

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Пиунова Ульяна Евгеньевна

**Изучение молекулярных механизмов инициации трансляции в
митохондриях**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

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

- | | |
|------------------------------|--|
| Научный руководитель | — Левицкий Сергей Алексеевич , кандидат биологических наук |
| Официальные оппоненты | Сергиев Петр Владимирович , член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, и. о. директора Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова |
| | — Лазарев Василий Николаевич , доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией генной инженерии, заместитель генерального директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» |
| | — Алкалаева Елена Зиновьевна , кандидат биологических наук, заведующий лабораторией механизмов и контроля трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук |

Защита диссертации состоится «04» декабря 2025 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, биологический факультет, ауд. М1.

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

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3636>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Митохондрии – двумембранные органеллы большинства эукариотических клеток – согласно теории симбиогенеза произошли от свободноживущих предков современных пурпурных альфа-протеобактерий. 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 с 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. Также были изучены некоторые механизмы адаптации сборки миторибосом к окислительному статусу клетки и модуляции митохондриальной трансляции.

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 – mtlF2 и mtlF3, 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.

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. 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.

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.

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. Известны два таких белка, входящие в состав миторибосомы человека. 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. 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.

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.

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.

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 COIII, 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.

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.

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.

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.

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.

Степень достоверности и апробация результатов

По результатам работы опубликовано 4 статьи, все из них – 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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Содержание диссертации

В главе «Введение» обоснована актуальность исследования тонкой регуляции инициации митохондриальной трансляции человека, определены цель и задачи работы. Сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, а также методология исследования. Приведены положения, выносимые на защиту, и сведения об апробации работы. В главе "Обзор литературы" систематизированы современные представления о структуре и функциях митохондрий человека и организации в них аппарата трансляции. Особое внимание уделено ключевым компонентам и известным механизмам регуляции инициации синтеза митохондриально кодируемых белков. Глава "Материалы и методы" содержит подробное описание экспериментальных подходов, включая используемые клеточные линии, генетические конструкции, олигонуклеотиды и коммерческие реагенты с указанием производителей. Детально охарактеризованы примененные молекулярно-биологические, биохимические, биоинформатические и цитологические методики. В главе "Результаты" представлены полученные экспериментальные данные, которые демонстрируют функциональные последствия нокаута ряда ядерных генов для митохондриальной трансляции и дыхательной функции. В главе "Обсуждение" проведен комплексный анализ собственных результатов в свете данных литературы. Выдвинуты и обоснованы гипотезы, интегрирующие новые данные в существующую модель работы митохондриальной трансляционной системы, предложена возможная функциональная роль исследуемых белков. В главе «Заключение» изложены основные выводы работы, подводящие итог проведенному исследованию и определяющие

его значение для понимания принципов тонкой регуляции инициации трансляции в митохондриях человека.

Результаты работы

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.

ZMYND17

Белок ZMYND17, согласно данным литературы, является ортологом дрожжевого Mss51 – трансляционного активатора субъединицы 1 цитохром с оксидазы, что также подтверждается биоинформатическим анализом, проведенным в ходе данной работы. ZMYND17 также, как и его дрожжевой гомолог, локализован в митохондриях и содержит домен типа цинкового пальца. 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, содержащая делецию в первом экзоне гена *ZMYND17*. 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.

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* (рисунок 1). 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 выраженному снижению эффективности трансляции мРНК Cox1.

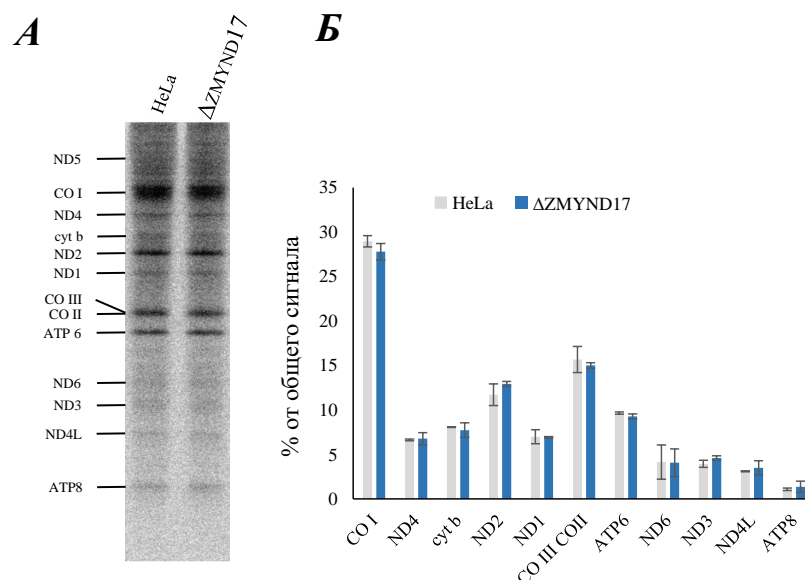


Рисунок 1. Анализ митохондриальной трансляции *in vivo*. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HeLa», из клеток нокаутной линии – « Δ ZMYND17». **А)** Радиоавтограф продуктов митохондриальной трансляции. Представлен результат типичного эксперимента. **Б)** Гистограмма, отражающая средние значения эффективности трансляции для каждого митохондриально кодируемого белка. 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 ($M \pm SD$).

