

УДК 577.152.191

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ УТРАТЫ СУБЪЕДИНИЦЫ 8А ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДАЗЫ

© 2021 Д. Ротко^{1,2}, А.П. Кудин¹, Г. Цурска^{1,3},
Б. Кулавяк², А. Шевчык², В.С. Кунц^{1,3*}

¹ *Institute of Experimental Epileptology and Cognition Research, Life & Brain Center, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; E-mail: wolfram.kunz@ukbonn.de*

² *Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 02-093 Warsaw, Poland*

³ *Department of Epileptology, University Bonn Medical Center, 53127 Bonn, Germany*

Поступила в редакцию 02.11.2020

После доработки 23.11.2020

Принята к публикации 23.11.2020

В настоящей работе нами был на молекулярном уровне изучен эффект отсутствия наименьшей, кодируемой ядерным геномом субъединицы COX8A цитохром *c*-оксидазы (COX) в фибробластах пациентов с гомозиготной мутацией сайта сплайсинга и в клетках НЕК293Т, чей геном был отредактирован с помощью метода CRISPR/Cas9. В обеих клеточных модельных системах было обнаружено 20–30% остаточной ферментативной активности COX. В иммуноблотах белковых комплексов митохондрий, выделенных из обеих клеточных моделей, разделенных с помощью метода нативного электрофореза, почти полностью отсутствовали мономеры или димеры нативной формы COX. Интересно, что суперкомплексы COX, образованные с участием комплекса III, а также с комплексами I и III, сохраняли значительную иммунореактивность, в то время как почти никакой иммунореактивности, приписываемой подструктурам, найдено не было. Это означает, что COX, у которой отсутствует субъединица 8A, стабилизируется в составе суперкомплексов, в то время как её мономеры и димеры подвергаются быстрой деградации. При проведении в исследуемых клеточных моделях дефицита субъединицы COX8A транскриптомного анализа с помощью метода секвенирования 3'RNA нам не удалось обнаружить изменения уровня транскрипции генов, участвующих в процессе накопления развернутых белков в матриксе митохондрий, а также в интегрированном ответе на стресс. Таким образом, наши данные убедительно свидетельствуют о том, что для поддержания структурной стабильности мономеров и димеров COX необходима наименьшая субъединица цитохром *c*-оксидазы – COX8A.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *c*-оксидаза, субъединица 8A, суперкомплексы дыхательной цепи.

DOI: 10.31857/S0320972521010048

ВВЕДЕНИЕ

Окислительное фосфорилирование (OXPHOS, oxidative phosphorylation) в клетках млекопитающих является метаболическим путем, в котором участвуют пять белковых комплексов, расположенных во внутренней митохондриальной мембране (IMM, inner mitochondrial membrane). Поток электронов от NADH или сукцината на молекулу кислорода протекает через серию окислительно-восстановительных реакций, катализиру-

Принятые сокращения: BN-PAGE – нативный электрофорез в полиакриламидном геле; COX – цитохром *c*-оксидаза; IMM – внутренняя митохондриальная мембрана; ISR – интегрированный ответ на стресс; mtDNA – митохондриальная DNA; MTS – последовательность митохондриального таргетирования; mtUPR – митохондриальный развернутый белковый ответ; OXPHOS – окислительное фосфорилирование; RC – дыхательная цепь; 3'RNA-Seq – секвенирование 3'RNA; SC – суперкомплекс дыхательной цепи.

* Адресат для корреспонденции.

емых белковыми комплексами I–IV дыхательной цепи (RC – respiratory chain). Падение окислительно-восстановительного потенциала комплексов I, III и IV облегчает перенос протонов через IMM, а генерируемый трансмембранный протонный градиент используется комплексом V для хемиосмотической продукции АТФ. Если в ранней модели «жидкой» мембраны предполагалось, что комплексы дыхательной цепи случайным образом диффундируют в IMM в виде отдельных образований [1], то в недавних работах было показано, что комплексы RC могут также находиться в виде определенных супрамолекулярных ансамблей [2, 3]. Была определена различная стехиометрия таких белковых суперкомплексов (SC, supercomplex) дыхательной цепи: димер комплекса III, взаимодействующий с одним или двумя комплексами IV ($III_2 + IV$ или $III_2 + IV_2$); комплекс I в ассоциации с димером комплекса III ($I + III_2$) и респирасомы, состоящие из комплекса I, димера комплекса III и раз-

личного числа копий комплекса IV ($I + III_2 + IV_n$) [4, 5]. Однако потенциальное преимущество суперкомплекса в плане катализа благодаря субстратным каналам [6] было оспорено [7], и было предположено, что структура респирасом может способствовать стабилизации отдельных комплексов дыхательной цепи [8–10], чтобы избежать нежелательных белок-белковых взаимодействий в насыщенной белками IMM [11] и снизить образование активных форм кислорода [12].

Цитохром *c*-оксидаза является терминальным акцептором электронов RC, катализирующим восстановление молекулярного кислорода до воды, которое связано с перекачкой протонов в межмембранное пространство (IMS). В клетках млекопитающих мультибелковый комплекс COX состоит из 14 субъединиц [13]. Каталитический центр COX образуется пронизывающими IMM субъединицами COX1, COX2 и COX3. Эти высокогидрофобные белки кодируются митохондриальной DNA (mtDNA), в то время как другие 11 субъединиц COX (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C, COX8A и NDUFA4) кодируются ядерным геномом. Кодируемые ядерным геномом субъединицы COX участвуют в сборке этого фермента, стабилизации структуры и в его взаимодействии с белковыми партнерами в SC дыхательной цепи, а также в процессе регуляции активности цитохром *c*-оксидазы с участием АТФ и тиреоидных гормонов [14].

Белок COX8A является самой маленькой субъединицей COX, кодируемой ядерным геномом. В клетках человека этот белок заменен на белок COX8B (COXVIII), который обычно экспрессируется в большинстве клад приматов, повсеместная экспрессия COX8A считается адаптивным эволюционным изменением в механизме антропоидной RC для оптимизации аэробного энергетического метаболизма [15]. Однако молекулярная роль субъединицы COX8A в функционировании COX до сих пор не выяснена. Была одна публикация, посвященная исследованию случая дефицита субъединицы COX8A у больного с синдромом Лея [16], при котором наблюдалась недостаточность функционирования COX. В этом исследовании мы изучили функциональное влияние потери COX8A на биогенез COX как индивидуального белкового комплекса электротранспортной цепи и как компонента SC дыхательной цепи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Эксперименты были проведены на фибробластах кожи человека, получен-

ных от пациента с гомозиготной сплайсинговой мутацией по COX8A (клинические и генетические данные см. в работе Hallmann et al. [16]), и на соответствующих по возрасту контрольных фибробластах и клетках почек эмбрионов человека HEK293T (любезно предоставлены проф. Майком Райном (Университет Монаша, Австралия) и доктором Давидом Страудом (в настоящее время, университет Мельбурна, Австралия)). Все клетки культивировали в увлажненной инкубационной среде, содержащей 5% CO₂, при 37 °C. Культуральная среда состояла из модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), дополненной 10% (v/v) фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ глутамина, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл уридина. Каждые три дня (по достижении 95% слияния) клетки пересевали.

