

УДК 577.23

ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ АКТИВАТОР Mss51p ДРОЖЖЕЙ И БЕЛОК ZMYND17 ЧЕЛОВЕКА – ОБЩНОСТЬ ПРОИСХОЖДЕНИЯ, РАЗЛИЧИЕ ФУНКЦИЙ

© 2021 М.В. Балева, У.Е. Пиунова, И.В. Чичерин,
Д.Г. Красавина, С.А. Левицкий*, П.А. Каменский

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
кафедра молекулярной биологии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: sergey.levitskii@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.05.2021

После доработки 19.07.2021

Принята к публикации 19.07.2021

Трансляция в митохондриях современных эукариот, несмотря на сходство с биосинтезом белка у бактерий, имеет ряд особенностей. Одной из таких уникальных черт является необходимость координации трансляции отдельных митохондриальных мРНК, кодирующих субъединицы комплексов цепи окислительного фосфорилирования, с трансляцией других компонентов этих комплексов в цитозоле. В митохондриях пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* такая координация осуществляется посредством системы белков – трансляционных активаторов, преимущественно взаимодействующих с 5'-нетранслируемыми областями митохондриальных мРНК. В митондрии человека подобной системы не обнаружено, хотя и выявлен один трансляционный активатор TACO1. В данной работе мы изучили влияние на митохондриальную трансляцию в клетках человека делеции гена *ZMYND17*, кодирующего ортолог дрожжевого трансляционного активатора Mss51p. Нам удалось продемонстрировать, что делеция *ZMYND17* не влияет на трансляцию в митохондриях, однако снижает активность цитохром *c*-оксидазы и увеличивает количество свободной F₁-субъединицы АТФ-синтазы. Помимо этого, мы изучили эволюционную историю Mss51p и ZMYND17 и выявили путь расхождения функций этих ортологических белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, трансляция, активаторы трансляции, регуляция трансляции.

DOI: 10.31857/S0320972521090104

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии являются облигатными органеллами большинства эукариотических клеток, выполняющими множество важнейших функций. Помимо обеспечения клеток энергией путём синтеза АТФ в результате окислительного фосфорилирования, митохондрии участвуют в образовании FeS-кластеров, метаболизме липидов, аминокислот и нуклеотидов, регуляции апоптоза, а также и во многих других процессах. Согласно общепринятой эндосимбиотической теории, митохондрии произошли путём поглощения их предка, родственного современным α -протеобактериям, археоподобным предшественником эукариот [1]. В ходе эволюции подавляющее большинство генов предка митондрий элиминировались или были перенесены в ядро. Таким образом, большинство митондриальных белков кодируется в ядре, синтезируется в цитозоле, а затем импортируется в мито-

хондрии с использованием особого аппарата транслокации. Тем не менее митохондрии современных организмов, как правило, имеют свой сравнительно небольшой геном, а также аппараты его поддержания, транскрипции и трансляции.

Несмотря на общую схожесть процессов трансляции у бактерий и митондрий, аппарат биосинтеза белка в этих органеллах имеет ряд существенных отличий от аппарата митондриальной трансляции [2]. В первую очередь следует отметить существенно большее содержание белка относительно рРНК в митондриальных рибосомах, предположительно, обусловленное замещением функций отдельных участков рРНК синтезируемыми в цитозоле белками. Кроме этого, митондриальные рибосомы строго ассоциированы с внутренней мембраной митондрий [3]. Важной особенностью митондриальной трансляции является необходимость её точной взаиморегуляции с биосинтезом митондриально-адресованных белков в цитозоле для обеспечения правильных стехиометрических соотношений новосинтезируемых и импортируемых белков, обуславливающих

Принятые сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; CIV – комплекс IV цитохром *c*-оксидазы.

* Адресат для корреспонденции.

корректную сборку комплексов и суперкомплексов электрон-транспортной цепи на внутренней мембране митохондрий. По всей видимости, в ходе эволюции механизмы такой тонкой регуляции биосинтеза белка в митохондриях возникали и развивались параллельно и независимо у разных групп эукариот [4]. В наиболее высокой степени особенности митохондриальной трансляции и её регуляции изучены у двух объектов — пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и млекопитающих.

Геном современных митохондрий представляет собой кольцевую или линейную молекулу ДНК, несущую несколько генов, кодирующих преимущественно субъединицы комплексов цепи окислительного фосфорилирования, гены рННК митохондриальных рибосом, а также гены тРНК. У пекарских дрожжей *S. cerevisiae* геном митохондрий содержит гены семи белков (субъединиц комплексов электрон-транспортной цепи), одного белка малой субъединицы митохондриальной рибосомы, гены 15S и 21S рННК митохондриальных рибосом, ген рННК-компонента митохондриальной рНКазы Р, а также 24 гена тРНК [5]. Регуляция экспрессии митохондриального генома дрожжей в основном осуществляется на пост-транскрипционном уровне [6]. Матричные рННК митохондрий дрожжей имеют протяжённые 5'-нетранслируемые области (НТО), с которыми взаимодействуют участники сложной системы регуляции трансляции — трансляционные активаторы. Подробно система трансляционных активаторов *S. cerevisiae* рассмотрена в недавнем обзоре [7]. Особенно изыщно осуществляется регуляция трансляции мРНК COX1. Для этой мРНК обнаружено 4 трансляционных активатора: Pet309p, Mss51p, Mam33p и Mss116p. Содержащий 12 пентатрикопептидных повторов белок внутренней мембраны Pet309p взаимодействует с 5'-НТО мРНК COX1, причём такое взаимодействие является абсолютно необходимым для трансляции этой мРНК [8]. Помимо этого, Pet309p стабилизирует предшественника мРНК COX1 [9]. Также с 5'-НТО мРНК COX1 взаимодействует активатор Mam33p, помимо этого участвующий в регуляции сборки митохондриальных рибосом [10]. Третий трансляционный фактор мРНК COX1, белок Mss166p, относится к семейству DEAD-бокс хеликаз. В условиях холодового шока он является фактором элонгации транскрипции, а в нормальных условиях — фактором сплайсинга митохондриальных пре-мРНК. Помимо этого, он взаимодействует с Pet309p, причём делеция кодирующего Mss116p гена приводит к отсутствию Pet309p в митохондриях, что существенно снижает эффективность трансляции COX1 [11].

Ключевым компонентом системы регуляции трансляции мРНК COX1 у *S. cerevisiae* является четвёртый трансляционный активатор — белок Mss51p. Его функционирование осуществляется по принципу обратной связи. Mss51p изначально взаимодействует с 5'-НТО и кодирующей частью мРНК COX1, опосредуя биосинтез соответствующего белка, а также непосредственно с новосинтезируемым полипептидом Cox1p [12]. По завершении трансляции связанный с Cox1p Mss51p включается в состав интермедиата сборки комплекса цитохром *c*-оксидазы (комплекса IV CIV), содержащего ряд других факторов — регуляторов. В случае остановки корректной сборки CIV на этой стадии Mss51p остаётся связанным с интермедиатом и не способен заново участвовать в активации трансляции мРНК COX1 [13]. Если же на внутренней мембране митохондрий присутствует достаточное количество необходимых для сборки субъединиц CIV, Mss51p диссоциирует из интермедиата и становится доступным для следующего раунда активации трансляции мРНК COX1. Помимо этого, Mss51p является гем-связывающим белком, причём недостаток гема приводит к значительным нарушениям биосинтеза Cox1p [14]. По всей видимости, связывание гема белком Mss51p является необходимым условием для ассоциации упоминавшегося интермедиата сборки CIV и не играет значительной роли в активации трансляции мРНК COX1 [7, 15]. Таким образом, Mss51p играет ключевую роль в регуляции трансляции Cox1p в митохондриях, определяя интенсивность биосинтеза этого белка в зависимости от эффективности сборки цитохром *c*-оксидазы.