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. По результатам проведенных измерений, уровень базального дыхания не различается у клеток нокаутной и исходной линий (рисунок 2А). Однако, отсутствие функционального белка ZMYND17 приводит к снижению максимального (разобщенного) дыхания на ~27%, относительного такового у линии дикого типа (рисунок 2А). Уменьшение скорости потребления кислорода в присутствие разобщителя может свидетельствовать о нарушении активности цитохром с оксидазы. Эту гипотезу мы подтвердили, спектрофотометрически измерив активность IV комплекса в изолированных митохондриях мутантной и исходной линий клеток (рисунок 2Б): действительно, в отсутствие ZMYND17 активность цитохром с оксидазы снижается на ~23% по сравнению с нормой.

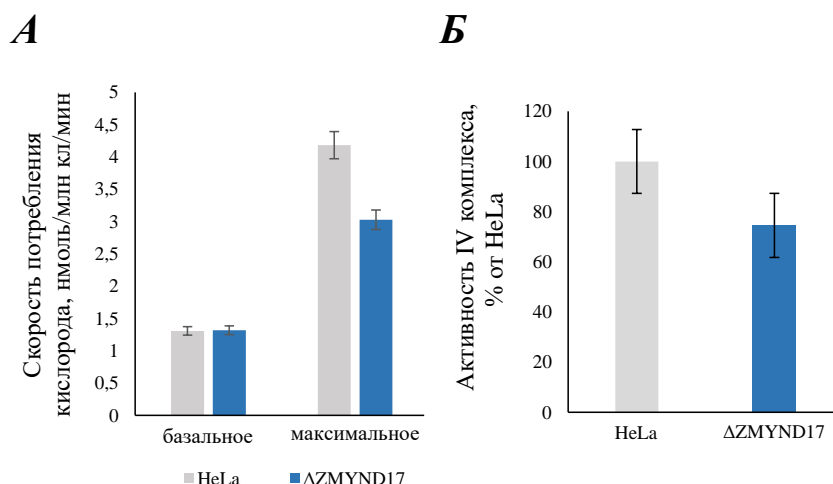


Рисунок 2. Митохондриальное дыхание и активность цитохром с оксидазы в клетках нокаутной по гену *ZMYND17* линии ($\Delta ZMYND17$) и линии дикого типа (HeLa). **А)** Скорость потребления кислорода, выраженная в нМ/10⁶ клеток/мин. Данные основаны на результатах четырех независимых экспериментов. **Б)** 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 ($M \pm SD$).

Поскольку 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 встраивание COI в собираемый IV комплекс или другие этапы сборки цитохром с оксидазы, что приводит к его ускоренной деградации.

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 – корового комплекса для всех суперкомплексов в митохондриях млекопитающих. Эксперимент не выявил значимых различий в количестве и стехиометрическом составе суперкомплексов митохондриальных мембран между мутантной и исходной клеточными линиями (рисунок 3А). 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 активности полноценного F₀F₁-комплекса при накоплении свободной F₁-субчастицы в митохондриях нокаутной по гену *ZMYND17* линии клеток, по сравнению с нормой (рисунок 3Б). Такой результат указывает на роль *ZMYND17* в процессе сборки или стабилизации V комплекса.

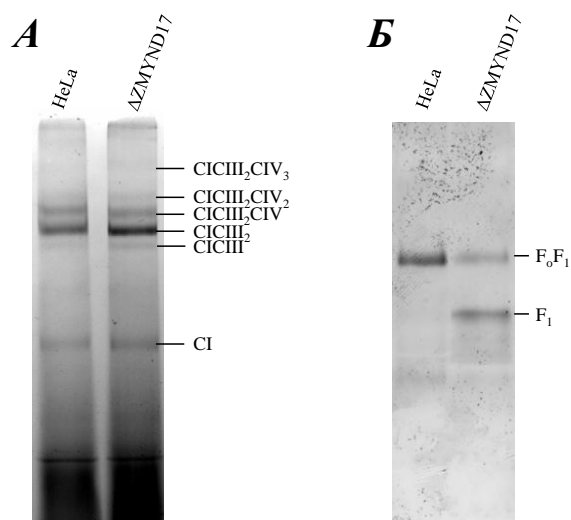


Рисунок 3. Активность НАДН-дегидрогеназы и АТФ-синтазы в митохондриях клеток исходной линии HeLa (HeLa) и нокаутной линии по гену *ZMYND17* ($\Delta ZMYND17$) в геле после нативного электрофореза. Представлены результаты типичных экспериментов. **А)** Качественная реакция на активность НАДН-дегидрогеназы. Суперкомплексы различной стехиометрии обозначены справа. **Б)** Качественная реакция на активность АТФ-синтазы. Субъединицы АТФ-синтазы обозначены справа.

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 с, чей пул истощается при постоянной нагрузке на ЭТЦ.

Ортолог *ZMYND17*, белок Mss51 пекарских дрожжей, является одним из трансляционных активаторов Cox1, митохондриально кодируемой субъединицы цитохром с 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, содержащего 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, у пекарских дрожжей оказались менее похожими на предковую форму, чем утраченного (рисунок 4). Более того, учитывая значительную эволюционную дистанцию между таксонами, нельзя однозначно утверждать, что сохранившиеся домены современных белков происходят от одного и того же предкового домена.