Получение COX8A-дефицитных клеток с помощью конструкций CRISPR/Cas9. Редактирование генов клеток HEK293T проводили с помощью конструкций CRISPR/Cas9, несущих gRNA, нацеленную на экзон 1 гена COX8A. Для отбора последовательностей gRNA для конструкций CRISPR/Cas9 использовали алгоритм (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>) дизайнера gRNA Института Брода (Broad Institute). Олигонуклеотиды dsDNA, кодирующие gRNA, были клонированы в pSpCas9(BB)-2A-GFP («Addgene», США), как было описано ранее [17]. Клетки HEK293T были трансфицированы плазмидой, содержащей конструкцию CRISPR/Cas9 с использованием реагента для трансфекции GeneJuice («Sigma», США), в соответствии с инструкциями производителя. Через 24 ч после трансфекции определяли количество жизнеспособных клеток, их разводили и рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты для получения клонов отдельных клеток. После образования клональных колоний отдельные колонии собирали для проведения скрининга с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Препараты общей DNA получали с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit («Qiagen», Германия).

Выделение митохондрий. Выделение митохондрий проводили, как описано ранее [18]. Вкратце, клетки собирали и осаждали при 800 g. Осадок клеток ресуспендировали в ледяном растворе А (250 мМ сахароза, 5 мМ HEPES, pH 7,2) и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Полученный гомогенат центрифугировали при 780 g в течение 10 мин при 4 °C. Супернатанты объединяли и центрифугировали в ледяном растворе А при 9200 g в течение 10 мин при 4 °C. Осадок промывали, ресуспендировали в

ледяном растворе А и центрифугировали при 9200 g в течение 10 мин при 4 °С. Осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в ледяном растворе В (150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,2) и хранили во льду.

Электрофоретическое разделение белков и иммунодетекция. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США). Для проведения голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis) аликвоты суспензии митохондрий солибилизировали раствором, содержащим дигитонин (10% (v/v) глицерин, 1% (v/v) дигитонин, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1 mM ЭДТА, 1 mM фенолметилсульфонилфлюорид, pH 7,4). Образцы оставляли во льду в течение 15 мин. Солиблизированные митохондрии центрифугировали в течение 10 мин при 9200 g и 4 °С и затем собирали супернатант. Раствор красителя (1,5 M аминокaproевая кислота, 50 mM Bis-Tris-HCl, 5% Ку-масси бриллиантовый голубой, pH 7,0) добавляли в супернатант до конечной концентрации 1/3 от общего объема пробы. Образцы, содержащие белки митохондриальных белковых комплексов, наносили на голубой нативный градиентный (4–10%) PAAG (100 мкг белка на дорожку), и проводили разделение митохондриальных белковых комплексов методом электрофореза при 4 °С.

В случае электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) аликвоты митохондриального препарата солибилизировали в 4x буфере для образцов Лэммли («Bio-Rad», США), содержащем 1% β-меркаптоэтанол, при 60 °С в течение 15 мин. Образцы наносили вместе с предварительно окрашенным набором белков-маркеров PageRuler ladder («Thermo Scientific», США) на 12,5% SDS-PAGE и разделяли методом электрофореза.

После разделения в BN-PAGE или SDS-PAGE белки из гелей переносили на поливинилиденфторидные мембраны (PVDF – polyvinylidene fluoride) с помощью электроблоттинга. Эти мембраны обрабатывали первичными антителами против конкретных белков: COX1 («Invitrogen», США, 1D6E1A8), COX2 («Invitrogen», США, 12C4F12), COX4 («Cell Signaling», США, 4844S), NDUFA9 («Abcam», Великобритания, ab14713), SDHA («Abcam», Великобритания, ab137040), CORE2 («Abcam», Великобритания, ab14745), субъединицы с АТФ-синтазы («Abcam», Великобритания, ab181243), HSP75 («Abcam», Великобритания, ab182775). Обнаружение первичных антител на мембране проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с перок-

сидазой хрена, а именно с овечьими анти-мышинными антителами («GE Healthcare», США, NA931V). Визуализацию белкового сигнала проводили с использованием ECL Prime («GE Healthcare», США), в соответствии с инструкциями производителя.

Выделение RNA. Общую РНК выделяли из фибробластов и клеток HEK293T фенол-хлороформной экстракцией с последующей очисткой на кремнеземно-мембранных колонках, используя RNeasy Mini Kit («Qiagen», США). Сначала клетки лизировали с использованием реагента TRIzol («Invitrogen», США), и лизат гомогенизировали с помощью QIAshredder («Qiagen», США). Диссоциацию нуклеопротеиновых комплексов проводили в результате инкубации лизата в течение 5 мин. Разделение фаз проводили с использованием хлороформа и последующим центрифугированием в течение 15 мин при 12 000 g при 4 °С. Собирали водную фазу и осаждали RNA 70%-ным этанолом. Препараты, содержащее RNA, затем наносили на колонки RNeasy Mini Kit spin columns («Qiagen», США) и проводили выделение RNA, в соответствии с инструкциями производителя. Количество RNA и её чистоту в конечном растворе определяли спектрофотометрически с помощью Nanodrop 2000 («Thermo Scientific», США).

Секвенирование 3'RNA (3'RNA-Seq). Для определения уровня экспрессии митохондриальных белков, кодируемых митохондриальным и ядерным геномом, проводили 3'RNA-секвенирование выделенной общей RNA. Число целостности RNA (RNA integrity number) препарата общей RNA контролировалось с помощью Agilent TapeStation («Agilent Technologies», США), и это значение превышало 7 во всех образцах. На основе препарата общей RNA с помощью набора QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit («Illumina», США) была приготовлена библиотека комплементарных DNA (cDNA, elementary DNA). В результате эта библиотека cDNA была обогащена последовательностями, находящимися в непосредственной близости к 3'-концу транскрибированной полиаденилированной RNA. Секвенирование проводили на платформе для секвенирования HiSeq 2500 («Illumina», США) в режиме высокого выхода.

Обработка данных секвенирования RNA. Выходные файлы секвенирования FASTQ были сопоставлены с геномной сборкой Homo sapiens GRCh38 (hg38), полученной от Genome Reference Consortium с использованием файла аннотаций генов UCSC. Была использована программа «RNA STAR aligner» в режиме двух операций в соответствии с инструкциями по применению программы. Сопоставленные счи-

тивания были количественно оценены с помощью алгоритма подсчета признаков (featureCounts). Нормализацию результатов рядов и статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного пакета «R/Bioconductor DESeq2» на платформе Galaxy.

Определение ферментативной активности. Спектрофотометрическое определение активности комплекса IV и цитратсинтазы проводили с помощью стандартных методов, которые были описаны ранее [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активность COX в фибробластах и COX8A-дефицитных клетках НЕК293Т. Было проведено определение активности COX в препаратах митохондрий фибробластов и клеток НЕК293Т с дефицитом COX8A и в соответствующих контролях (таблица). Чтобы провести определение активности COX независимо от содержания митохондрий, активность фермента рассчитывали относительно активности цитратсинтазы (CS, citrate synthase) [19]. Во всех линиях клеток с дефицитом COX8A ферментативная активность комплекса IV была снижена, однако остаточная активность COX все же сохранялась. Соотношение активности COX/CS в фибробластах с дефицитом COX8A было снижено в 5 раз. В каждом из клонов клеток НЕК293Т (#13 и #14) с различными делециями последовательности митохондриального таргетинга (MTS – mitochondrial targeting sequence, рис. 1 в Приложении) соотношение активности COX и CS было снижено примерно в 3 раза. Подробные результаты секвенирования по Сэнгеру двух изученных в работе клонов клеток, отредактированных по COX8A, приведены на рис. 1а в Приложении.

Комплексы дыхательной цепи в линиях клеток, дефицитных по COX8A. Белковые комплексы митохондрий, выделенных из фибробластов и клеток НЕК293Т, были разделены с использованием метода BN-PAGE и затем были обрабо-

таны антителами против субъединиц NDUFA9, CORE2, COX4 комплексов I, III и IV дыхательной цепи. Для солиubilизации мембранных белков использовали неионный мягкий детергент дигитонин, который сохраняет исходную стехиометрию SC дыхательной цепи.

