

УДК 577.151.62

## МУТАЦИИ В СУБЪЕДИНИЦЕ *Cox12* ДРОЖЖЕЙ СНИЖАЮТ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА IV

© 2022 S. Das, S. Mukherjee, M. Bedi, A. Ghosh\*

Department of Biochemistry, University of Calcutta, 35 Ballygunge Circular Road,  
Pin-700019, Kolkata, India; e-mail: alok.caluni@gmail.com

Поступила в редакцию 11.04.2021

После доработки 25.10.2021

Принята к публикации 21.11.2021

Цитохром *c*-оксидаза 6В1 (COX6В1) является одной из наименее изученных субъединиц комплекса IV (CIV) митохондриальной электрон-транспортной цепи. В настоящей работе мы изучали патобиохимические и респираторные функции *Cox12* (дрожжевой ортолог COX6В1 человека) с использованием клеток *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*cox12Δ*), дефицитных по белку *Cox12*. Эти клетки показывали серьёзные затруднения в росте в аэробной (дыхательной) среде, содержащей глицерин и этанол, которые можно было восстановить путём комплементации с генами *COX12* дрожжей или *COX6В1* человека. *Cox12* с остатком аргинина 17, замещённым гистидином (R17H) или цистеином (R17C) (мутации, аналогичные тем, которые наблюдаются у людей), не вызывал восполнение утраченной функции *Cox12*. Когда клетки *cox12Δ* выращивали в богатой дыхательной/ферментативной среде галактозы, изменений в экспрессии субъединиц дыхательной цепи не наблюдалось. Анализ с помощью метода голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле с последующим вестерн-блоттингом с использованием антител против Rip1 и *Cox1*, которые являются специфическими компонентами комплексов III (CIII) и IV (CIV) соответственно, не выявил заметного снижения содержания нативных суперкомплексов (SC) CIII<sub>2</sub>CIV<sub>2</sub> и CIII<sub>2</sub>CIV<sub>1</sub>. Однако ассоциация фактора 2 респираторного суперкомплекса Rcf2 и субъединицы *Cox2* с SC в клетках *cox12Δ* понижалась, а специфическая активность CIV снижалась на 90%. Как базальное дыхание, так и стимулированное сукцинатом/АДФ дыхание в состоянии 3, а также мембранный потенциал митохондрий в клетках *cox12Δ* были понижены. Кроме того, клетки *cox12Δ* и клетки, синтезирующие мутантные формы белка *Cox12* (R17H и R17C), показывали большую чувствительность к окислительному стрессу, индуцированному H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, по сравнению с клетками дикого типа (WT). Моделирование *in silico* структуры SC дрожжей WT показало, что *Cox12* формирует сеть взаимодействий с Rcf2 и *Cox2*. В целом полученные нами результаты говорят о том, что *Cox12* необходим для проявления активности CIV.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** цитохром *c*-оксидаза 6В1, *Cox12*, комплекс IV, суперкомплексы.

**DOI:** 10.31857/S0320972522010031

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохром *c*-оксидаза (COX, EC 1.9.3.1) или комплекс IV (CIV) митохондриальной электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) переносит электроны от восстановленного ферроцитохрома *c* к молекулярному кислороду. Комплекс IV, который локализован на внутренней мембране митохондрий, является консервативным белковым комплексом, присутствующим у всех био-

логических видов — от одноклеточных пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* до человека. CIV млекопитающих состоит из 14 различных субъединиц [1, 2], 3 из которых кодируются митохондриальной ДНК: большие каталитические субъединицы COX1 и COX2, содержащие все окислительно-восстановительные центры, и субъединица COX3, которая участвует в формировании внутреннего ядра. Эти субъединицы собираются в холокомплекс CIV, образуя 3 модуля вместе с 11 меньшими субъединицами (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C, COX8A и NDUFA4), которые кодируются ядерной ДНК [3–7]. Биогенез CIV начинается с субъединицы COX1 (субкомплекс 1), к которой присоединяются COX4 и COX5A, в результате чего образуется субкомплекс 2. Затем модуль COX2 (COX2, COX5B, COX6C, COX7B, COX7C и COX8A) и модуль COX3 (COX3, COX6A, COX6B и COX7A) присоединяются к модулю COX1, в результате

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; VN-ПААГ — голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; СССР — карбонилсцианид-*m*-хлорфенилгидразон, разобщитель; COX — цитохром *c*-оксидаза; NAC — N-ацетилцистеин; OCR — скорость поглощения кислорода; R17H и R17C — мутантные формы гена *COX12HA*, кодирующие мутантные белки с заменами R17H или R17C; RFP — консервативный мотив Arg-Phe-Pro; SC — суперкомплекс; TMPD — N,N,N',N'-тетраметил-*p*-фенилендиамин; WT — дикий тип.

\* Адресат для корреспонденции.

чего образуется субкомплекс 3 [8, 9]. Наконец, NDUFA4 присоединяется к субкомплексу 3, чтобы продуцировать холофермент CIV (рис. S1 в Приложении) [7].

