders / под ред. Wong, Ph.D. L.-J.C. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. T. 837. C. 207–217.
130. Sletten E.M., Bertozzi C.R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. T. 48, № 38. C. 6974–6998.
131. Kolb H.C., Sharpless K.B. The growing impact of click chemistry on drug discovery // Drug Discov. Today. 2003. T. 8, № 24. C. 1128–1137.
132. Calve S. и др. Incorporation of non-canonical amino acids into the developing murine proteome // Sci. Rep. 2016. T. 6, № 1. C. 32377.
133. Mátés L. и др. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates // Nat. Genet. 2009. T. 41, № 6. C. 753–761.
134. Kowarz E., Löscher D., Marschalek R. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines // Biotechnol. J. 2015. T. 10, № 4. C. 647–653.
135. Xu F. и др. Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome *b* expression and a marked reduction in ubiquinol–cytochrome *c* reductase activity in mouse heart mitochondria // Biochem. J. 2008. T. 416, № 1. C. 15–26.
136. Batterson P.M. и др. HIGH-FAT diet increases electron transfer flavoprotein synthesis and lipid respiration in skeletal muscle during exercise training in female mice // Physiol. Rep. 2023. T. 11, № 20. C. e15840.
137. MacCannell A.D.V. и др. Sexual dimorphism in adipose tissue mitochondrial function and metabolic flexibility in obesity // Int. J. Obes. 2021. T. 45, № 8. C. 1773–1781.
138. Eagleson K.L. и др. Proteomic and mitochondrial adaptations to early-life stress are distinct in juveniles and adults // Neurobiol. Stress. 2020. T. 13. C. 100251.

139. Del Campo A. и др. Muscle function decline and mitochondria changes in middle age precede sarcopenia in mice // *Aging*. 2018. Т. 10, № 1. С. 34–55.
140. Decoster E. и др. The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria // *Mol. Gen. Genet. MGG*. 1990. Т. 224, № 1. С. 111–118.
141. Schäfer E. и др. Architecture of Active Mammalian Respiratory Chain Supercomplexes // *J. Biol. Chem*. 2006. Т. 281, № 22. С. 15370–15375.
142. Acín-Pérez R. и др. Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria // *Mol. Cell*. 2004. Т. 13, № 6. С. 805–815.
143. Diaz F. и др. Cytochrome *c* Oxidase Is Required for the Assembly/Stability of Respiratory Complex I in Mouse Fibroblasts // *Mol. Cell. Biol*. 2006. Т. 26, № 13. С. 4872–4881.
144. Hofhaus G., Attardi G. Efficient Selection and Characterization of Mutants of a Human Cell Line Which are Defective in Mitochondrial DNA-Encoded Subunits of Respiratory NADH Dehydrogenase // *Mol. Cell. Biol*. 1995. Т. 15, № 2. С. 964–974.
145. Siira S.J. и др. LRPPRC-mediated folding of the mitochondrial transcriptome // *Nat. Commun*. 2017. Т. 8, № 1. С. 1532.
146. Brischigliaro M. и др. The human mitochondrial translation factor TACO1 alleviates mitoribosome stalling at polyproline stretches // *Nucleic Acids Res*. 2024. Т. 52, № 16. С. 9710–9726.