В геноме митохондрий млекопитающих закодировано 13 белков, являющихся субъединицами комплексов цепи окислительного фосфорилирования I, III, IV и V [16]. Это гены COB (апоцитохром *b*), COX1,2,3 (субъединицы цитохром *c*-оксидазы), ATP6,8 (субъединицы АТФ-синтазы), а также ND1,2,3,4,4L,5,6 (субъединицы НАДН-дегидрогеназы), кодируемые одиннадцатью мРНК [17]. Трансляция соответствующих мРНК в митохондриях млекопитающих, по всей видимости, регулируется отличным от *S. cerevisiae* способом. В первую очередь это обусловлено практически полным отсутствием 5'-НТО у митохондриальных мРНК млекопитающих. Более того, добавление всего лишь нескольких нуклеотидов к 5'-концу мРНК существенно снижает эффективность образования инициаторных комплексов на них *in vitro* [18]. Недавние структурные исследования, проведённые с помощью криоэлектронной микроскопии, показали, что важную роль в связыва-

нии безлидерной мРНК малой субъединицей митохондриальной рибосомы играет рибосомный PPR-белок mS39, располагающийся у места входа мРНК. Важно, что контакт мРНК с mS39, по всей видимости, не является структурно специфичным, а также не может быть зависимым от последовательности, поскольку сколько-либо значимого консенсуса в 11 митохондриальных мРНК не обнаруживается, как и значимых вторичных структур в 5'-фланговых областях мРНК [19, 20]. Предполагается, что это взаимодействие обусловлено частым появлением нуклеотида U во втором положении кодонов всех мРНК, начиная с седьмого кодона. Возможно, наличие часто повторяющихся U является своего рода мишенью для связывания PPR-доменами и образования инициаторного комплекса [19]. Однако эти данные не объясняют, каким именно образом осуществляется регуляция трансляции различных мРНК, а также то, как осуществляется взаимосвязь биосинтеза митохондриально-закодированных субъединиц комплексов цепи окислительного фосфорилирования с трансляцией других субъединиц в цитозоле.

Отсутствие 5'-НТО, казалось бы, отвергает возможность существования у млекопитающих системы трансляционных активаторов, сходных с таковой у *S. cerevisiae*. Однако в 2009 году был идентифицирован первый трансляционный активатор в митохондриях человека – TACO1 [21]. Авторам указанной работы удалось продемонстрировать, что мутации в гене этого белка в клетках пациента с синдромом Лея приводят к существенному снижению эффективности трансляции COX1 в митохондриях. При этом эффективность биосинтеза COX1 восстанавливалась при крайне слабом уровне экспрессии экзогенного TACO1, а также ингибировалась при сверхэкспрессии кодирующего TACO1 гена [21]. Тем не менее молекулярные механизмы влияния TACO1 на трансляцию COX1 остаются неизученными, хотя и показана взаимосвязь мутаций в гене этого белка с тяжёлыми митохондриальными заболеваниями [22, 23].

Кроме этого, методами биоинформатики было предсказано, что белок человека с неизвестной функцией, ZMYND17, является ортологом уже упоминавшегося трансляционного регулятора *S. cerevisiae* Mss51p [24]. При дальнейшем изучении было продемонстрировано, что этот белок локализован в митохондриях, кодирующий его ген, преимущественно экспрессируется в скелетной мускулатуре, а подавление его экспрессии приводит к увеличению уровня клеточной АТФ, увеличению эффективности гликолиза и окислительного фосфорилирова-

ния [25]. В более позднем исследовании, проведённом на лабораторных животных, нокаутных по гену *ZMYND17*, было показано, что, несмотря на нормальное развитие таких мышей, у них наблюдались морфологические и функциональные нарушения митохондрий мышц. Кроме того, у нокаутных по *ZMYND17* мышей среднего возраста отмечены сниженная производительность аэробных упражнений, плохая усвояемость глюкозы и инсулинорезистентность. Авторы предположили, что ZMYND17 является стресс-индуцируемым метаболическим регулятором, поддерживающим целостность митохондрий, отсутствие которого приводит к нарушениям метаболизма глюкозы во всем организме [26]. Интересно, что в другой работе на сходных нокаутных по *ZMYND17* мышцах были получены другие результаты. Оказалось, что лишённые ZMYND17 мыши были устойчивы к набору веса на высокожировой диете, обладали повышенной скоростью метаболизма глюкозы, увеличенной чувствительностью к инсулину и ускоренным β -окислением жирных кислот [27]. В последующем исследовании той же группы авторов на мышинной модели мышечной дистрофии Дюшенна было показано, что удаление гена *ZMYND17* приводит к увеличению поглощения кислорода миофибриллами, а также снижению гистологической патологии. Делеция гена, кодирующего ортолог Mss51p, снижала обусловленные заболеванием дефекты митохондриального дыхания и увеличивала устойчивость к усталости, однако не увеличивала силу мышц [28].

Таким образом, ортолог гена трансляционного активатора Mss51p *S. cerevisiae* у человека, белок ZMYND17, несмотря на митохондриальную локализацию, по всей видимости, имеет отличную от дрожжевого белка функцию. В данной работе для сравнительной функциональной характеристики этих белков мы решили оценить влияние делеции гена *ZMYND17* в линии клеток HeLa человека на митохондриальную трансляцию и функциональность митохондрий, а также проследить эволюционную историю Mss51p и ZMYND17.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и линии клеток, среды для культивирования. В работе использовали штамм *Escherichia coli* TOP10 OneShot («Invitrogen», США), культивируемый в среде LB, а также адгезионную линию клеток HeLa человека (ATCC CCL-2, «ATCC», США), культивируемую в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

Использованные в работе нуклеотиды

Наименование	Последовательность 5'–3'	Назначение
MSS51-3Fwd	CACCgTCCACGGTCCCGGCGACGA	сборка sgRNA 3
MSS51-3Rev	AAACTCGTCGCCGGACCGTGGAc	сборка sgRNA 3
MSS51-17Fwd	CACCgCCTTGGATGATAATGTTCC	сборка sgRNA 17
MSS51-17Rev	AAACGGAACATTATCATCCAAGGc	сборка sgRNA 17
ZMYND-1Fwd	CCTGGGTCTGAGAGACTGG	анализ клонов на прохождение редактирования
ZMYND-1Rev	CTGTACTCCCTCTCCACCTTC	анализ клонов на прохождение редактирования

Примечание. Серым выделены участки для создания липких концов, соответствующих образуемым эндонуклеазой *BbsI*.

с глюкозой (4,5 г/л) и аланил-глутамином («ПанЭко», Россия).

Плазмидные векторы и олигонуклеотиды. Для получения делеции гена *ZMYND17* использовали плазмиду pCas9-ires-EGFP, содержащую гены РНК-направляемой эндонуклеазы Cas9 и зелёного флуоресцирующего белка (EGFP), разделённые IRES под контролем CMV-промотора, полученную ранее [29]. Плазида pU6-gRNA была любезно предоставлена доктором Скрыбиным, Университет Мюнстера, Германия [30]. Использованные в работе олигонуклеотиды приведены в таблице.

Делеция гена *ZMYND17*. Для получения линии клеток HeLa с делецией в гене *ZMYND17* были получены векторы, содержащие гены двух одиночных направляющих РНК (sgRNA) под контролем промотора U6. Для этого олигонуклеотиды, соответствующие sgRNA 3 и 17 (таблица), отжигали попарно друг на друга, фосфорилировали полинуклеотидкиназой (PNK, «ThermoFisher Scientific», США), следуя рекомендациям производителя, а затем лигировали в предварительно гидролизованые эндонуклеазой *BbsI* («ThermoFisher Scientific») плазмидные векторы pU6-gRNA. Лигазными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli*. После отбора трансформантов и выделения плазмид корректность сборки векторов подтверждали секвенированием по Сэнгеру («Евроген», Россия).