Далее CIV может взаимодействовать с другими комплексами ЭТЦ с образованием суперкомплексов (SC). Например, CIV может объединяться с комплексом I (CI) и димерным комплексом III (CIII<sub>2</sub>) с образованием суперкомплексов I + III<sub>2</sub> + IV<sub>2</sub> и I + III<sub>2</sub> + IV<sub>1</sub>. Дрожжи лишены CI и образуют суперкомплексы III<sub>2</sub> + IV<sub>1</sub> и III<sub>2</sub> + IV<sub>2</sub> [10–12].

Кодируемая ядерным геномом, субъединица COX6B встраивается в модуль COX3 на поздних этапах сборки CIV. COX6B содержит консервативный домен СНСН (coiled-coil helix coiled-coil helix) с редокс-активным и богатым остатками цистеина мотивом C<sub>x</sub><sub>9</sub>C<sub>x</sub><sub>n</sub>C<sub>x</sub><sub>10</sub>C, который способствует транслокации этого белка в митохондрии через пути Mia40-erv1 [13–16]. Другой консервативный мотив, Arg-Phe-Pro (RFP), располагается на N-концевом участке COX6B, но функция этого мотива пока неясна. Обнаружены две изоформы COX6B. COX6B1 присутствует практически во всех тканях за исключением опухолевых клеток семенников и поджелудочной железы, которые содержат COX6B2 [17].

COX6B1 является одной из шести субъединиц CIV. Мутации в этой субъединице были выявлены у пациентов с митохондриальными заболеваниями (MD). Мутации COX6B1 вызывают различные патофизиологические проявления, включая миопатию, тяжёлую детскую энцефаломиопатию, гидроцефалию и кардиомиопатию. Пациенты с такими мутациями часто умирают в раннем возрасте из-за отсутствия активности COX. Так, были идентифицированы 3 мутации COX6B: R20H, R20C и T81P. Интересно, что R20 является частью мотива RFP [18–20]. Дефекты CIV, вызванные мутациями в структурных субъединицах или факторах сборки, представляют собой второй по частоте тип наследственных MD после дефектов CI [21–24]. Кроме того, значение COX6B1 подчёркивается тем фактом, что сверхэкспрессия COX6B1 оказывает защитное действие при вызванном ишемией/реперфузией (I/R) повреждении нейронов и окислительном стрессе, опосредованном активными формами кислорода (АФК) в кардиомиоцитах крысы [25]. Активная регуляция COX6B1 и повышенная доля высокомолекулярных SC наблюдалась в печени животных, подвергшихся ограничению калорийности. В то же время сверхэкспрессия COX6B1 в культуре клеток 3T3 способствовала выживанию этих клеток, что позволяет предположить, что COX6B1

вносит вклад в антивозрастные эффекты ограничения калорийности [14].

Основные сведения о биохимической роли COX6B1 были получены при изучении дрожжей *S. cerevisiae*. Клетки дрожжей – удобный объект для проведения генетических манипуляций. Кроме того, дрожжи с дефектной дыхательной цепью могут расти на ферментативных источниках углерода. Белок COX6B1 человека и его дрожжевой ортолог Cox12 демонстрируют идентичность последовательностей более чем на 42%. Делеция Cox12 ассоциируется со снижением содержания цитохрома *a*+*a*<sub>3</sub>. В результате эти клетки не могут расти в аэробной дыхательной среде [26]. Ранее мы продемонстрировали, что функции Coa6 – фактора сборки CIV, который также содержит мотив C<sub>x</sub><sub>9</sub>C<sub>x</sub><sub>n</sub>C<sub>x</sub><sub>10</sub>C, перекрываются с функциями Cox12 дрожжей [27, 28]. Клетки *coa6Δ* и *cox12Δ* не показывали ограниченный рост в аэробной/ферментационной среде, содержащей галактозу, при 30 °C. Клетки *coa6Δ cox12Δ* (с двойным нокаутом) не могли расти в тех же условиях из-за отсутствия субъединицы Cox2, и этот фенотип не мог быть спасён при добавлении в среду экзогенной меди (в отличие от клеток *coa6Δ*) [27]. Было показано, что Cox12 присоединяется к модулю Cox3 на поздних стадиях сборки комплекса, а фактор 2 (Rcf2) дыхательного SC обеспечивает встраивание и стабильность Cox12 во время сборки модуля Cox3 [29–31]. Модули Cox1 и Cox2, которые содержат весь каталитический гем *a*+*a*<sub>3</sub> и центры меди, собираются до присоединения Cox12 к комплексу IV. До сих пор остаётся неясным, как мутации в Cox12 изменяют дыхательную активность и процесс сборки CIV. В настоящей работе мы использовали клетки *S. cerevisiae cox12Δ*, чтобы изучить биохимическую и физиологическую роль Cox12 в биогенезе и активности CIV.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штаммы дрожжей, культивирование клеток и плазмиды.** Клетки *S. cerevisiae* дикого типа (WT) BY4741 (*Mat-a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*; лабораторные штаммы, полученные из штамма S288C) и клетки *cox12Δ* (*Mat-a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR038C::kanMX4*) («Invitrogen», США) культивировали и поддерживали в среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% декстрозы) при 30 °C. Делеция гена *cox12Δ* была подтверждена проведением ПЦР колонии клеток (табл. S1 в Приложении); *coa6Δ*, *sco1Δ* и клетки *pet117Δ* с известными дефектами CIV («Invitrogen») были использованы