В контрольных фибробластах субъединица COX4 обнаруживалась в четырех отдельных полностью собранных комплексах COX (рис. 1). Большинство этого белка было в равной мере распределено между мономером COX и респирасомами, в то время как также присутствовало меньшее количество белка в димерной форме и в SC, содержащем CIII₂ + CIV. В фибробластах пациента остаточная активность COX была в основном обнаружена в респирасомах, и эта активность не была выявлена ни в мономере COX, ни в её димерной форме. Меньшее количество цитохром *c*-оксидазы также было выявлено в белковом комплексе с молекулярной массой >669 кДа. Интересно, что в COX8A-дефицитных фибробластах наблюдалось повышение количества комплексов дыхательной цепи I и III, содержащих субъединицы NDUFA9 и CORE2.

В клетках НЕК293Т дикого типа сигнал COX4 был распределен между четырьмя полностью сформированными белковыми комплексами, такими как мономеры COX, димеры COX, CIII₂ + CIV и респирасомы (рис. 2). Однако стехиометрия отличалась от таковой, выявленной в фибробластах, поскольку наибольшее количество COX было включено в респирасомы, а мономер COX был наименее распространенной формой. В COX8A-дефицитном клоне #13 клеток НЕК293Т с более короткой делецией в области MTS COX8A наибольшее количество COX находилось в составе респирасом. Однако значительная часть COX также содержалась внутри SC CIII₂ + CIV и в меньшей мере – в димерах COX. При этом практически не наблюдалась мономерная форма COX. Количество белковых комплексов, содержащих COX в COX8A-дефицитном клоне #14 клеток НЕК293Т, было значительно меньше, чем в клетках дикого типа или в клетках клона #13. Большинство остаточ-

Активность ферментов COX8A-дефицитных линий клеток

Ферментативная активность (мЕ/мг белка)	Контрольные фибробласты	Мутантные по COX8A фибробласты	НЕК293Т дикого типа	НЕК293Т COX8A-дефицитный клон #13	НЕК293Т COX8A-дефицитный клон #14
Цитратсинтаза	61 ± 2	80 ± 5	167 ± 11	189 ± 5	173 ± 6
Цитохром <i>c</i> -оксидаза	81 ± 8	21 ± 2	84 ± 4	32 ± 1	27 ± 4
Комплекс IV/цитратсинтаза	1,32	0,27	0,51	0,17	0,16

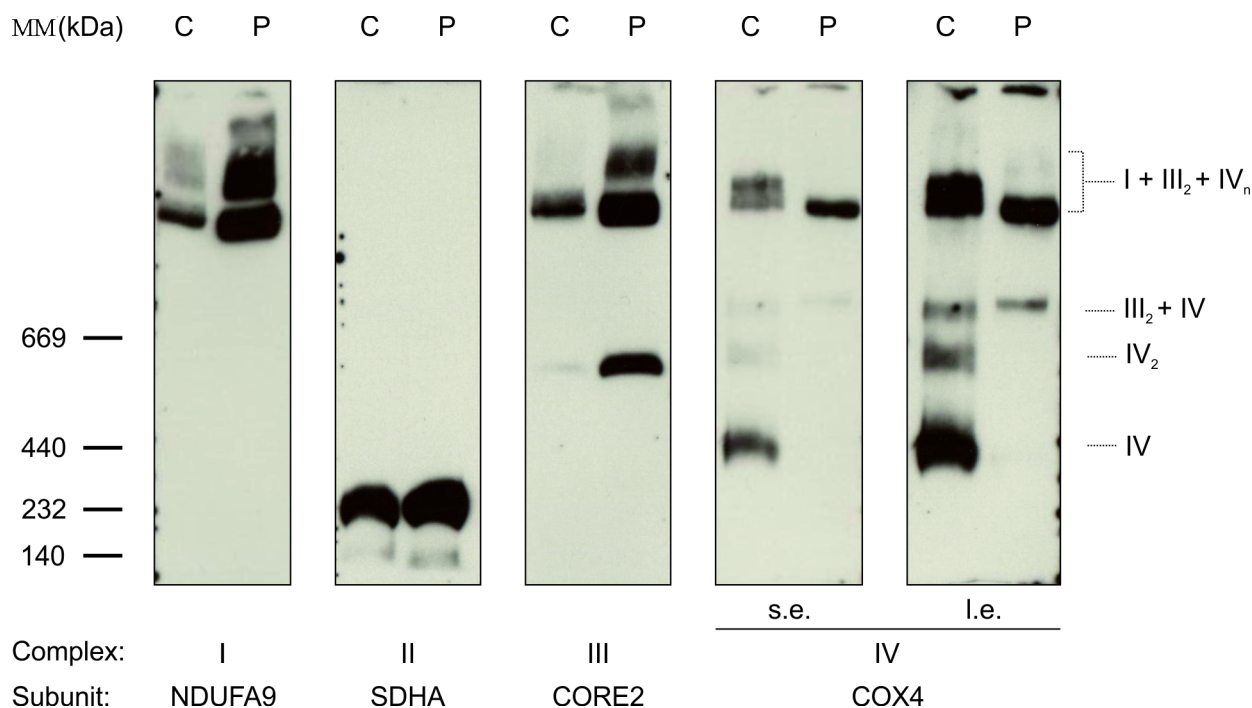


Рис. 1. Стабилизация COX в составе суперкомплексов в COX8A-дефицитных фибробластах. BN-PAGE с последующим иммуноокрашиванием, 1% дигитонин. Препараты митохондрий из контрольных фибробластов (C) и фибробластов пациента с дефицитом COX8A (P), 100 мкг белка на дорожку. s.e. и l.e. – короткая (short) и долгая (long) экспозиции. Справа – белковые комплексы, содержащие COX: IV – мономер COX, IV₂ – димер COX, III₂ + IV – SC, содержащий COX и димер комплекса III, I + III₂ + IV_n – респирасомы