Клетки HeLa трансфицировали плазидами, которые содержали компоненты системы CRISPR/Cas9 (2 плазмиды на основе pU6-gRNA, содержавших гены sgRNA 3 и 17, pCas9-ires-EGFP) при помощи реагента Lipofectamine 3000 («Invitrogen», США), следуя рекомендациям производителя. Через 48 ч трансфицированные клетки анализировали с помощью системы мультифотонной и конфокальной микроскопии Nikon A1 MP+ («Nikon», Япония) и проводили отбор флуоресцирующих клеток с помощью

сортирующей цитофлуориметрической системы FACS Aria SORP («Beckton Dickinson», США). После подсчёта клеток в камере Горяева 100 клеток помещали в 10 мл DMEM и высевали на 96-луночный планшет по 100 мкл в лунку. Далее клетки пересевали на 12-луночный планшет, культивировали до 50–70% конfluence, выделяли ДНК и проверяли на наличие делеции с помощью заранее подобранной и протестированной пары олигонуклеотидов (таблица).

Анализ митохондриальной трансляции *in vivo*. Для одного анализа использовали $\sim 10^6$ клеток. Клетки промывали раствором PBS (1,7 мМ KH_2PO_4 , 5,2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, pH 7,4), добавляли среду DMEM без метионина, содержащую 10% диализованной сыворотки крупного рогатого скота и 5 мМ циклогексимида, и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO_2 в течение 15 мин. Далее к клеткам добавляли 0,1 мкКю метионина («Perkin Elmer», США) и инкубировали 45 мин при 37 °C в атмосфере 5% CO_2 . Реакцию мечения останавливали добавлением холодного L-метионина до 4 мМ и пурамицина до 30 мкг/мл. Клетки промывали раствором PBS, диссоциировали 0,25%-ным раствором Трипсин-EDTA («ПанЭко», Россия) и центрифугировали 4 мин при 400 g. Клетки промывали раствором PBS, а затем лизировали ультразвуком («Branson Scientific», США) в PBS. По 25 мкг суммарного белка разделяли в 18%-ном денатурирующем ПААГ. Гель окрашивали Кумасси, высушивали на приборе Gel Dryer System («Hoefel», Германия) при 80 °C в течение часа. Продукты митохондриальной трансляции визуализировали радиоавтографически на приборе Storm865 («GE Healthcare», США). Анализ распределения продуктов митохондриальной трансляции проводили с помощью программного обеспечения ImageJ («NIH», США).

Измерение скорости поглощения кислорода. Поглощение клетками кислорода определяли полярографически при помощи электрода

Кларка на приборе Oxygraph Plus («Hansatech», Великобритания) при 37 °С в среде DMEM. Для каждого измерения использовали $\sim 4 \times 10^6$ клеток. Для установления базального уровня дыхания измерения проводили в суспензии клеток на протяжении 5 мин, затем в ячейку добавляли разбавитель СССР до концентрации 10 мкМ для измерения истинного дыхания; измерения проводили ещё 2 мин, после чего активность цитохром *c*-оксидазы ингибировали добавлением KCN до 1 мМ. Эксперименты проводили в трёх независимых повторах. Скорость поглощения кислорода клетками высчитывалась как производная функции, выражающей зависимость концентрации кислорода от времени.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из $\sim 2 \times 10^7$ клеток. Клетки ресуспендировали в 2 мл охлажденного RSB-буфера (10 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl pH, 7,5), переносили в 7-мл гомогенизатор Даунса и инкубировали 5 мин на льду. Клетки лизировали семью ударами и немедленно добавляли 1,455 мл 2,5× MS-буфера (525 мМ маннитола, 175 мМ сахарозы, 2,5 мМ EDTA, 12,5 мМ Tris-HCl, pH 7,5). Лизат клеток центрифугировали 5 мин при 1300 g и 4 °С. Митохондрии осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 17 000 g и 4 °С. Концентрацию митохондриального белка измеряли методом Бредфорда.

Измерение активности комплекса IV. В качестве субстрата для измерения активности комплекса IV использовали раствор восстановленного цитохрома *c*. Для его приготовления 2,7 мг сухого цитохрома *c* («Sigma Aldrich», США) растворяли в 1 мл воды, после чего добавляли 5 мкл 0,1 М DTT и инкубировали 15–30 минут при комнатной температуре. Исходный раствор разбавляли в 20 раз и измеряли разницу поглощения A_{550}/A_{565} . Соотношение A_{550}/A_{565} должно быть 10–20. Для измерения активности 1 мкг митохондрий, растворенных в 40 мкл буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl, pH 7,0 и 250 мМ сахарозы, добавляли в 180 мкл буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl, 125 мМ KCl, pH 7,0; митохондрии пермеабелизовали добавлением 1 мМ додецилмальтозида. К полученной суспензии добавляли 20 мкл раствора субстрата и измеряли поглощение цитохрома *c* при 550 нм каждые 10 с в течение 3 мин в планшетном спектрофотометре («Тесла», Швейцария). Реакцию ингибировали добавлением 1 мкл 1 М KCN, специфически блокирующем комплекс IV, и продолжали измерение в тех же временных интервалах. При расчётах скорость изменения поглощения после добавления KCN вычитали из скорости изменения поглощения без KCN для исключения влияния активности комплекса III. Активность ци-

тохром *c*-оксидазы выражали в единицах активности (U) на мг митохондриального белка, где одна единица активности окисляет 1 мкмоль ферроцитохрома *c* в минуту.

Blue-Native-электрофорез. Митохондрии ресуспендировали в буфере для солиubilизации (50 мМ имидазол, 50 мМ NaCl, 2 мМ 6-аминогексановая кислота, 1 мМ EDTA; pH 7,0) до конечной концентрации митохондриального белка 10 мкг/мкл. Далее добавляли 20%-ный дигитонин (в расчёте 6 мг дигитонина на 1 мг митохондриального белка) и инкубировали 15 мин на льду. Суспензию митохондрий центрифугировали в течение 1 ч при 25 000 g и 4 °С. К супернатанту добавляли 50%-ный глицерин (в расчёте 1 мкл/2,4 мкл дигитонина) и 5%-ный Кумаси G-250 (в расчёте 1 мкл/2 мкл детергента), центрифугировали 5 мин при 25 000 g и наносили на 4–10%-ный Blue-Native полиакриламидный гель, согласно ранее опубликованному протоколу [31]. Электрофоретическое разделение проводили в течение 30 мин при постоянном напряжении 75 В, используя катодный буфер, содержащий 7,5 мМ имидазол, 50 мМ Tricine, 0,02% Кумаси G-250, pH 7,0, а затем 1,5 ч при постоянном напряжении 125 В, используя катодный буфер, содержащий 7,5 мМ имидазол, 50 мМ Tricine, 0,002% Кумаси G-250, pH 7,0. В качестве анодного буфера использовали 25 мМ имидазол-HCl, pH 7,0.

Измерение активностей комплекса I и АТФ-синтазы в геле. Активность НАДН-дегидрогеназы в геле анализировали, согласно ранее опубликованному протоколу [32]. Кратко, Blue-Native-гель после электрофореза инкубировали при комнатной температуре в растворе, содержащем 100 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мг/мл NBT (нитросиний тетразолий) и 0,14 мМ НАДН, до появления специфической окраски. Обсчёт распределения активности по суперкомплексам проводили с использованием программы ImageJ. Активность комплекса V (АТФ-синтазы) исследовали непосредственно в геле, согласно ранее опубликованному протоколу [32]. Гель инкубировали в буфере, содержащем 35 мМ Tris-HCl, pH 7,8, 270 мМ глицин, 14 мМ MgSO₄, 5 мМ АТФ и 0,2% Pb(NO₃)₂ при 37 °С при постоянном помешивании до проявления характерной окраски. Реакцию останавливали инкубацией геля в 1 М растворе глицина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение линии клеток HeLa с делецией в гене ZMYND17. Для получения линии клеток HeLa с делецией в гене ZMYND17 (далее –