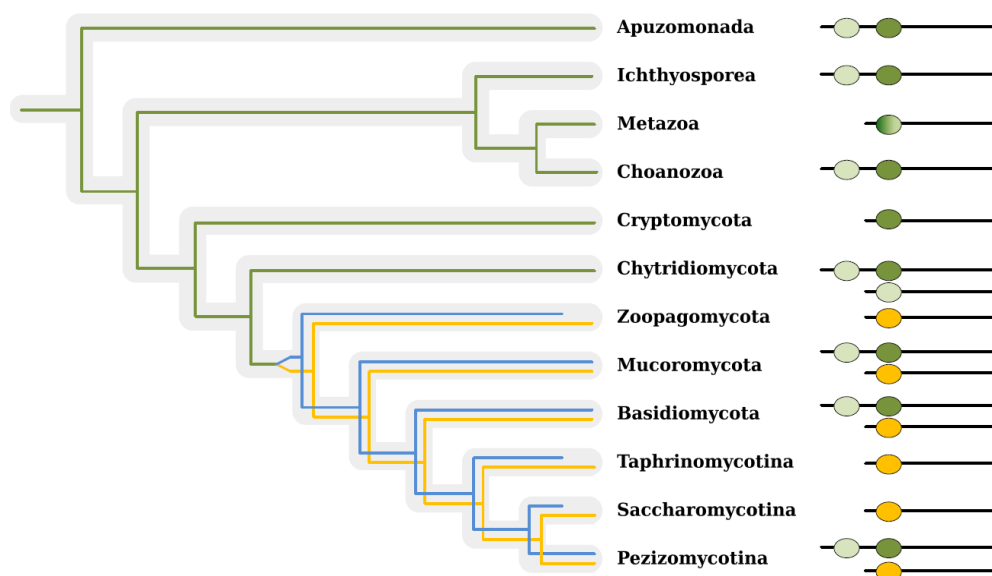


Рисунок 4. Биоинформатический анализ белков, гомологичных Mss51 и ZMYND17. Схема эволюционной истории гомологичных Mss51 и ZMYND17 белков и доменная архитектура, характерная для различных групп. Зеленым обозначены клады, содержащие белок с доменом zf-MYND до дупликации соответствующего гена. Желтым и синим обозначены клады, содержащие белки с доменами zf-Mss51 и zf-MYND, соответственно, после дупликации соответствующего гена. Зеленые и светлозеленые овалы – домены zf-MYND, желтые овалы – домены zf-Mss51.

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.

SLIRP

Данные криоэлектронной микроскопии позиционируют белок SLIRP у входного туннеля миторибосомы, при этом взаимодействие SLIRP с малой миторибосомной субчастицей опосредовано белком LRPPRC, который выступает в роли структурного адаптера. Несмотря на известную роль этого комплекса в стабилизации митохондриальной мРНК, ассоциация SLIRP и LRPPRC с миторибосомой предположительно указывает на участие в митохондриальной трансляции. Особый интерес представляет именно белок

SLIRP, который, обладая консервативным РНК-связывающим доменом, непосредственно контактирует с мРНК, поступающей в митохондрию.

Мы получили линию клеток человека HEK293T, нокаутную по гену *SLIRP*, 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. Отсутствие полноразмерного белка SLIRP в мутантной линии верифицировали методом иммуноблоттинга.

При анализе митохондриальных функций с помощью анализатора клеточного метаболизма Seahorse XF HS MINI оказалось, что отсутствие SLIRP приводит к снижению митохондриального дыхания – как базального, так и разобщенного (рисунок 5). 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.