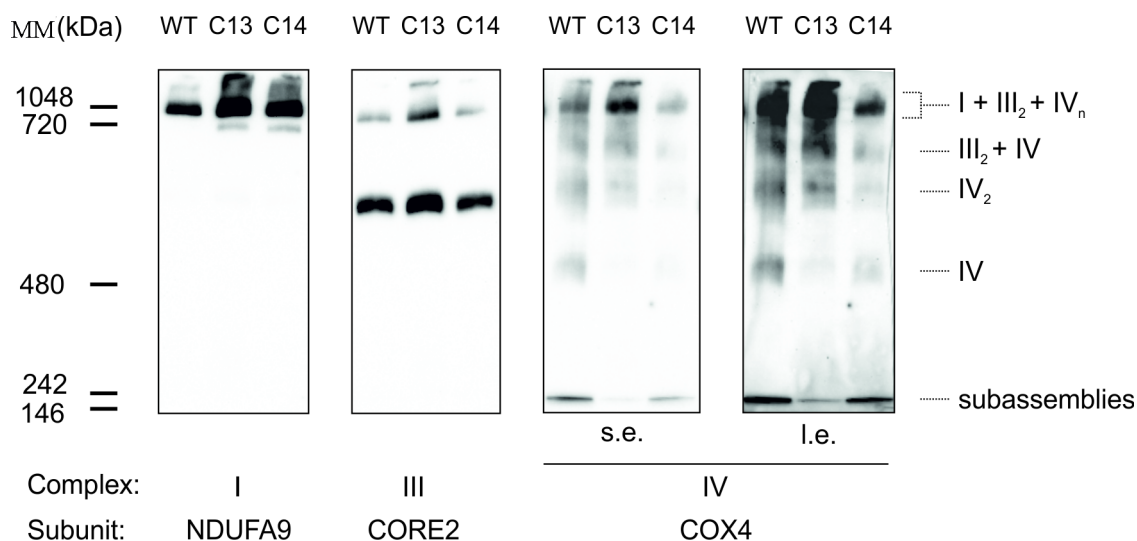


Рис. 2. Структура дыхательной цепи в индуцированных CRISPR/Cas9 COX8A-дефицитных клетках HEK293T. BN-PAGE с последующим иммуноокрашиванием, 1% дигитонин. Препараты митохондрий клеток HEK293T дикого типа (clone #13, C13) и дефицитных по COX8A (clone #14, C14), 100 мкг белка на дорожку. s.e. и l.e. – короткая и долгая экспозиция. Справа – COX-содержащие белковые комплексы: IV – мономер COX, IV₂ – димер COX, III₂ + IV – SC, содержащий COX и димер комплекса III, I + III₂ + IV_n – респирасомы

ных белков COX обнаруживались внутри респирасом, в то время как в SC CIII₂ + CIV или в мономерных и димерных формах COX были обнаружены только их следовые количества.

Стационарные уровни белков. Стационарные уровни белков отдельных субъединиц дыхательной цепи были определены с помощью метода SDS-PAGE и последующего окрашивания бел-

ков с использованием антител. В соответствии с наблюдаемым снижением уровня белковых комплексов COX в COX8A-дефицитных фибробластах больного, количество белковых субъединиц COX1, COX2, COX4 и COX5A в различной степени тоже было снижено (рис. 3, *a*). В частности, сигналы белков COX 1 и COX5A были едва различимы, в то время как субъединица COX4 была наименее подавленной. Экспрессия других субъединиц других комплексов дыхательной цепи не была нарушена. Также наблюдалось повышение количества CORE2, соответствующее повышению количества белка комплекса III, выявленное при проведении BN-PAGE.

В линиях клеток HEK293T с меньшей (клон #13) или большей (клон #14) делецией в MTS гена COX8A уровни белка COX были также значительно снижены (рис. 3, *b*). Как и в случае с фибробластами, наибольшее снижение уровня белка наблюдалось в случае субъединиц COX1 и COX5A, в то время уровень субъединицы COX4 был снижен незначительно. Следует отметить, что снижение количества субъединиц COX было более выражено в клетках клона #14 с большей делецией в MTS COX8A. Однако не было обнаружено повышения уровня белка в случае субъединиц других комплексов RC.

Транскриптомный анализ на основе метода 3'RNA-секвенирования (3'RNA-Seq). Чтобы выяснить, являются ли изменения уровня белков RC результатом регуляции на уровне тран-

скрипции, с использованием метода 3'RNA-секвенирования было изучено влияние дефицита COX8A на экспрессию генов, кодирующих белки OXPHOS. Анализ транскриптома фибробластов, дефицитных по COX8A, выявил несколько дифференциально экспрессируемых генов белков RC (рис. 4). В частности, наблюдалось небольшое снижение уровня транскрипции кодируемой mtDNA субъединицы COX3 и субъединиц A6L и A ATP-синтазы ($\log_2(\text{FC})$: $-0,91$, $-0,87$; p -value: $0,03$, $0,01$ соответственно). В то же время незначительно повышался уровень экспрессии кодируемых ядерным геномом субъединиц COX7A1 и COX7B и количество транскриптов, кодирующих субъединицу 6 комплекса цитохром *b-c1*, а также субъединицы C3 и DAPIТ комплекса V ($\log_2(\text{FC})$: $1,16$, $0,86$, $0,73$, $0,68$, $0,74$; p -value: $6 \cdot 10^{-5}$, $0,02$, $0,04$, $0,03$, $0,04$ соответственно).

Анализ изменений уровня транскрипции в COX8A-дефицитном клоне #14 клеток HEK293T выявил несколько генов, кодирующих субъединицы комплексов дыхательной цепи, которые были дифференцированно экспрессированы (рис. 5). В частности, была повышена экспрессия всех генов mtДНК, кодирующих RC-белки, кроме одного: субъединиц ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L комплекса I ($\log_2(\text{FC})$: $0,45$; $0,47$; $0,63$; $0,42$; $0,61$; p -value: $2 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-6}$, $0,01$, $4 \cdot 10^{-5}$ соответственно), цитохрома *b* комплекса III ($\log_2(\text{FC})$: $1,4$; p -value: $1 \cdot 10^{-21}$ соответственно), субъединиц A и A6L комплек-

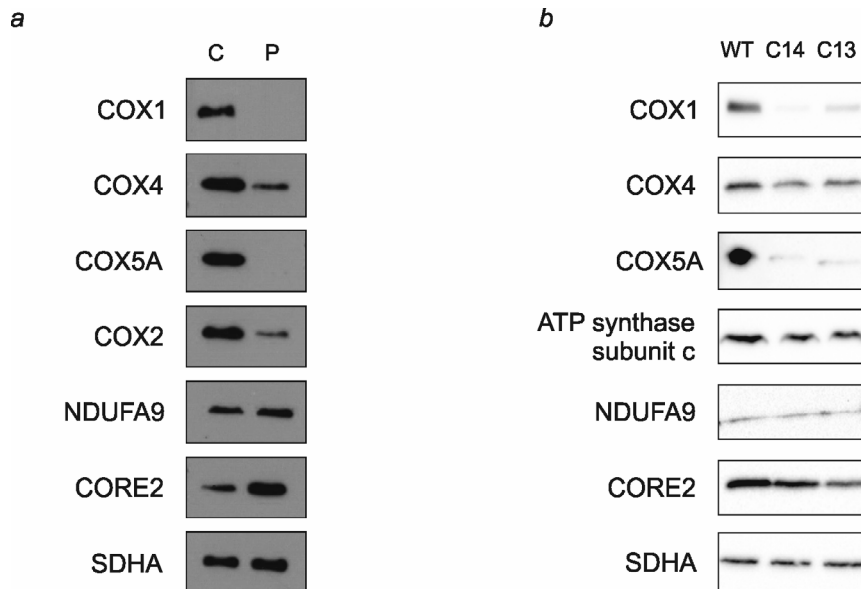


Рис. 3. Стационарные уровни отобранных субъединиц комплексов дыхательной цепи в COX8A-дефицитных клетках. SDS-PAGE и последующее окрашивание с использованием антител: *a* – препарат митохондрий контрольных фибробластов (C) и фибробластов больного с дефицитом COX8A (P), 50 мкг белка на дорожку. *b* – Препарат митохондрий из клеток HEK293T дикого типа и клеток HEK293T, дефицитных по COX8A – клон #14 (C14) и клон #13 (C13), 50 мкг белка на дорожку