$\Delta ZMYND17$) была использована система CRISPR/Cas9, которая позволила направленно внести в геном двуцепочечные разрывы с последующей их репарацией с помощью негомологичного соединения концов. Делетируемый участок выбирали, учитывая следующие условия: а) делеция должна возникнуть в одном из первых экзонов; б) для предотвращения возникновения в отредактированном гене альтернативных стартовых кодонов исходный стартовый кодон должен сохраняться; в) длина делетируемого участка должна быть не кратна 3 для того, чтобы обеспечить сбой рамки считывания и невозможность синтеза «укороченной» формы белка; г) делеция должна возникать в участке, содержащемся во всех возможных изоформах мРНК, возникающих в результате альтернативного сплайсинга. Для получения клонов с нефункциональным белком ZMYND17 в качестве мишени для sgRNA был выбран участок первого экзона соответствующего гена (рис 1, а). Подбор направляющих последовательностей одиночных гидовых РНК осуществляли с помощью онлайн-сервиса genscript.com. Гены, кодирующие комплементарные мишени участки sgRNA, клонировали в составе плазмидного вектора pU6-gRNA. После трансфекции клеток HeLa компонентами системы CRISPR/Cas9, отбора трансфицированных клеток и их клонирования из потомства трансфицированных моноклонов выделяли ДНК и оценивали эффективность редактирования с помощью ПЦР. Полученные в ходе ПЦР фрагменты, соответствующие по длине ожидаемым в результате корректного редактирования обоим аллелям, выделяли, после чего определяли их нуклеотидную последовательность. В результате секвенирования таких фрагментов были отобраны 2 клон, содержавшие делеции в первом экзоне гена ZMYND17 протяженностью в 137 нуклеотидов, которые приводили к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона через 40 нуклеотидов после места сдвига рамки (рис 1, а).

Делеция в гене ZMYND17 не влияет на эффективность трансляции в митохондриях. После получения линий клеток с делецией в гене ZMYND17, приводящей к отсутствию возможности синтеза полноценного белка, мы оценили влияние такой делеции на эффективность трансляции в митохондриях. Для этого цитозольная трансляция блокировалась добавлением циклогексимида, после чего к клеткам в среде без метионина добавляли L-[S³⁵]-метионин. Реакцию останавливали добавлением холодного метионина и пуромицина, анализ включения радиоактивной метки проводили после разделения продуктов трансляции в 18%-ном ПААГ (рис. 1, б).

Количественный анализ эффективности трансляции проводили по результатам шести независимых экспериментов (по 3 эксперимента для каждого из полученных клонов). Согласно результатам количественного анализа, делеция в гене ZMYND17 не приводила к значимым изменениям эффективности трансляции ни одного из 13 митохондриально кодируемых белков.

Анализ скорости поглощения кислорода и активности цитохром с-оксидазы в клетках с делецией гена ZMYND17. Для того чтобы выяснить, влияет ли делеция гена ZMYND17 на митохондриальную функцию, мы измерили скорость поглощения кислорода в нокаутных линиях и клетках дикого типа. Измерение скорости поглощения кислорода проводили поляриграфически с использованием электрода Кларка. Измеряли как базальное клеточное дыхание, так и истинное, определяемое в присутствии разобщителя СССР (карбонилцианид м-хлорфенилгидразона). Последнее значение отражает максимально возможное для исследуемого образца поглощение кислорода, не зависящее от протонного градиента на внутренней мембране митохондрий. Для нормирования результатов до измерения подсчитывали количество клеток, скорость поглощения выражали в нМ/10⁶ клеток/мин. На рис. 2, а представлены обобщенные результаты по данным четырёх независимых экспериментов.

Согласно полученным нами данным, уровень базального дыхания у клеток с делецией в гене ZMYND17 не отличался от такового у клеток исходной линии HeLa. Тем не менее уровень истинного дыхания, измеряемого при разобщении работы электрон-транспортной цепи и электрохимического градиента с помощью СССР, у клеток исходной линии был больше на ~27%. Последнее может быть обусловлено сниженной активностью цитохром с-оксидазы у клеток с делецией.

Для проверки этого предположения мы спектрофотометрически измерили активность CIV в изолированных митохондриях из клеток исходной линии HeLa и $\Delta ZMYND17$ (рис. 2, б). Действительно, согласно полученным нами данным, активность цитохром с-оксидазы в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ была снижена в среднем на 23% от таковой в митохондриях клеток исходной линии HeLa.

Распределение активности НАДН-дегидрогеназы в суперкомплексах цепи окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ и исходной линии HeLa. Ранее было показано, что организация отдельных комплексов дыхательной цепи в структуры более высокого порядка – суперкомплексы – может влиять