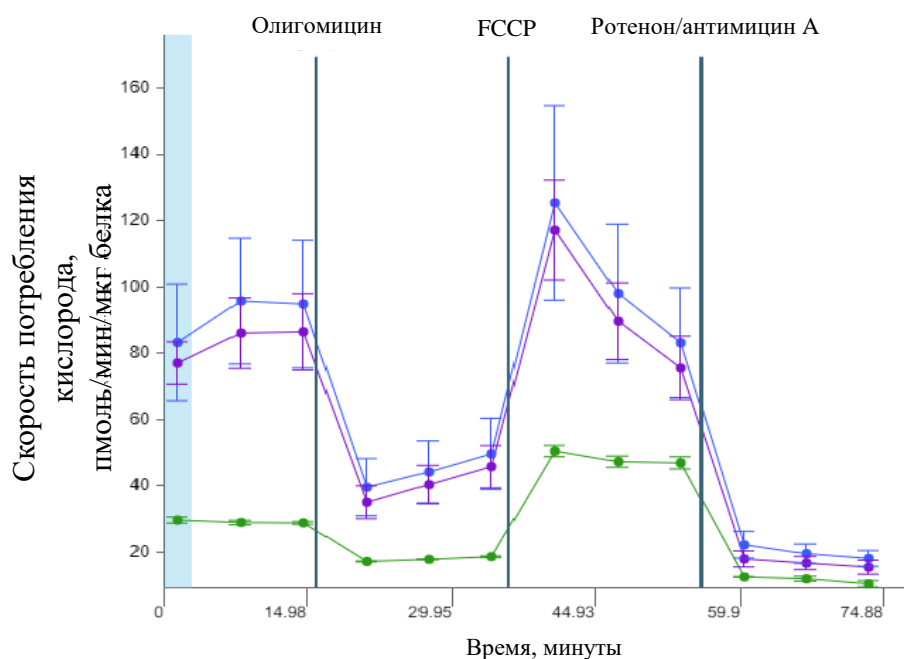


Рисунок 5. Анализ митохондриального дыхания с помощью биоанализатора Seahorse XF HS Mini. На графике представлена кинетика потребления кислорода (OCR) клетками в нормальных условиях и после добавления олигомицина, FCCP и ротенона/антимицина А (указаны сверху). Точки соответствуют измерениям OCR, соединены 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.

Результаты оценки скорости пролиферации 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.

Чтобы выявить влияние делеции в гене *SLIRP* на эффективность синтеза белка в митохондриях *in vivo*, использовали метод биоортогональной клик-химии. В основе метода лежит использование гомопропаргилглицина – неканонической аминокислоты, содержащей реактивную алкиновую группу, которая инкорпорируется в состав новосинтезированных митохондриально кодируемых полипептидов. Последующая высокоспецифичная конъюгация с флуорофором AF488-азид посредством клик-химии позволяет визуализировать в геле продукты митохондриальной трансляции. Проанализировав трансляционный профиль, 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 (рисунок 6А).

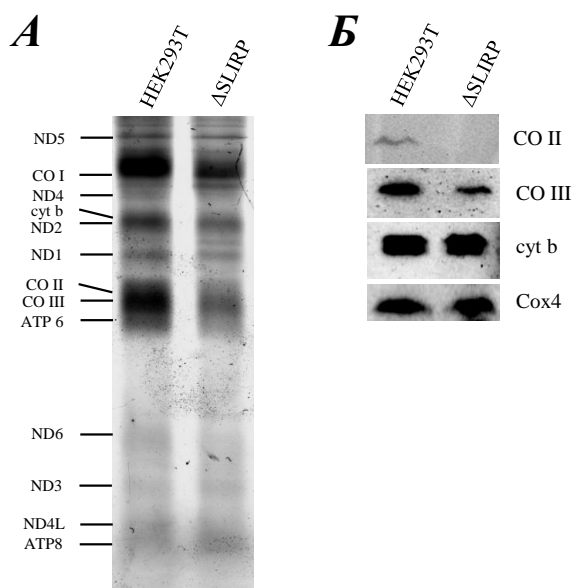


Рисунок 6. Анализ митохондриальной трансляции *in vivo*. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HEK293T», из клеток нокаутной линии – «ΔSLIRP». Представлены результаты типичных экспериментов. **А)** Флуоресцентная визуализация продуктов митохондриальной трансляции. Флуоресцентно меченные митохондриальные полипептиды обозначены слева. **Б)** Иммуноблоттинг клеточных лизатов с антителами, специфичными к митохондриально кодируемым белкам COII, COIII, cyt b и ядерно кодируемому Cox4 (указаны справа). Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

Для сравнения стабильного уровня митохондриально кодируемых белков ЭТЦ в органеллах линии дикого типа и мутантной линии мы провели иммуноблоттинг. Использовали специфические антитела к COII и COIII (субъединицы цитохром с-оксидазы) и цитохрому b (коровый компонент комплекса III). В качестве контроля использовали

ядерно кодируемую субъединицу IV комплекса Cox4 (рисунок 6Б). Результаты экспериментов указывают, что отсутствие SLIRP приводит к значительному уменьшению количества и эффективности трансляции компонентов комплекса IV: CO I, CO II и COIII, но не влияет на количество ядерно кодируемого Cox4. Эффективность синтеза других белков либо не отличается от таковой в интактной линии клеток, например, цитохрома b, либо снижается незначительно.

Комплекс LRPPRC-SLIRP является глобальным пост-транскрипционным регулятором экспрессии в митохондриях млекопитающих: участвует в поддержании стабильности нетранслируемых мРНК и процессинге пре-мРНК. 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. 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.

Уменьшение скорости потребления кислорода в присутствии разобщителя может свидетельствовать о нарушении функциональности цитохром с оксидазы. 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 (рисунок 7Б), а также снижением активности НАДН-дегидрогеназы (рисунок 7А). 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.

Значительное снижение эффективности синтеза COI, COII и COIII объясняет уменьшение количества IV комплекса и, как следствие, снижение как базального, так и разобщенного митохондриального дыхания (рисунок 5). Снижение активности и количества I комплекса (рисунок 7А, Б) 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. В митохондриях нокаутной линии клеток мы также наблюдали снижение активности полноценных F₀F₁-комплексов и

увеличение активности свободной F_1 субъединицы, что объясняется разбалансировкой синтеза митохондриально и ядерно кодируемых субъединиц V комплекса.