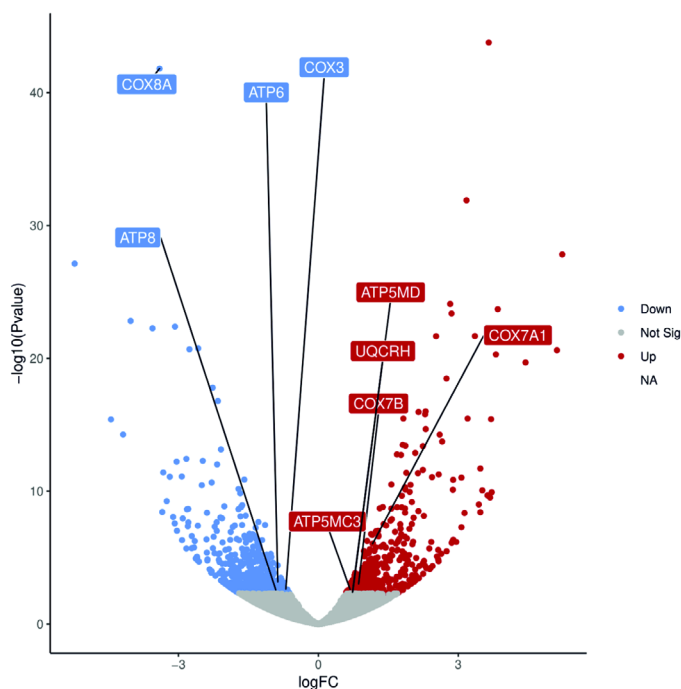


Рис. 4. Дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие комплексы OXPHOS в COX8A-дефицитных фибробластах. Вулканический график экспрессии генов в фибробластах пациента с дефицитом COX8A в сравнении с контрольными фибробластами. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Выявленные дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие субъединицы комплекса RC, показаны прямоугольниками. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены \log_{10} (значения P). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия ($p > 0,05$), красным показаны гены с повышенной экспрессией ($p < 0,05$), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией ($p < 0,05$)

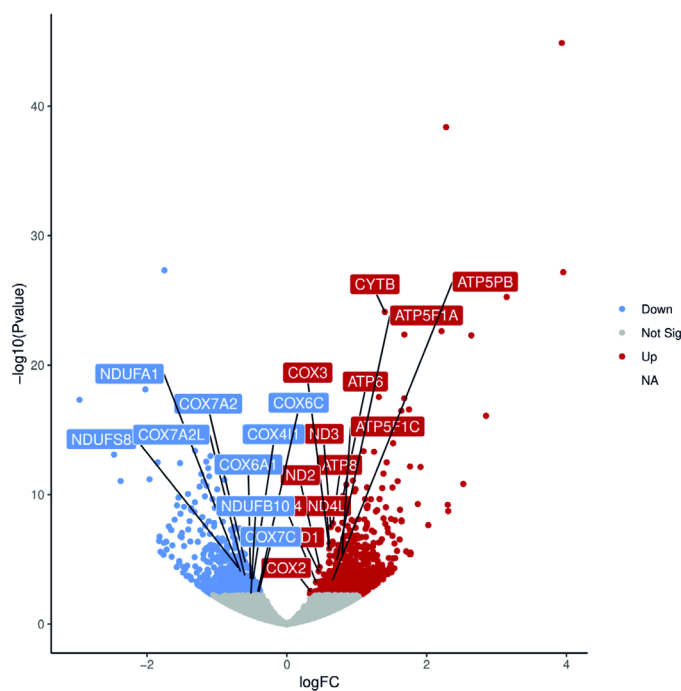


Рис. 5. Дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие комплексы OXPHOS в клетках НЕК293Т COX8A-дефицитного клона #14. Вулканический график экспрессии генов в COX8A-дефицитном клоне #14 клеток НЕК293Т в сравнении с клетками НЕК293Т дикого типа. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Выявлены дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие субъединицы комплексов RC, показаны прямоугольниками. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены \log_{10} (значения P). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия ($p > 0,05$), красным показаны гены с повышенной экспрессией ($p < 0,05$), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией ($p < 0,05$)

са V ($\log_2(\text{FC})$: 0,8, 0,65; p -value: $3 \cdot 10^{-8}$, $2 \cdot 10^{-6}$ соответственно), а также COX2 и COX3 комплекса IV ($\log_2(\text{FC})$: 0,34, 0,61; p -value: 0,03, $9 \cdot 10^{-5}$ соответственно). Экспрессия кодируемых ядерным геномом субъединиц A, B1 и γ -комплекса V была также повышена ($\log_2(\text{FC})$: 0,72, 0,66, 0,79; p -value: $4 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$ соответственно). Однако количество транскриптов кодируемых ядерным геномом субъединиц COX4I1, COX6A1, COX6C, COX7A2, COX7A2L, COX7C ($\log_2(\text{FC})$: -0,48, -0,52, -0,41, -0,6, -0,6, -0,4; p -value: $6 \cdot 10^{-3}$, $6 \cdot 10^{-3}$, 0,03, $6 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-3}$, 0,03 соответственно) и субъединиц NDUFA1, NDUFS8, NDUFB10 комплекса I было понижено ($\log_2(\text{FC})$: -0,67, -0,7, -0,51; p -value: $2 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, 0,04 соответственно).

Накопление собранных неправильным образом промежуточных структур комплекса OXPHOS может индуцировать в митохондриях протеотоксичный стресс и последующую активацию путей передачи сигнала о стрессе от митохондрий в ядро [20]. Чтобы выяснить, приводит ли недостаточность субъединицы COX8A к запуску митохондриальных ретроградных сигнальных путей, экспрессии ключевых регуляторов транскрипции и их нижестоящих мишеней митохондриального развернутого белкового ответа (mtUPR, mitochondrial unfolded protein response) и интегрированного ответа на стресс (ISR – integrated stress response) оценивали с помощью 3'RNA-seq. Активация mtUPR включает в себя повышенную регуляцию экспрессии митохондриальных протеаз контроля качества, таких как ClpP, ClpX, Lonp1, paraplegin и YME1L [21]. Кроме того, при mtUPR происходит индукция экспрессии митохондриальных шаперонов, таких как Hsp70 и Hsp60, приводящая к повышению вероятности правильного свертывания белков [22]. Однако в профиле транскрипции фибробластов с недостаточностью COX8A и клоне #14 клеток НЕК293Т не наблюдалось усиления регуляции генов, кодирующих перечисленные выше митохондриальные протеазы (CLPP, CLPX, LONP1, SPG7 и YME1L соответственно) (рис. 6 и 7). Экспрессия генов *HSPA9* и *HSPD1*, кодирующих митохондриальные шапероны, в фибробластах пациента с дефицитом COX8A не изменялась (рис. 6), в то время как она увеличивалась в COX8A-дефицитном клоне #14 клеток НЕК293Т (рис. 7) ($\log_2(\text{FC})$: 0,92, 1,03; p -value: $4 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$ соответственно), в которых такое повышение экспрессии шаперонов может быть проявлением адаптации к повышению экспрессии генов *HSPA9* и *HSPD1*, кодируемых митохондриальной DNA субъединиц RC. Фактор транскрипции ATF5 считается ключевым регулятором специфично-

го для митохондрий UPR [23, 24]. Как и в случае генов, характерных mtUPR, не было обнаружено повышения экспрессии ATF5 в COX8A-дефицитных фибробластах и клоне #14 клеток НЕК293Т (рис. 6 и 7).

Интегрированная реакция на стресс – это еще одна форма митохондриального ретроградного сигнального пути стресс-ответа, который характеризуется снижением общего синтеза белка и активацией экспрессии определенных генов комплексного ответа на стресс [25]. Этот процесс может быть инициирован в результате фосфорилирования фактора транскрипции eIF2 α четырьмя протеинкиназами, чувствующими стресс эндоплазматического ретикулума (ER stress), mtUPR, нехватку аминокислот и гема [26]. Фосфорилированный фактор eIF2 α индуцирует экспрессию центральных регуляторов транскрипции и ISR – ATF4 и его каноническую мишень CHOP [25, 27, 28]. Однако с помощью метода секвенирования 3' RNA не было установлено повышение экспрессии ATF4 и CHOP в COX8A-дефицитных фибробластах и клоне #14 клеток НЕК293Т (рис. 6 и 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы изучали влияние потери субъединицы COX8A на биогенез цитохром *c*-оксидазы как индивидуального белкового комплекса электротранспортной цепи и как компонента SC дыхательной цепи. Для выяснения молекулярной и функциональной роли потери COX8A в фибробластах пациента с дефицитом COX8A и в клетках НЕК293Т с CRISPR/Cas9-индуцированным дефицитом COX8A мы провели измерения активности COX, BN-PAGE и SDS-PAGE с последующей иммунодетекцией отдельных субъединиц комплексов RC. Кроме того, с помощью метода секвенирования 3'RNA была проведена оценка изменений транскриптома в COX8A-дефицитных клетках.