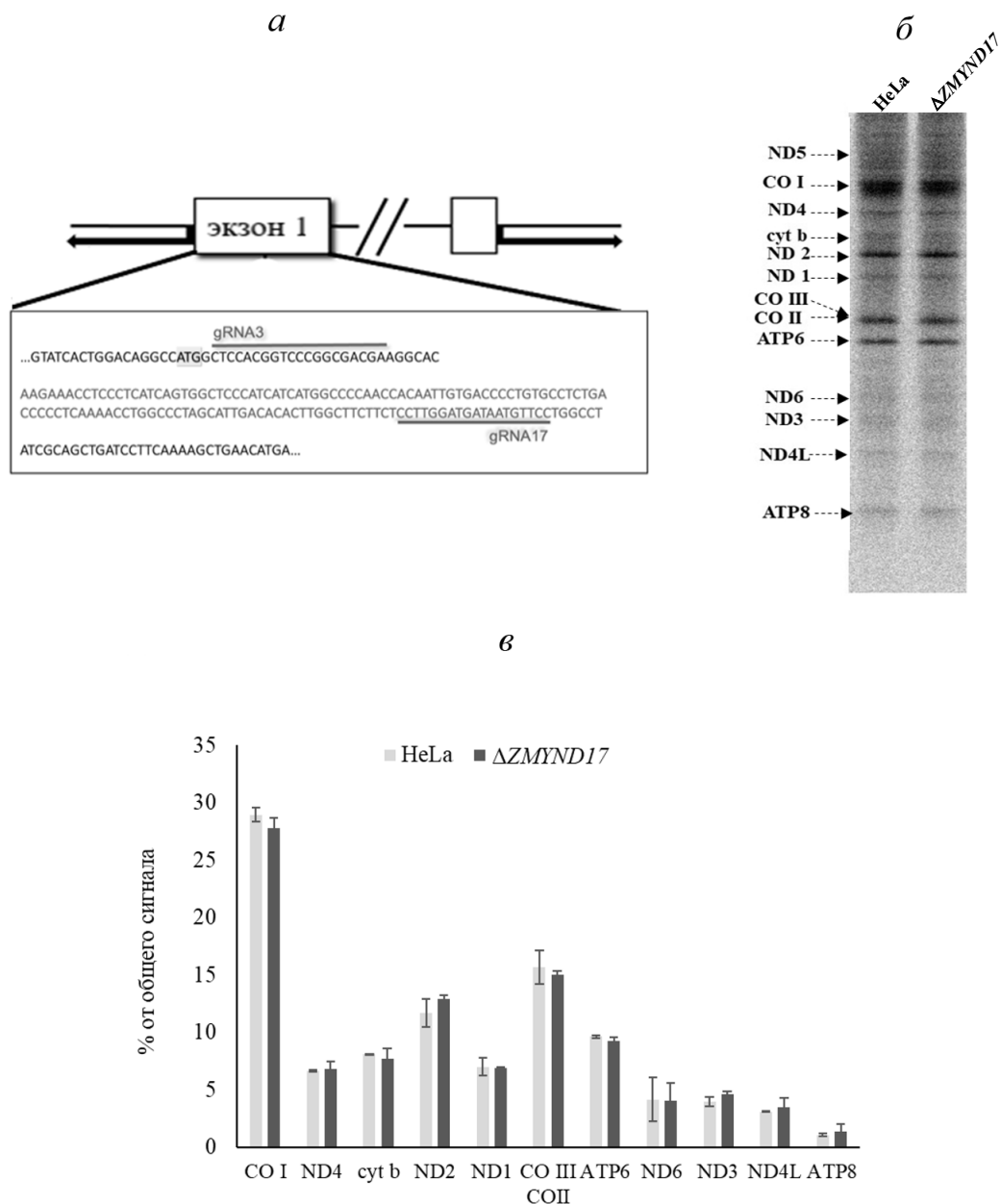


Рис. 1. Делеция гена *ZMYND17* не влияет на эффективность трансляции в митохондриях человека. *а* – Схема редактирования *ZMYND17* для получения нефункциональных генов, *gRNA3* и *gRNA17* – отмечены комплементарные участки sgRNA, серым цветом выделена последовательность, удаленная из генома в результате редактирования. *б* – Радиоавтограф разделённых продуктов митохондриальной трансляции в клетках исходной линии HeLa и клетках с делецией в гене *ZMYND17* ($\Delta ZMYND17$). Стрелками указаны продукты трансляции. Эксперимент проводился в трёх независимых биологических повторах для каждого из двух полученных клонов, представлен результат типичного эксперимента. *в* – Результат количественной оценки эффективности трансляции отдельных белков. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам шести независимых экспериментов

на их активность [33]. Таким образом, наблюдаемые нами снижения активности комплекса IV в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ могут быть обусловлены изменениями состава суперкомплексов внутренней мембраны митохондрий данной клеточной линии. Для проверки данного предположения нами были выделены митохон-

дрии из клеток исходной линии HeLa и линии с делецией в гене *ZMYND17*, после чего суперкомплексы были разделены с помощью Blue-Native-электрофореза с последующим анализом активности комплекса I, который является коровым для всех суперкомплексов (рис. 3, *а*). Согласно полученным нами данным, существ-

венных различий в составе суперкомплексов и распределения активности НАДН-дегидрогеназы между суперкомплексами различного порядка не обнаружено (рис. 3, б).

Анализ активности в геле АТФ-синтазы в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ и клеток исходной линии HeLa. В одной из работ, направленной на изучение влияния подавления экспрессии гена

ZMYND17 на функциональность митохондрий, было показано, что митохондрии таких клеток имеют морфологические дефекты, а именно, снижение количества крист [26]. Помимо этого, имеется ряд противоречивых данных, свидетельствующих об увеличении клеточной продукции АТФ при делеции *ZMYND17* [27] или же её снижении [26]. Мы решили проанализиро-

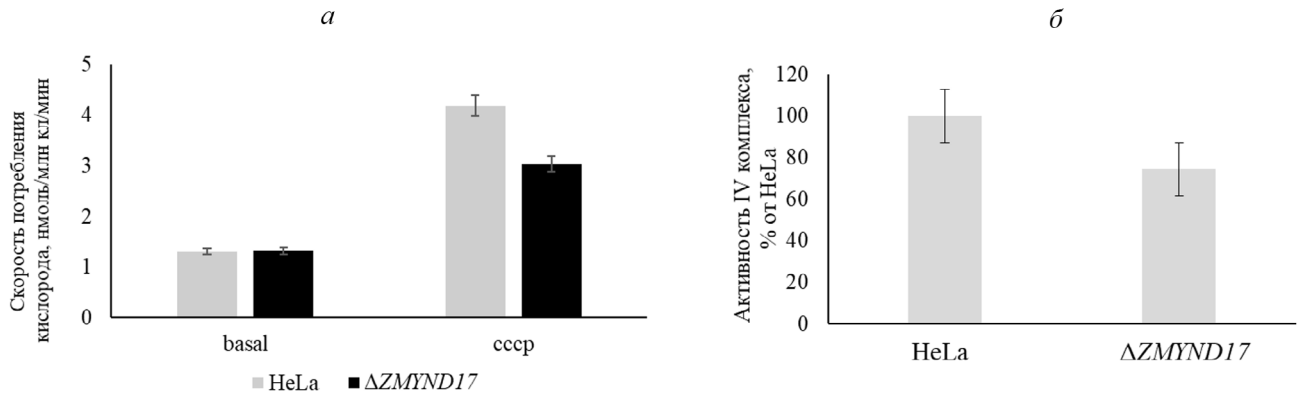


Рис. 2. Делеция гена *ZMYND17* приводит к снижению истинного дыхания клеток и уменьшению активности цитохром *c*-оксидазы. *а* – Скорость потребления кислорода клетками с делецией в гене *ZMYND17* и клетками исходной линии HeLa. Скорость потребления кислорода измеряли поляриграфически с использованием электрода Кларка. basal – Базальный уровень поглощения кислорода при 37 °С; CCCP – уровень поглощения кислорода при добавлении разобщителя CCCP. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам четырёх независимых экспериментов. *б* – Активность цитохром *c*-оксидазы в митохондриях клеток с делецией в гене *ZMYND17* и клеток исходной линии HeLa. Активность измеряли спектрофотометрически по снижению поглощения при 550 нм. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам пяти независимых экспериментов

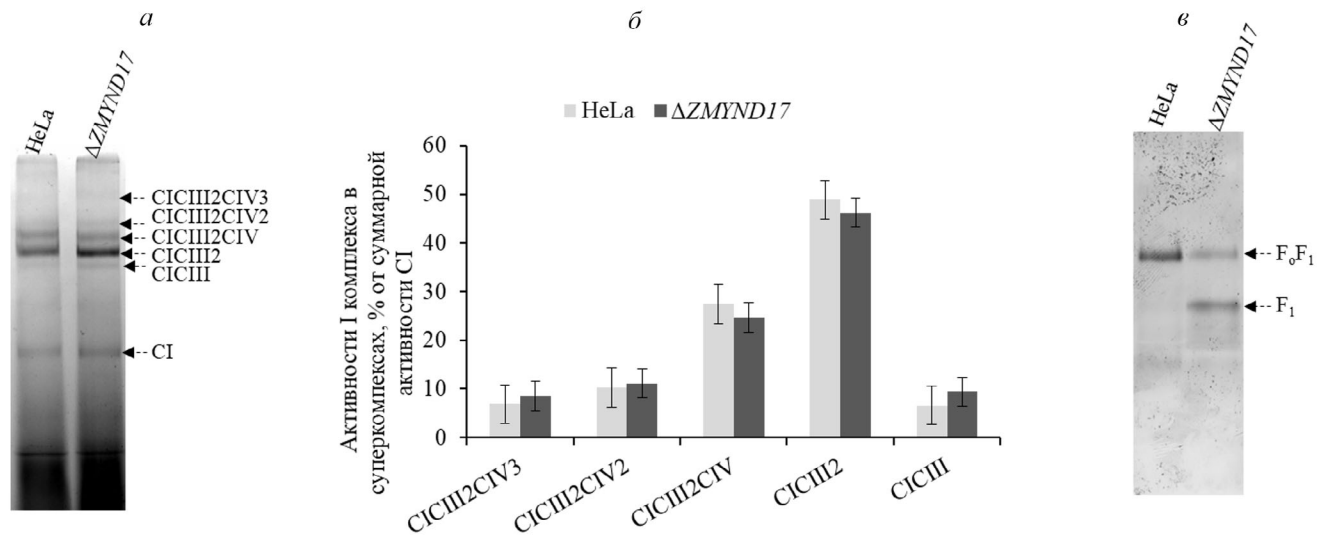


Рис. 3. Активности НАДН-дегидрогеназы и АТФ-синтазы митохондрий клеток исходной линии HeLa и $\Delta ZMYND17$ в геле после Blue-Native-электрофореза. Изолированные митохондрии из клеток исходной линии HeLa и $\Delta ZMYND17$ (по 100 мкг) солибилизировали дигитонином, осветленные лизаты разделяли на 4–10%-ном Blue-Native ПААГ. *а* – Окрашивание на активность НАДН-дегидрогеназы (CI), стрелками обозначены суперкомплексы различной стехиометрии. Представлен результат типичного эксперимента. *б* – Количественная оценка распределения активности CI по суперкомплексам различного стехиометрического состава. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам трёх независимых экспериментов. *в* – Анализ активности АТФ-синтазы в геле после Blue-Native-электрофореза. F₀F₁ – АТФ-синтаза, F₁ – матриксный домен фермента

вать субъединичный состав АТФ-синтазы в митохондриях из клеток исходной линии HeLa и линии с делецией в гене *ZMYND17*. Оказалось, что в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ количество полного F_0F_1 -фермента снижено относительно такового в митохондриях дикого типа, в то время как существенно увеличено количество свободной F_1 -субъединицы.