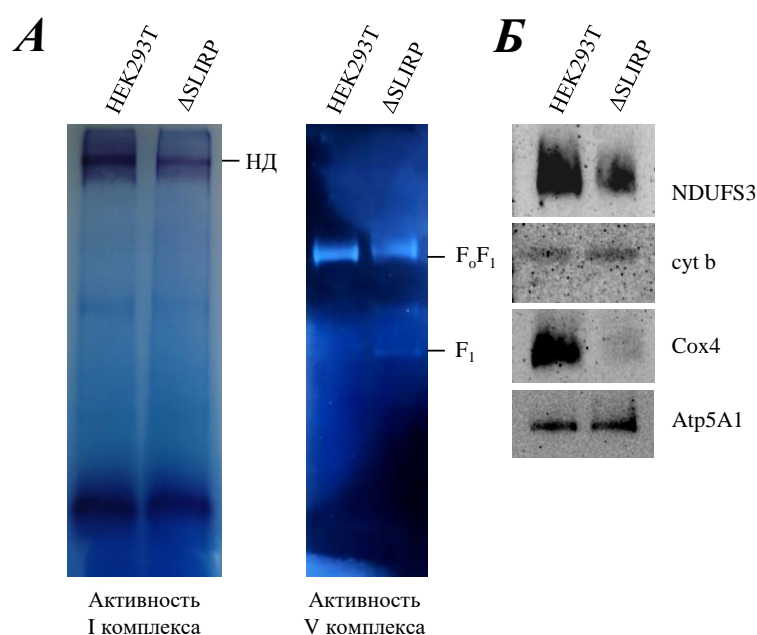


Рисунок 7. Анализ количества и активности комплексов и суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HEK293T», из клеток нокаутной линии – « Δ SLIRP». Представлены результаты типичных экспериментов. **А)** Качественная реакция на активность НАДН-дегидрогеназы (НД) и АТФ-синтазы (F_0F_1) после нативного электрофореза. **Б)** Иммуноблоттинг нативных комплексов дыхательной цепи с антителами, специфичными к субъединицам комплексов дыхательной цепи митохондрий: NDUF5S3, cyt b, Cox4 и Atp5A1 (указаны справа). Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

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. Мы провели анализ распределения белка SLIRP во фракциях митоторибосом и выявили совместную миграцию SLIRP с малыми субъединицами рибосом, но не с ассоциированными митоторибосомами (рисунок 8). При этом, распределение митоторибосомных субчастиц в отсутствие SLIRP не отличается от такого в клетках исходной линии, что свидетельствует о том, что исследуемый белок не необходим для сборки митоторибосом.

Совместно со структурными данными, полученный результат указывает на участие SLIRP в ранних этапах инициации трансляции. Мы предполагаем, что SLIRP, взаимодействуя с 28S субъединицей, облегчает релаксацию вторичных структур на мРНК в области стартового кодона 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 миторибосом.

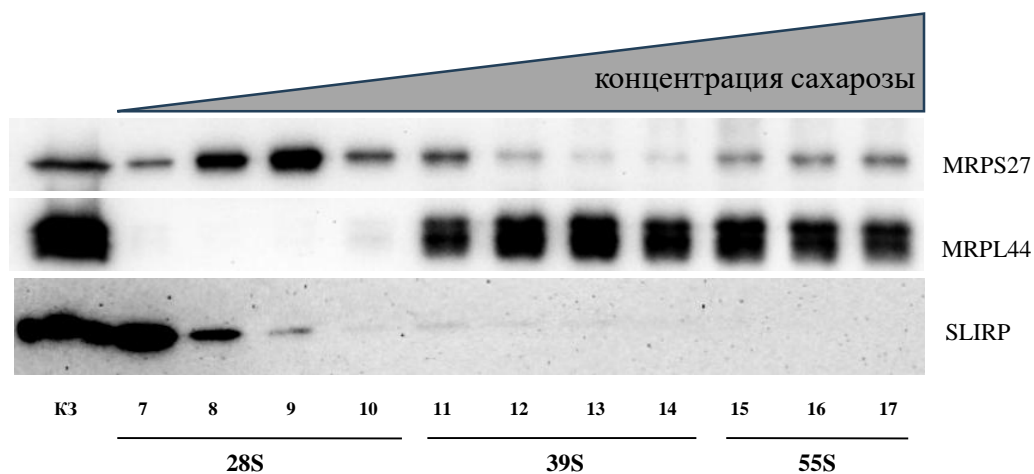


Рисунок 8. Анализ профиля миторибосом в клетках HEK293T. Иммуноблоттинг фракций линейного градиента сахарозы с антителами, специфичными к MRPS27, MRPL44 и SLIRP (указаны справа). Нумерация фракций приведена снизу. Контроль загрузки (КЗ) соответствует нанесенному 0,1% от общего объема лизата. Малая субъединица миторибосомы обозначена – 28S; большая субъединица – 39S; ассоциированная миторибосома – 55S. Представлен результат типичного эксперимента. Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

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 роль в регуляции синтеза белка оставалась неизученной.