Биогенез холофермента COX является высоко регулируемым процессом с постепенной сборкой кодируемых mtDNA и ядерной DNA субъединиц COX, которому способствуют ~30 факторов, кодируемых ядерным геномом [29]. Согласно текущей модульной модели сборки мономера COX, COX8A присоединяется к промежуточным формам собираемого комплекса COX только на поздней стадии в модуле субъединицы, содержащей COX2 [30]. Однако недавнее исследование предполагает существование альтернативных способов сборки COX в составе респирасом с возможностью прямого включе-

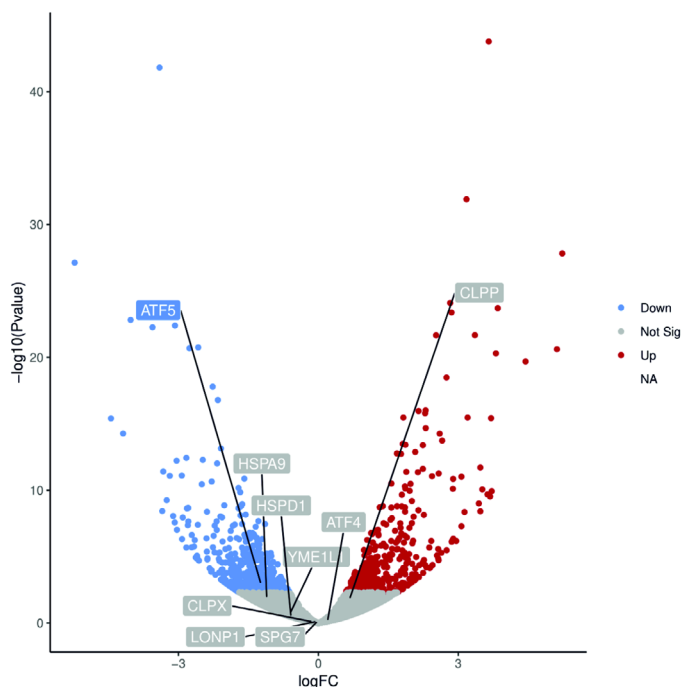


Рис. 6. Экспрессия генов, участвующих в ретроградных сигнальных путях митохондрий в COX8A-дефицитных фибробластах. Вулканический график экспрессии генов в фибробластах пациента с дефицитом COX8A в сравнении с контрольными фибробластами. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Названия отобранных генов показаны в прямоугольниках. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены значения \log_{10} (значения P). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия ($p > 0,05$), красным показаны гены с повышенной экспрессией ($p < 0,05$), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией ($p < 0,05$)

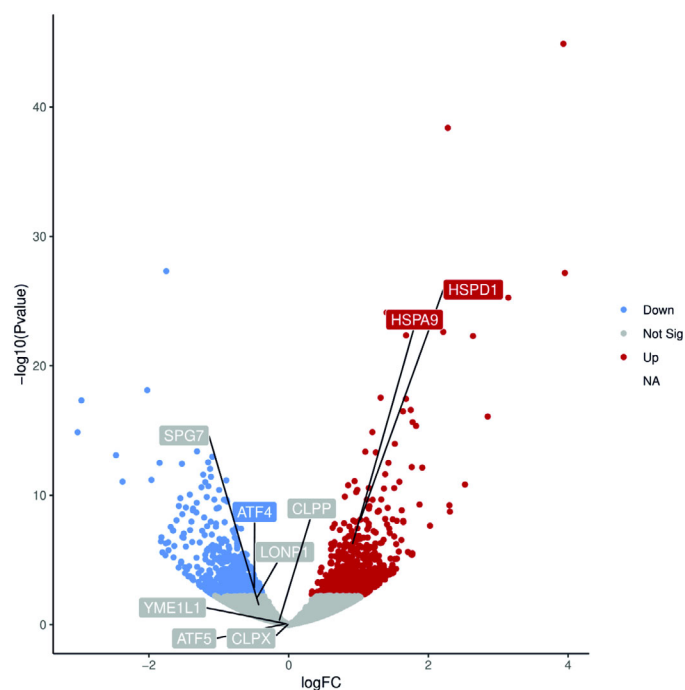


Рис. 7. Экспрессия генов, вовлеченных в митохондриальные ретроградные сигнальные пути COX8A-дефицитного клона #14 клеток НЕК293Т. Вулканический график экспрессии генов в клетках COX8A-дефицитного клона #14 НЕК293Т в сравнении с клетками НЕК293Т дикого типа. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Названия отобранных генов показаны в прямоугольниках. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены значения \log_{10} (значения P). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия ($p > 0,05$), красным показаны гены с повышенной экспрессией ($p < 0,05$), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией ($p < 0,05$)

ния субъединиц COX в неканонические модули неполной сборки [31]. В соответствии с нашими предыдущими данными [16], в фибробластах пациента с дефицитом COX8A вызванная нонсенс-мутацией деградация mRNA приводила к резкому снижению уровня транскрипта COX8A. В этих клетках наблюдалось выраженное снижение активности COX, приближающееся к ~20% от контрольных значений. В обоих клонах НЕК293Т (#13 и #14), содержащих делеции в MTS COX8A, остаточная активность COX составляла примерно 30% от контрольных значений, что указывает на то, что потеря COX8A оказывает пагубное воздействие на ферментативную активность COX. Однако наличие подающейся измерению остаточной активности COX означает, что сборка связанного с респирасомами холофермента COX может протекать и без участия субъединицы COX8A.

С помощью метода BN-PAGE было показано, что снижение ферментативной активности COX связано с пониженным общим количеством COX-содержащих белковых комплексов. В митохондриях фибробластов пациента с дефицитом COX8A и клеток НЕК293Т клона #14 (содержащих большую делецию в MTS COX8A) остаточный белок COX был в значительной степени ассоциирован с респирасомами, в то время как мономерная форма практически не обнаруживалась. Это говорит о том, что стабильность мономеров COX была сильно нарушена в случае потери COX8A, в то время как остаточная активность COX, содержащаяся внутри SC, была защищена от деградации белка. Примечательно, что аналогичные наблюдения были сделаны в случае клеток, содержащих мутации в факторах сборки COX, а именно в SURF1 и COA6. Общее количество COX было снижено и большая часть остаточного COX была включена в респирасомы, в то время как мономерная форма COX с трудом обнаруживалась [32, 33]. Миссенс-вариант структурной субъединицы COX5A, кодируемой ядерным геномом, привел к дефициту COX и сниженной стабильности мономеров COX, но уровень COX внутри респирасом оставался без изменений [34]. Эти результаты поддерживают предположение о том, что одна из ключевых физиологических ролей респирасом заключается в стабилизации индивидуальных белковых комплексов, что особенно актуально в случае их неправильной сборки и снижения стабильности [35].