Биоинформатический анализ эволюции белков Mss51p и ZMYND17. Белок Mss51p *S. cerevisiae*, предположительно, является ортологом белка ZMYND17 человека [24], однако подробное изучение эволюционного происхождения этих белков не проводилось. Мы решили проследить эволюцию этих полипептидов с помощью методов биоинформатики. Глобальное парное выравнивание с использованием алгоритма Needleman-Wunsch первичных структур дрожжевого белка Mss51p (NCBI RefSeq: NP_013304.1) и белка ZMYND17 человека (NCBI RefSeq: NP_001019764.1) показало, что они имеют всего 19% идентичных аминокислот (94/504). Белок Mss51p содержит одноименный домен, а ZMYND17 – домен zf-MYND, относящиеся к суперсемейству TRASH (Pfam ID: CL0175). Суперсемейство объединяет домены, содержащие консервативные остатки цистеина, включая домены типа «цинковый палец», в том числе zf-Mss51 (Pfam ID: PF13824) и zf-MYND (Pfam ID: PF01753). В ходе биоинформатического анализа, проведенного с использованием алгоритмов BLAST на сайте NCBI и веб-сервиса HMMER (<http://hmmer.org>), белки, гомологичные дрожжевому Mss51p и ZMYND17 человека, были найдены в транслированных геномах представителей всех супергрупп эукариот (Archaeplastida, Excavata, «SAR», Unikonta), что может указывать на то, что последний общий предок эукариот также имел белок, гомологичный исследуемым.

Далее внимание было сосредоточено на супергруппе Unikonta, а именно на группе Obazoa, объединяющей таксоны Breviatea, Apusomonadida и Opisthokonta, к последнему из которых относятся и *S. cerevisiae*, и *Homo sapiens*. Белки, гомологичные Mss51p и ZMYND17, были найдены в транслированных геномах различных представителей группы Opisthokonta и транслированном геноме одного представителя Apusomonadida – *Thecamonas trahens*. На основании анализа этих белковых последовательностей был восстановлен предположительный сценарий эволюции данных белков. Для этого были выбраны 24 последовательности гомологичных белков, принадлежащих представителям различных групп царства Грибов, а также представителям таксона Apusomonadida (*Thecamonas*

trahens) и таксона Ichthyosporea (*Sphaeroforma arctica*) и представителю Choanoflagellata (*Monosiga brevicollis*). При помощи алгоритма Mafft было получено множественное выравнивание отобранных последовательностей. На рис. 4, а представлено дерево гомологичных белков, построенное методом Maximum likelihood в программе MEGA 7.0.21, укорененное в среднюю точку и визуализированное при помощи сервиса iTOL.

На рис. 4, б схематично изображена эволюционная история белков, гомологичных Mss51p и ZMYND17 (слева), а также доменная архитектура белков, характерная для различных групп (справа). Вероятно, белок общего предка групп Apusomonadida и Opisthokonta имел 2 домена zf-Mynd (на рис. 4, б обозначены черными овалами). Основываясь на анализе последовательностей одного белка *Sphaeroforma arctica*, представителя Ichthyosporea, и одного белка *Monosiga brevicollis*, представителя Choanoflagellata (единственные найденные белки из этих групп, гомологичные исследуемым), можно предположить, что в рано дивергировавших ветвях клады Holozoa гомологичные исследуемым белки сохраняют также 2 домена zf-Mynd. Далее в процессе эволюции один из доменов zf-Mynd был потерян, причём точно установить, какой из zf-Mynd-доменов утерян в ходе нашего анализа не удалось.

Таким образом, согласно результатам нашего исследования, можно предположить, что белки ZMYND17 человека и Mss51p *S. cerevisiae* действительно имеют общее эволюционное происхождение, однако нетривиальную эволюционную историю, включающую дубликацию гена предкового белка с последующей редукцией одной из его копий и различные перестройки доменных архитектур. Таким образом, ортологичные белки ZMYND17 и Mss51p имеют различные функциональные домены и, по всей видимости, выполняют различные функции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биосинтез белка в митохондриях, несмотря на очевидное сходство с бактериальной трансляцией, имеет ряд уникальных особенностей, возникших в ходе эволюции эукариот. К таким особенностям можно отнести отличия в белковом составе митохондриальных рибосом, изменения в структуре рРНК, неканонические функции факторов инициации трансляции и другие [2, 34]. По всей видимости, такие эволюционные изменения обусловлены не только переносом множества генов митохондриальных белков в ядро и заменой некоторых функций