Для того чтобы прояснить роль PTCD2 в регуляции трансляции в митохондриях, мы получили клеточную линию с функциональной делецией в гене исследуемого белка, подтвержденной иммуноблоттингом. В результате редактирования генома в клетках была выявлена гомозиготная делеция, захватывающая первый экзон (71 пара нуклеотидов) и прилегающий интронный участок (21 пара нуклеотидов). 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 (рисунок 9А, Б). При этом, уменьшение количества COIII оказалось более выраженным, по сравнению с COII (рисунок 9В). Незначительное снижение количества COII может

объясняться косвенным влиянием отсутствия *PTCD2*: нарушение сборки, в результате дефицита COII, и активности IV комплекса ЭТЦ приводит к уменьшению стабильности и времени жизни его субъединицы COI. Чтобы подтвердить, что наблюдаемый фенотип, снижение эффективности трансляции COII, специфичен для нокаута гена *PTCD2*, мы восстановили уровень белка в клетках *PTCD2*-нокаутной линии (рисунок 9Г). Полученные данные свидетельствуют о том, что наблюдаемые дефекты синтеза белка в митохондриях связаны именно с отсутствием *PTCD2*.

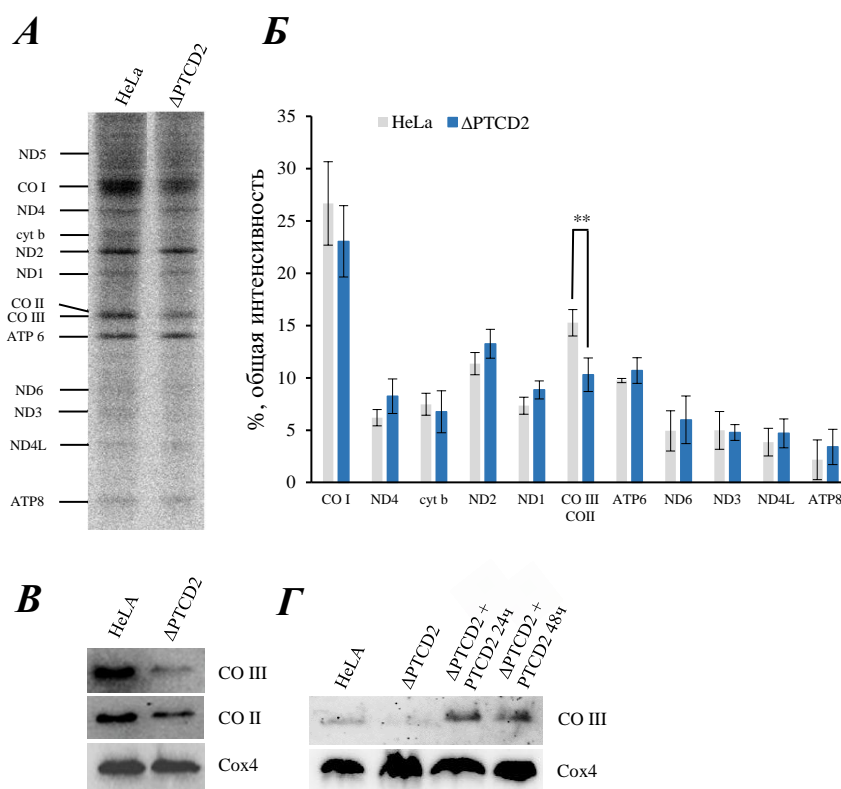


Рисунок 9. Анализ митохондриальной трансляции *in vivo* и количества субъединиц IV комплекса ЭТЦ. Образцы, полученные из клеток дикого типа, обозначены «HeLa», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2». Представлены результаты типичных экспериментов. **А)** Радиоавтограф продуктов митохондриальной трансляции. **Б)** Гистограмма, отражающая средние значения эффективности трансляции для каждого митохондриально кодируемого белка. 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). **В)** Иммуноблоттинг клеточных лизатов с антителами, специфичными к COII, COIII и Cox4. **Г)** Иммуноблоттинг клеточных лизатов с антителами, специфичными к COIII и Cox4. Образцы, полученные из клеток нокаутной линии с восстановленной экспрессией *PTCD2* через 24 и 48 часов после трансфекции – «ΔPTCD2 + PTCD2 24ч» и «ΔPTCD2 + PTCD2 48ч», соответственно. Визуализацию проводили методом хемилюминесценции.

Снижение количества ключевых каталитических субъединиц, COII и COIII, закономерно привело к нарушению работы IV комплекса (рисунок 10Б), 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 (рисунок 10А). 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.