Структура комплексов дыхательной цепи I и III не была нарушена в клетках с дефицитом COX8A, и их количество оказалось даже повышенным, что может возникать как компенсаторный феномен с целью увеличения доступ-

ности респирасом для стабилизации оставшегося COX. Компенсаторное повышение уровня комплексов I и III RC наблюдалось также в фибробластах с мутациями в белках SURF1 и COA6 [32, 33].

Выявленное с помощью метода BN-PAGE понижение количества COX соответствовало результатам SDS-PAGE, продемонстрировавших пониженные стационарные уровни всех тестированных субъединиц COX (COX1, COX2, COX5A, COX4) в COX8A-дефицитных линиях клеток. Стационарные уровни комплекса III были повышены в фибробластах пациента, что соответствовало увеличению общего количества комплекса III, содержащего SC. Репрезентативные субъединицы других комплексов остались без изменений.

Чтобы выяснить, могут ли изменения уровня белков быть вызваны изменениями экспрессии генов, был проведен транскриптомный анализ. В фибробластах с дефицитом COX8A результаты 3'RNA-секвенирования не показали системного увеличения транскрипции генов, кодирующих RC-белки. Это означает, что компенсаторное увеличение количества субъединиц комплексов I и III дыхательной цепи в COX8A-дефицитных фибробластах происходит, скорее всего, на пост-трансляционном уровне. Так, в COX8A-дефицитных клетках НЕК293Т клона #14 повышена экспрессия почти всех митохондриальных белок-кодирующих генов, в то время как экспрессия нескольких кодируемых ядерным геномом субъединиц, участвующих в сборке COX на её поздней стадии, понижена. Это говорит о сложном характере регуляции генной экспрессии в этой клеточной линии.

Далее мы исследовали, может ли нарушенная сборка COX, вызванная мутациями в COX8A, индуцировать протеотоксический стресс вследствие накопления орфанных промежуточных продуктов сборки COX. mtUPR является ретроградным сигнальным путем, который инициируется с целью восстановления белкового гомеостаза в митохондриях [36]. Его активация происходит с целью исправления неправильно свернутых или неправильно собранных митохондриальных белков. Активация mtUPR включает в себя повышенную регуляцию экспрессии митохондриальных AAA-протеаз: ClpP, ClpX и Lonp1, локализованных внутри митохондриального матрикса, и параплегина и YME1L, которые заякорены в IMM [21]. Кроме того, mtUPR индуцирует повышение регуляции экспрессии митохондриальных шаперонов для содействия свертыванию вновь транслированных пептидов [20]. Однако в транскриптоме COX8A-дефицитных фибробластов нет измене-

ний экспрессии генов, ассоциированных с активацией mtUPR. Экспрессия протеаз, осуществляющих контроль качества митохондрий, в клетках НЕК293Т также остается без изменений. Повышение количества транскриптов митохондриальных шаперонов в клетках НЕК293Т клона #14 можно объяснить скоординированной экспрессией ядерных и митохондриальных генов для увеличения способности шаперона сворачивать белок.

Интегрированный ответ на стресс – еще один митохондриальный ретроградный сигнальный путь, инициируемый активацией четырех протеинкиназ (Gcn2, HRI, Prk и Perk), которые активируются в ответ на широкий спектр стрессовых состояний, включая нехватку аминокислот и гема, mtUPR и стресс эндоплазматического ретикулума (ER stress) [26]. Их сигнальные пути сходятся на фосфорилировании фактора транскрипции eIF2 α , которое приводит к глобальному снижению трансляции белка и селективной активации генов стресс-ответа [25]. ATF4 является нижележащей мишенью фосфорилированного eIF2 α и основным транскрипционным регулятором ISR. Одной из его канонических мишеней является фактор транскрипции СНОР [27, 28]. Поскольку в транскриптоме обоих COX8A-дефицитных типах клеток не наблюдалось изменений, ассоциированных с ISR, вполне вероятно, что дефицит COX из-за мутаций в COX8A не приводит к инициации ISR. В целом отсутствие активации митохондриальной ретроградной передачи сигнала в обоих COX8A-дефицитных типах клеток предполагает отсутствие вредного накопления неправильно собранных промежуточных структур COX либо из-за быстрого обмена неправильно собранных промежуточных структур, либо из-за включения необычных модулей COX в респирасомы.

Таким образом, полученные нами результаты предполагают, что субъединица COX8A необходима для поддержания структурной стабильности мономеров и димеров COX. Потеря

COX8A приводит к дефициту COX, который выражается в снижении количества белковых комплексов COX и снижению его ферментативной активности. Остаточный COX в COX8A-дефицитных клетках стабилизируется внутри респирасом, и при этом не происходит активации mtUPR, вызванного неправильно собранными промежуточными структурами мономера COX.

Финансирование. Выполнение данной работы поддержано Deutsche Forschungsgemeinschaft (гранты №№ KU 911/21-2 и KU 911/22-1, предоставлены W.S.K.; и гранты №№ ZS 99/3-2 и ZS 99/4-1, предоставлены GZ). Эта работа также была поддержана Польским национальным научным центром (грант № 2019/34/A/NZ1/00352, предоставлен AS; и грант № 2015/18/E/NZ1/00737, предоставлен BK) и исследовательской и инновационной программой Европейского Союза Horizon 2020 имени Марии Склодовской-Кюри (грант № 665735 (Bio4Med)).

Благодарности. Авторы хотят выразить благодарность проф. Майку Райяну и доктору Дэвиду Страуду за предоставленную линию клеток НЕК293Т.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в настоящей работе с участием людей, соответствовали этическим стандартам Национального комитета по этике научных исследований и Хельсинкской Декларации 1964 г. ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого участника исследования было получено информированное добровольное согласие.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 1, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., and Gupte, S. S. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **18**, 331-368, doi: 10.1007/BF00743010.
2. Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.*, **19**, 1777-1783, doi: 10.1093/emboj/19.8.1777.
3. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J. A. (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes, *Mol. Cell*, **32**, 529-539, doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.
4. Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37861-37867, doi: 10.1074/jbc.M106474200.
5. Greggio, C., Jha, P., Kulkarni, S. S., Lagarrigue, S., Broskey, N. T., et al. (2017) Enhanced respiratory chain supercomplex formation in response to exercise in human skeletal muscle, *Cell Metab.*, **25**, 301-311, doi: 10.1016/j.cmet.2016.11.004.
6. Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colaś, C., et al. (2013) Supercomplex

- assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, *Science*, **340**, 1567-1570, doi: 10.1126/science.1230381.
7. Fedor, J. G., and Hirst, J. (2018) Mitochondrial supercomplexes do not enhance catalysis by quinone channeling, *Cell Metab.*, **28**, 525-531.e4, doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.024.
 8. Calvaruso, M. A., Willems, P., Van den Brand, M., Valsecchi, F., Kruse, S., et al. (2012) Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUFS4 to provide partial activity, *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 115-120, doi: 10.1093/hmg/ddr446.
 9. Schägger, H., De Coo, R., Bauer, M. F., Hofmann, S., Godino, C., and Brandt, U. (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I, *J. Biol. Chem.*, **279**, 36349-36353, doi: 10.1074/jbc.M404033200.
 10. Tropeano, C. V., Aleo, S. J., Zanna, C., Roberti, M., Scandiffio, L., et al. (2020) Fine-tuning of the respiratory complexes stability and supercomplexes assembly in cells defective of complex III, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148133, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148133.
 11. Hirst, J. (2018) Open questions: respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC Biol.*, **16**, 5-8, doi: 10.1186/s12915-018-0577-5.
 12. Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., and Genova, M. L. (2013) Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I, *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1469-1480, doi: 10.1089/ars.2012.4845.
 13. Zong, S., Wu, M., Gu, J., Liu, T., Guo, R., and Yang, M. (2018) Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase, *Cell Res.*, **28**, 1026-1034, doi: 10.1038/s41422-018-0071-1.
 14. Sinkler, C. A., Kalpage, H., Shay, J., Lee, I., Malek, M. H., Grossman, L. I., and Hüttemann, M. (2017) Tissue- and condition-specific isoforms of mammalian cytochrome c oxidase subunits: from function to human disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1534056, doi: 10.1155/2017/1534056.
 15. Goldberg, A., Wildman, D. E., Schmidt, T. R., Hüttemann, M., Goodman, M., Weiss, M. L., and Grossman, L. I. (2003) Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5873-5878, doi: 10.1073/pnas.0931463100.
 16. Hallmann, K., Kudin, A. P., Zsurka, G., Kornblum, C., Reimann, J., et al. (2016) Loss of the smallest subunit of cytochrome c oxidase, COX8A, causes Leigh-like syndrome and epilepsy, *Brain*, **139**, 338-345, doi: 10.1093/brain/awv357.
 17. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.*, **8**, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
 18. Bednarczyk, P., Wieckowski, M. R., Broszkiewicz, M., Skowronek, K., Siemen, D., and Szewczyk, A. (2013) Putative structural and functional coupling of the mitochondrial BKCa channel to the respiratory chain, *PLoS One*, **8**, e68125, doi: 10.1371/journal.pone.0068125.
 19. Wiedemann, F. R., Vielhaber, S., Schröder, R., Elger, C. E., and Kunz, W. S. (2000) Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples, *Anal. Biochem.*, **279**, 55-60, doi: 10.1006/abio.1999.4434.
 20. Pellegrino, M. W., Nargund, A. M., and Haynes, C. M. (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 410-416, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.019.
 21. Quirós, P. M., Langer, T., and López-Otín, C. (2015) New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 345-359, doi: 10.1038/nrm3984.
 22. Fiorese, C. J., and Haynes, C. M. (2017) Integrating the UPRmt into the mitochondrial maintenance network, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **52**, 304-313, doi: 10.1080/10409238.2017.1291577.
 23. Wang, Y. T., Lim, Y., McCall, M. N., Huang, K. T., Haynes, C. M., Nehrke, K., and Brookes, P. S. (2019) Cardioprotection by the mitochondrial unfolded protein response requires ATF5, *Am. J. Physiol.*, **317**, H472-H478, doi: 10.1152/ajpheart.00244.2019.
 24. Fiorese, C. J., Schulz, A. M., Lin, Y. F., Rosin, N., Pellegrino, M. W., and Haynes, C. M. (2016) The transcription factor ATF5 mediates a mammalian mitochondrial UPR, *Curr. Biol.*, **26**, 2037-2043, doi: 10.1016/j.cub.2016.06.002.
 25. Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., et al. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol. Cell*, **11**, 619-633, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00105-9.
 26. Taniuchi, S., Miyake, M., Tsugawa, K., Oyadomari, M., and Oyadomari, S. (2016) Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 α kinases, *Sci. Rep.*, **6**, 32886, doi: 10.1038/srep32886.
 27. Palam, L. R., Baird, T. D., and Wék, R. C. (2011) Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 10939-10949, doi: 10.1074/jbc.M110.216093.
 28. Fessler, E., Eckl, E. M., Schmitt, S., Mancilla, I. A., Meyer-Bender, M. F., et al. (2020) A pathway coordinated by DELE1 relays mitochondrial stress to the cytosol, *Nature*, **579**, 433-437, doi: 10.1038/s41586-020-2076-4.
 29. Timón-Gómez, A., Nývltová, E., Abriata, L. A., Vila, A. J., Hosler, J., and Barrientos, A. (2018) Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: recent developments, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **76**, 163-178, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.055.
 30. Bourens, M., Boulet, A., Leary, S. C., and Barrientos, A. (2014) Human COX20 cooperates with SCO1 and SCO2 to mature COX2 and promote the assembly of cytochrome c oxidase, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 2901-2913, doi: 10.1093/hmg/ddu003.
 31. Lobo-Jarne, T., Pérez-Pérez, R., Fontanesi, F., Timón-Gómez, A., Wittig, I., et al. (2020) Multiple pathways coordinate assembly of human mitochondrial complex IV and stabilization of respiratory supercomplexes, *EMBO J.*, **39**, e103912, doi: 10.15252/embj.2019103912.
 32. Kovářová, N., Čížková Vrbacká, A., Pecina, P., Stránecký, V., Pronicka, E., Kmoch, S., and Houšťek, J. (2012) Adaptation of respiratory chain biogenesis to cytochrome c oxidase deficiency caused by SURF1 gene mutations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1114-1124, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.03.007.
 33. Baertling, F., van den Brand, M. A. M., Hertecant, J. L., Al-Shamsi, A., van den Heuvel, L. P., et al. (2015) Mutations in COA6 cause cytochrome c oxidase deficiency and neonatal hypertrophic cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, **36**, 34-38, doi: 10.1002/humu.22715.
 34. Baertling, F., Al-Murshedi, F., Sánchez-Caballero, L., Al-Senaidi, K., Joshi, N. P., et al. (2017) Mutation in mitochondrial complex IV subunit COX5A causes pulmonary arterial hypertension, lactic acidemia, and failure to thrive, *Hum. Mutat.*, **38**, 692-703, doi: 10.1002/humu.2321035.
 35. Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A., and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.*, **281**, 15370-15375, doi: 10.1074/jbc.M513525200.
 36. Qureshi, M. A., Haynes, C. M., and Pellegrino, M. W. (2017) The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse, *J. Biol. Chem.*, **292**, 13500-13506, doi: 10.1074/jbc.R117.791061.

**MOLECULAR AND FUNCTIONAL EFFECTS OF LOSS
OF CYTOCHROME *c* OXIDASE SUBUNIT 8A****D. Rotko^{1,2}, A. P. Kudin¹, G. Zsurka^{1,3}, B. Kulawiak², A. Szewczyk², and W. S. Kunz^{1,3*}**¹ *Institute of Experimental Epileptology and Cognition Research, Life & Brain Center, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; E-mail: wolfram.kunz@ukbonn.de*² *Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 02-093 Warsaw, Poland*³ *Department of Epileptology, University Bonn Medical Center, 53127 Bonn, Germany*

In this work we studied molecular and functional effects of the loss of the smallest nuclear encoded subunit of cytochrome *c* oxidase COX8A in fibroblasts from a patient with a homozygous splice site mutation and in CRISPR/Cas9 genome-edited HEK293T cells. In both cellular model systems, between 20 to 30% of the residual enzymatic activity of cytochrome *c* oxidase (COX) was detectable. In immunoblots of BN-PAGE separated mitochondria from both cellular models almost no monomers and dimers of the fully assembled COX could be visualized. Interestingly, supercomplexes of COX formed with complex III and also with complexes I and III retained considerable immunoreactivity, while nearly no immunoreactivity attributable to subassemblies was found. That indicates that COX lacking subunit 8A is stabilized in supercomplexes, while monomers and dimers are rapidly degraded. With transcriptome analysis by 3'-RNA sequencing we failed to detect in our cellular models of COX8A deficiency transcriptional changes of genes involved in the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and the integrated stress response (ISR). Thus, our data strongly suggest that the smallest subunit of cytochrome *c* oxidase COX8A is required for maintenance of the structural stability of COX monomers and dimers.

Keywords: mitochondria, cytochrome *c* oxidase, subunit 8A, respiratory chain super complexes