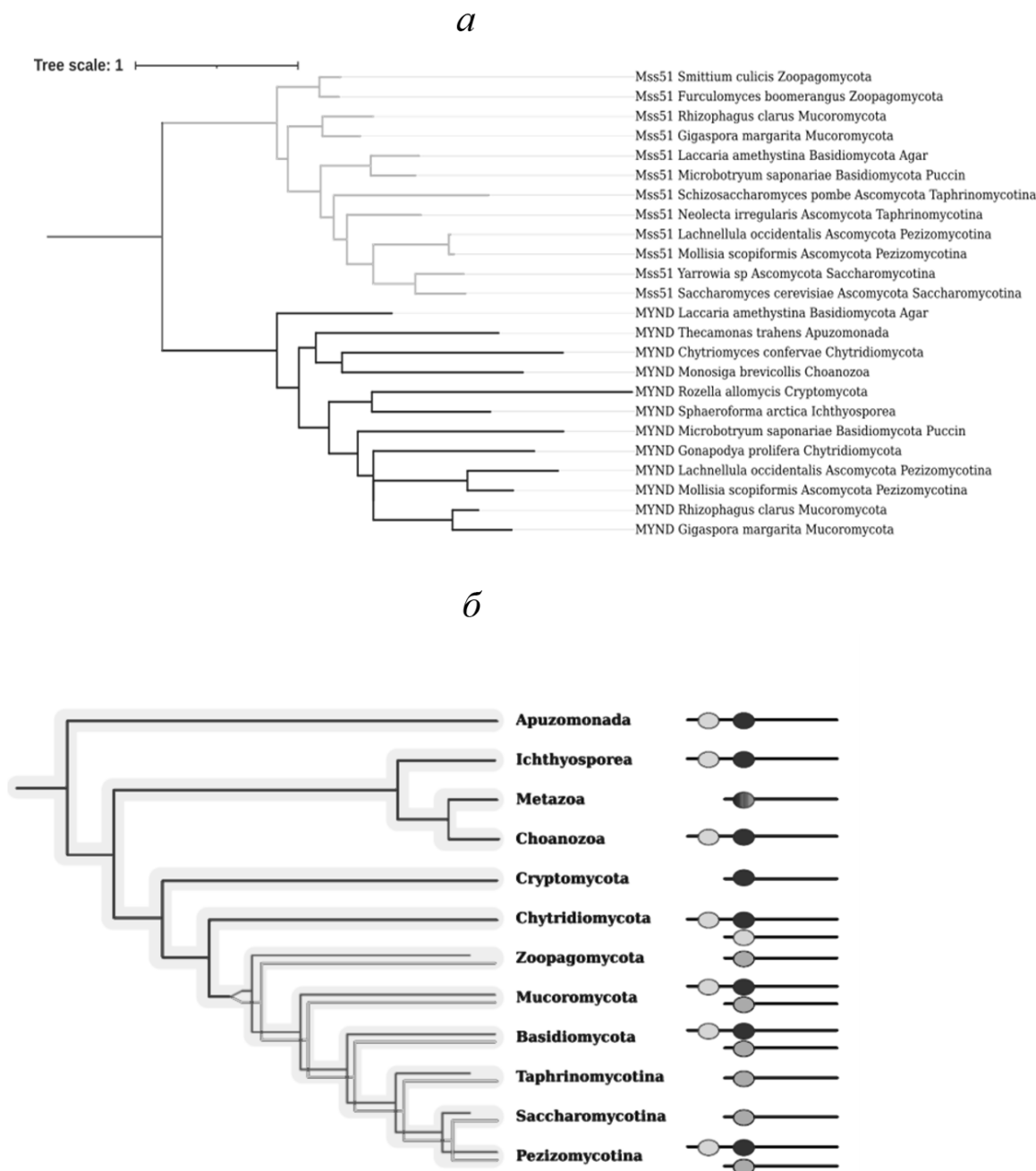


Рис. 4. Биоинформатический анализ белков гомологичных Mss51p и ZMYND17. *a* – Дерево гомологичных белков. Клада, объединяющая белки, содержащие домен Mss51, выделена светло-серым; белки, содержащие домен zf-MYND – черным, точка укоренения – серым. *б* – Схема эволюционной истории гомологичных Mss51p и ZMYND17 белков. Чёрные ветви – ген архаичного белка, не претерпевший дупликации. Серая и светло-серая ветви – две независимые копии гена, возникшие в результате дупликации. Чёрные и светло-серые овалы – домены zf-Mynd, серые овалы – домены zf-Mss51. На дереве выделяются две клады: клада белков, содержащих домен zf-Mss51 (включает и дрожжевой белок Mss51p), и клада белков, содержащих домен zf-Mynd. Первая клада включает только белки представителей царства грибов, во время как во второй кладе присутствуют как белки грибов, так и видов других групп. Такая топология дерева гомологичных белков говорит о дупликации гена предкового белка, произошедшей внутри клады грибов после дивергенции с группой Holozoa

митохондриальных рРНК синтезируемыми в цитозоле белками, но и необходимостью строгой взаимокоординации митохондриальной трансляции с синтезом и импортом в митохонд-

рии кодируемых в ядре белков митохондрий. Для осуществления такой координации у дрожжей *S. cerevisiae* имеется система трансляционных активаторов, которые представляют собой

группу белков, регулирующих трансляцию отдельных митохондриальных мРНК [7, 35].

Особенностью митохондриального биосинтеза белка у млекопитающих является отсутствие 5'-НТО у митохондриальных мРНК. Исходя из этого факта, предполагалось, что системы, подобной трансляционным активаторам дрожжей, у млекопитающих существовать не может, поскольку регуляция биосинтеза белка в митохондриях *S. cerevisiae* в значительной степени обусловлена взаимодействиями с 5'-НТО мРНК. Однако в митохондриях человека был выявлен белок TACO1, являющийся активатором трансляции мРНК COI. Механизм его действия пока не изучен, однако достоверно показано его влияние именно на процесс трансляции отдельной мРНК [21]. Помимо этого, у человека найден ортолог дрожжевого Mss51p, белок ZMYND17 [24]. В ряде работ, посвящённых его изучению, были получены противоречивые данные. Согласно одним авторам, подавление кодирующего его гена приводило к увеличению клеточного АТФ и повышению скорости метаболизма глюкозы [25]. В то же время данные других исследователей показывают, что делеция этого гена, напротив, приводит к снижению эффективности метаболизма глюкозы, изменению морфологии митохондрий и увеличению резистентности к инсулину [26].

Основываясь на перечисленных фактах, мы решили выяснить, участвует ли ортолог Mss51p белок ZMYND17 в регуляции трансляции в митохондриях клеток человека. Для этого мы провели функциональную делецию гена *ZMYND17*, внося с помощью системы CRISPR/Cas9 делецию в первый кодирующий экзон. Получив такую линию клеток с делецией, мы проанализировали эффективность трансляции отдельных мРНК в митохондриях. Как оказалось, отсутствие белка ZMYND17 не повлияло на эффективность биосинтеза белка в митохондриях. После этого мы проанализировали функциональность митохондрий в линии клеток с делецией, измерив скорость потребления кислорода, а также активности цитохром *c*-оксидазы, НАДН-дегидрогеназы и АТФ-синтазы. Согласно полученным нами данным, в митохондриях клеток с делецией *ZMYND17* отмечено снижение активности цитохром *c*-оксидазы на ~25% относительно клеток исходной линии HeLa. Причём такое снижение не сказывается на базальном уровне потребления клетками кислорода, однако проявляется при разобщении работы электрон-транспортной цепи и электрохимического градиента. Наши данные хорошо согласуются с результатами работы Fujita et al. [26] и указывают на то, что ZMYND17 не является ре-

гулятором трансляции, однако тем или иным образом участвует в регуляции метаболической активности митохондрий. Ещё одним интересным результатом стало исследование активности АТФ-синтазы в геле. Оказалось, что при делеции гена *ZMYND17* в митохондриях снижается количество F_0F_1 -фермента и накапливается свободная F_1 -субъединица. Подобный эффект нередко наблюдается при нарушении баланса синтеза митохондриально и ядерно закодированных белков, например, при делеции третьего фактора инициации трансляции [29]. Логично предположить, что увеличение количества свободной F_1 -субъединицы приведёт к усилению гидролиза этим ферментом АТФ. Это может привести к компенсационному увеличению синтеза АТФ полноразмерной F_0F_1 -АТФ-синтазой, что позволит снизить эффект ингибирования электрон-транспортной цепи высоким трансмембранным потенциалом. Последнее, в свою очередь, должно приводить к увеличению скорости поглощения кислорода, что не подтверждается полученными нами данными (рис. 2, а). Вероятно, отсутствие увеличения скорости потребления кислорода обусловлено тем, что, помимо накопления свободной F_1 -субъединицы, наблюдается и снижение количества полноразмерного F_0F_1 -фермента. Это может приводить к недостаточности активности АТФ-синтазы для снижения трансмембранного потенциала.

Наконец, мы решили изучить эволюционную историю Mss51p и ZMYND17, чтобы попытаться выяснить, почему продукты ортологичных генов выполняют, очевидно, различные функции. Согласно полученным нами результатам, исследуемые белки имеют общее эволюционное происхождение, однако нетривиальную эволюционную историю, включающую дубликацию гена предкового белка с последующей редукцией одной из его копий и различные перестройки доменных архитектур. Таким образом, полученные нами данные однозначно указывают на различие функций Mss51p и ZMYND17 в митохондриях дрожжей и человека соответственно. По всей видимости, ZMYND17 является своего рода метаболическим регулятором митохондрий, однако механизм его действия нуждается в дальнейшем изучении.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-07002) (практическая часть), а также в рамках государственного задания МГУ, тема 24-2-21 (биоинформационная часть).