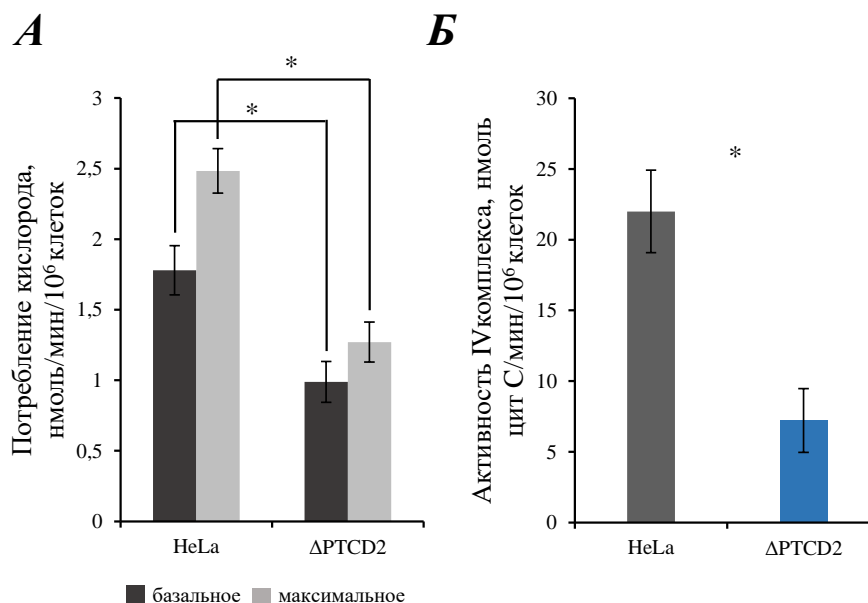


Рисунок 10. Анализ митохондриальных функций. Образцы, полученные из клеток дикого типа, обозначены «HeLa», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2». Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от среднего ($M \pm SD$). * $p < 0.05$ (непарный t-тест Стьюдента) **А)** Оценка митохондриального дыхания. Высота столбцов гистограммы соответствует средней скорости потребления кислорода, рассчитанной по результатам шести независимых экспериментов. Выражено в нМ/10⁶ клеток/мин. **Б)** 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.

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 также в результате нарушения его сборки и функций (рисунок 11 А, Б).

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.

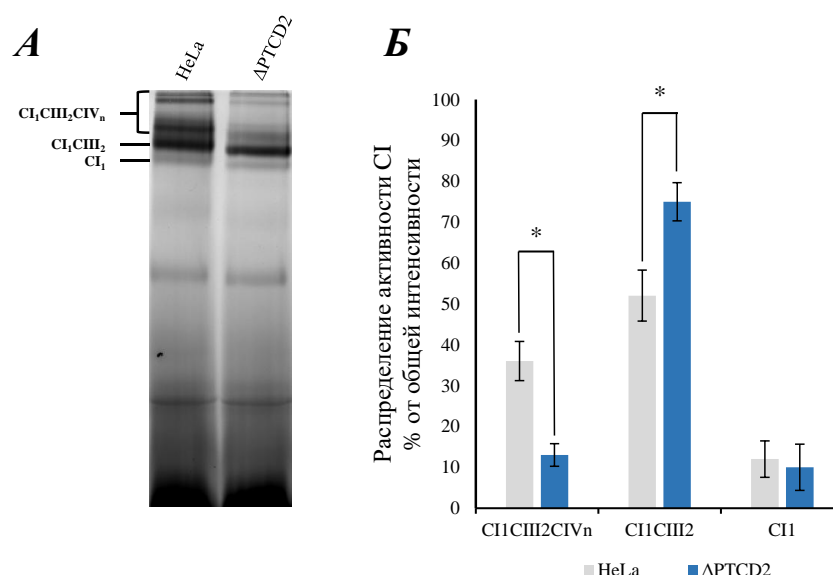


Рисунок 11. Анализ активности НАДН-дегидрогеназы. Образец, полученный из клеток дикого типа, обозначен «HeLa», из клеток нокаутной линии – «ΔPTCD2». **А)** Качественная реакция на активность НАДН-дегидрогеназы в геле после нативного электрофореза. Состав суперкомплексов указан слева. Представлен результат типичного эксперимента. **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).

Для выяснения механистических аспектов функционирования PTCD2 мы исследовали его взаимодействия с протеомом органелл и непосредственно митоторибосомами. Согласно результатам эксперимента по соосаждению PTCD2 с рибосомными субчастицами в градиенте плотности сахарозы, PTCD2 обнаруживается во фракциях, соответствующих исключительно ассоциированным 55S рибосомам (рисунок 12А), что подтвердилось и в эксперименте по ко-иммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией (рисунок 12Б).

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 (рисунок 9А), что скорее поддерживает гипотезу о действии PTCD2 на поздних этапах инициации.

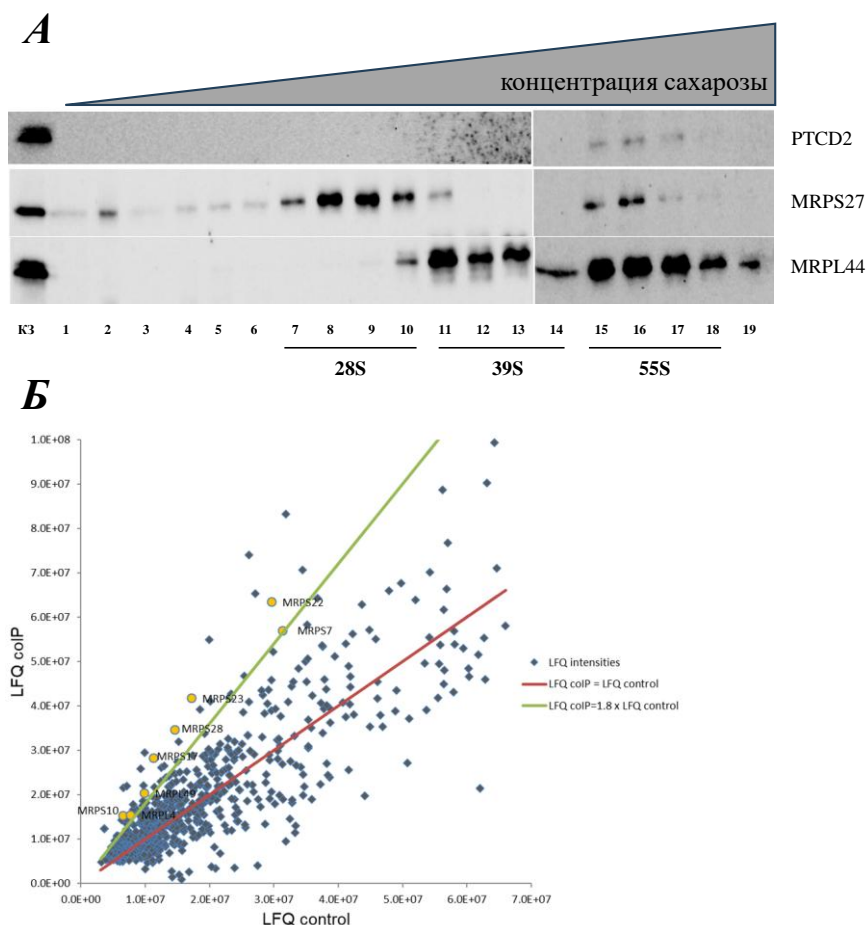


Рисунок 12. А) Анализ профиля миторибосом в клетках дикого типа HeLa. Иммуноблоттинг фракций линейного градиента сахарозы с антителами, специфичными к MRPS27, MRPL44 и SLIRP (указаны справа). Нумерация фракций приведена снизу. Контроль загрузки (КЗ) соответствует нанесенному 0,1% от общего объема лизата. Малая субъединица миторибосомы обозначена – 28S; большая субъединица – 39S; ассоциированная миторибосома – 55S. Представлен результат типичного эксперимента. Визуализацию проводили методом хемилюминесценции. **Б)** Результаты масс-спектрометрического анализа белков, ко-иммунопреципитировавших с PTCD2. По вертикальной оси расположены значения интенсивности 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.

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. На заключительном этапе исследований для выявления молекулярных механизмов обнаруженных нарушений были использованы 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 мРНК Cox1, ZMYND17 человека не способен к аналогичной избирательной регуляции синтеза этой субъединицы. Однако наши 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 исследуемого белка на эффективность трансляции мРНК СОIII. 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" взаимодействий и 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 терапии, направленной на коррекцию специфических дефектов биосинтеза белка в митохондриях человека.

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 СОIII, 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.

Ломоносова по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология:

- 1) Балева М.В., **Пиунова У.Е.**, Чичерин И.В., Красавина Д.Г., Левицкий С.А., Каменский П.А. Трансляционный активатор Mss51p дрожжей и белок ZMYND17 человека – общность происхождения, различие функций // Биохимия. — 2021. — Т. 86, № 9. — С. 1380–1392. EDN: SYKOLK. Импакт-фактор 2,2 (JIF). Доля участия 60%. 0,688 п.л.
[Baleva M.V., **Piunova U.E.**, Chicherin I.V., Krasavina D.G., Levitskii S.A., Kamenski P.A. Yeast Translational Activator Mss51p and Human ZMYND17 – Two Proteins with a Common Origin, but Different Functions // Biochemistry (Moscow). — 2021. — Vol. 86, № 9. — P. 1151–1161. EDN: CVGLHJ. Импакт-фактор 2,2 (JIF). Доля участия 60%. 0,688 п.л.]
- 2) Baleva M.V., Chicherin I., **Piunova U.**, Zgoda V., Patrushev M.V., Levitskii S., Kamenski P. Pentatricopeptide Protein PTCD2 Regulates COIII Translation in Mitochondria of the HeLa Cell Line // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — Vol. 23, № 22. — P. 14241. EDN: DIFJVM. Импакт-фактор 4,9 (JIF). Доля участия 40%. 0,75 п.л.
- 3) Балева М.В., **Пиунова У.Е.**, Чичерин И.В., Левицкий С.А., Каменский П.А. Разнообразие и эволюция трансляционных аппаратов митохондрий // Биохимия. — 2023. — Т. 88, № 11. — P. 2221–2234. EDN: MPXROI. Импакт-фактор 2,2 (JIF). Доля участия 70%. 0,875 п.л.
[Baleva M.V., **Piunova U.E.**, Chicherin I.V., Levitskii S.A., Kamenski P.A. Diversity and Evolution of Mitochondrial Translation Apparatus // Biochemistry (Moscow). — 2023. — Vol. 88, № 11. — P. 1832–1843. EDN: FGZOHL. Импакт-фактор 2,2 (JIF). Доля участия 70%. 0,875 п.л.]
- 4) Baleva M.V., **Piunova U.**, Chicherin I., Vasilev R., Levitskii S., Kamenski P. Mitochondrial Protein SLIRP Affects Biosynthesis of Cytochrome c Oxidase Subunits in HEK293T Cells // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 25, № 1. — P. 93. EDN: AUOGCQ. Импакт-фактор 4,9 (JIF). Доля участия 50%. 0,75 п.л.