Благодарности. Работа частично выполнена на научном оборудовании, закупленном в рамках реализации Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы статьи – участники коллектива Научно-образовательной школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lazcano, A., and Peretó, J. (2021) Prokaryotic symbiotic consortia and the origin of nucleated cells: a critical review of Lynn Margulis hypothesis, *BioSystems*, **204**, doi: 10.1016/j.biosystems.2021.104408.
- Levitskii, S. A., Baleva, M. V., Chicherin, I. V., Krashennnikov, I. A., and Kamenski, P. A. (2020) Protein biosynthesis in mitochondria: past simple, present perfect, future indefinite, *Biochem.*, **85**, 257-263, doi: 10.1134/S0006297920030013.
- Kuzmenko, A. V., Levitskii, S. A., Vinogradova, E. N., Atkinson, G. C., Hauryliuk, V., et al. (2013) Protein biosynthesis in mitochondria, *Biochemistry*, **78**, 855-866.
- Al-Faresi, R. A. Z., Lightowlers, R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A. (2019) Mammalian mitochondrial translation-revealing consequences of divergent evolution, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 1429-1436, doi: 10.1042/BST20190265.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **440**, 325-331, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01467-7.
- Lipinski, K. A., Kaniak-Golik, A., and Golik, P. (2010) Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome – from genetics to evolution and systems biology, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1086-1098, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.12.019.
- Derbikova, K. S., Levitsky, S. A., Chicherin, I. V., Vinogradova, E. N., and Kamenski, P. A. (2018) Activation of yeast mitochondrial translation: who is in charge? *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 87-97, doi: 10.1134/S0006297918020013.
- Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A. E., Pérez-Martínez, X. (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast, *RNA Biol.*, **11**, 953-967, doi: 10.4161/rna.29780.
- Manthey, G. M., and McEwen, J. E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, **14**, 4031-4043, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00074.x.
- Hillman, G. A., and Henry, M. F. (2019) The yeast protein Mam33 functions in the assembly of the mitochondrial ribosome, *J. Biol. Chem.*, **294**, 9813-9829, doi: 10.1074/jbc.RA119.008476.
- De Silva, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., et al. (2017) The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6628-6643, doi: 10.1093/nar/gkx426.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p, *EMBO J.*, **22**, 5951-5961, doi: 10.1093/emboj/cdg566.
- Perez-Martinez, X., Butler, C. A., Shingu-Vazquez, M., and Fox, T. D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4371-4380, doi: 10.1091/mbc.E09-06-0522.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Myers, R. S., Hamel, P., and Barrientos, A. (2012) A heme-sensing mechanism in the translational regulation of mitochondrial cytochrome *c* oxidase biogenesis, *Cell Metab.*, **16**, 801-813, doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.018.
- Khalimonchuk, O., Bestwick, M., Meunier, B., Watts, T. C., and Winge, D. R. (2010) Formation of the redox cofactor centers during cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 1004-1017, doi: 10.1128/mcb.00640-09.
- Scheffler, I. E. (2007) *Mitochondria: Second Edition*, John Wiley and Sons, doi: 10.1002/9780470191774.
- Gissi, C., Iannelli, F., and Pesole, G. (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species, *Heredity (Edinb.)*, **101**, 301-320, doi: 10.1038/hdy.2008.62.
- Christian, B. E., Spremulli, L. L. (2010) Preferential selection of the 5'-terminal start codon on leaderless mRNAs by mammalian mitochondrial ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **285**, 28379-28386, doi: 10.1074/jbc.M110.149054.
- Kummer, E., Leibundgut, M., Rackham, O., Lee, R. G., Boehringer, D., et al. (2018) Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM, *Nature*, **560**, 263-267, doi: 10.1038/s41586-018-0373-y.
- Jones, C. N., Wilkinson, K. A., Hung, K. T., Weeks, K. M., and Spremulli, L. L. (2008) Lack of secondary structure characterizes the 5'-ends of mammalian mitochondrial mRNAs, *RNA*, **14**, 862-871, doi: 10.1261/rna.909208.
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., et al. (2009) Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome *c* oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome, *Nat. Genet.*, **41**, 833-837, doi: 10.1038/ng.390.
- Richman, T. R., Spahr, H., Ermer, J. A., Davies, S. M. K., Viola, H. M., et al. (2016) Loss of the RNA-binding protein TACO1 causes late-onset mitochondrial dysfunction in mice, *Nat. Commun.*, **7**, doi: 10.1038/ncomms11884.
- Sferruzza, G., Del Bondio, A., Citterio, A., Vezzulli, P., Guerrieri, S., et al. (2021) U-fiber leukoencephalopathy due to a novel mutation in the TACO1 gene, *Neurol. Genet.*, **7**, e573, doi: 10.1212/nxg.0000000000000573.
- Szklarczyk, R., Wanschers, B. F. J., Cuyper, T. D., Esseling, J. J., Riemersma, M., et al. (2012) Iterative orthology prediction uncovers new mitochondrial proteins and identifies C12orf62 as the human ortholog of COX14, a protein involved in the assembly of cytochrome *c* oxidase, *Genome Biol.*, **13**, R12, doi: 10.1186/gb-2012-13-2-r12.
- Moyer, A. L., and Wagner, K. R. (2015) Mammalian Mss51 is a skeletal muscle-specific gene modulating cellular metabolism, *J. Neuromuscul. Dis.*, **2**, 371-385, doi: 10.3233/JND-150119.
- Fujita, R., Yoshioka, K., Seko, D., Suematsu, T., Mitsuhashi, S., et al. (2018) Zmynd17 controls muscle

- mitochondrial quality and whole-body metabolism, *FASEB J.*, **32**, 5012-5025, doi: 10.1096/fj.201701264R.
27. Rovira Gonzalez, Y. I., Moyer, A. L., LeTexier, N. J., Bratti, A. D., Feng, S., et al. (2019) Mss51 deletion enhances muscle metabolism and glucose homeostasis in mice, *JCI Insight*, **4**, e122247, doi: 10.1172/jci.insight.122247.
 28. Rovira Gonzalez, Y. I., Moyer, A. L., LeTexier, N. J., Bratti, A. D., Feng, S., et al. (2021) Mss51 deletion increases endurance and ameliorates histopathology in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy, *FASEB J.*, **35**, e21276, doi: 10.1096/fj.202002106RR.
 29. Chicherin, I. V., Baleva, M. V., Levitskii, S. A., Dashinimaev, E. B., Krashennikov, I. A., and Kamenski, P. (2020) Initiation Factor 3 is dispensable for mitochondrial translation in cultured human cells, *Sci. Rep.*, **10**, doi: 10.1038/s41598-020-64139-5.
 30. Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., et al. (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 686-688, doi: 10.1038/nbt.2650.
 31. Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE, *Nat. Protoc.*, **1**, 418-428, doi: 10.1038/nprot.2006.62.
 32. Jha, P., Wang, X., Auwerx, J. (2016) Analysis of mitochondrial respiratory chain supercomplexes using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), in *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1-14, doi: 10.1002/9780470942390.mo150182.
 33. Schafer, 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.
 34. Kuzmenko, A., Atkinson, G. C., Levitskii, S., Zenkin, N., Tenson, T., et al. (2014) Mitochondrial translation initiation machinery: conservation and diversification, *Biochimie*, **100**, 132-140, doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.024.
 35. Herrmann, J. M., Woellhaf, M. W., and Bonnefoy, N. (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 286-294, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.007.

YEAST TRANSLATIONAL ACTIVATOR Mss51p AND HUMAN ZMYND17 – TWO PROTEINS WITH A COMMON ORIGIN, BUT DIFFERENT FUNCTIONS

M. V. Baleva, U. Piunova, I. Chicherin, D. Krasavina, S. Levitskii*, and P. Kamenski

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Department of Molecular Biology,
119234 Moscow, Russia; E-mail: sergey.levitskii@yandex.ru*

Despite the similarity with protein biosynthesis in bacteria, translation in the mitochondria of modern eukaryotes has several unique features. One of these features is the necessity to coordinate translation of individual mitochondrial mRNAs encoding subunits of complexes of the oxidative phosphorylation chain with translation of other components of these complexes in the cytosol. In the mitochondria of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this coordination is carried out through a system of translational activators, proteins that predominantly interact with the 5'-untranslated regions of mitochondrial mRNAs. No such system has been found in human mitochondria, although one translational activator, TACO1, has been identified. In this work, we studied the effect of deletion of the *ZMYND17* gene, an ortholog of the yeast translational activator Mss51p, on mitochondrial translation in human cells. We demonstrated that deletion of *ZMYND17* does not affect translation in mitochondria but leads to decrease in the activity of cytochrome *c* oxidase and increase in the amount of free F1 subunit of ATP synthase. In addition, we studied the evolutionary history of Mss51p and *ZMYND17* and identified a pathway for the divergence of functions of these orthologous proteins.

Keywords: mitochondria, translation, translational activators, translation regulation