в качестве отрицательных контролей [28]. Для проверки восстановления роста клеток в среду YPD и YPGE добавляли 25 мМ N-ацетилцистеин (NAC).

Клетки дрожжей культивировали в среде YPD, затем их инокулировали в среду YPD, YPGal (2% галактозы) или YPGE (3% глицерина + 1% этанола). Чашки со средами YPD, YPGal и YPGE были приготовлены с добавлением 2% агара. Для проведения измерений роста клеток на чашки со средами YPD, YPGal или YPGE наносили последовательные десятикратные разведения ночных культур, и их инкубировали при 30 °С и 37 °С в течение определенных периодов времени. Рост дрожжей в жидкой среде измеряли спектрофотометрически при 600 нм. Плазмиду pRS416 с низким числом копий («Addgene», США) использовали для клонирования гена *COX6B1* человека, дрожжевого *COX12* и гена *COX12*, меченного C-концевым гемагглютинином (HA), под контролем промотора *GPD* с использованием специфических праймеров (табл. 1). Конструкцию дрожжевого *COX12HA* использовали в качестве матрицы для проведения сайт-направленного мутагенеза («Agilent Technologies QuikChange Lightning», США) для создания точечных мутантов R17C и R17H с использованием праймеров, указанных в табл. 1.

Все конструкции были подтверждены секвенированием ДНК. Дрожжевые клетки, трансформированные с помощью плазмиды pRS416-GPD, культивировали в средах без урацила (-URA): SCD (2% декстрозы) и SCGE (3% глицерина + 1% этанола).

**Получение митохондриальной и цитозольной фракций.** Клетки дрожжей (1 г), выращенные до достижения поздней лаг-фазы, использовали для получения митохондриальной и цитозольной фракций. Митохондрии выделяли, как

описано ранее [32]. Для приготовления цитозольной фракции дрожжевые клетки обрабатывали Zymolyase 20T («US Biological», США) и гомогенизировали во льду в буфере, содержащем 0,6 М сорбитол, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА и 1 мМ PMSF. Обломки клеток удаляли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин при 4 °С. Супернатант осветляли с помощью ультрацентрифугирования при 150 000 g в течение 1 ч при 4 °С. К митохондриальной и цитозольной фракциям добавляли смесь ингибиторов протеаз («Roche cOmplete», Германия), и полученные препараты хранили при -80 °С. Концентрацию белка определяли с помощью наборов BCA assay kit («Thermo Scientific», США).

**SDS-ПААГ, голубой нативный ПААГ и иммуноблоттинг.** Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) и голубой нативный ПААГ (BN-ПААГ) проводили для разделения денатурированных и нативных белковых комплексов соответственно [33]. Для SDS-ПААГ лизаты митохондрий (5–10 мкг) разделяли в 15%-ном Tris-глициновом геле. Для BN-ПААГ 20 мкг митохондриальных белков солибилизировали в буфере, содержащем 50 мМ имидазол (pH 7,2), 500 мМ 6-аминогексановую кислоту, 1 мМ ЭДТА, 1× cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail («Roche») и 2% дигитонина, в течение 20 мин при 4 °С и центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин при 4 °С. Перед нанесением белков на нативный 3–13% Bis-Tris градиентный гель в супернатант добавляли краситель Кумасси голубой G-250 (0,01%). Для проведения иммуноокрашивания разделённые белки переносили на PVDF-мембрану и зондировали следующими антителами: анти-Cox1 (1 : 1000; «Abcam», Великобритания); анти-Cox2 (1 : 10 000; «Abcam»); анти-Cox3 (1 : 5000; «Abcam»); анти-Cox4 (1 : 1500; «Abcam»); анти-

Таблица 1. Праймеры, использованные в данной работе

| Праймер                                    | Последовательность (5'→3')                                   |
|--|--|
| pRS416-GPD- <i>COX12</i> прямой (EcoRI)    | TAC CCG <b>GAATTC</b> CGG ATG GCT GAT CAA GAA AAC TCT CCA CT |
| pRS416-GPD- <i>COX12HA</i> обратный (XhoI) | AGA CCG <b>CTCGAG</b> CGG TTA CGC ATA GTC AGG AAC ATC GTA TG |
| pRS416-GPD- <i>COX6B1</i> прямой (EcoRI)   | CTG CCG <b>GAATTC</b> CGG ATG GCG GAA GAC ATG GAG ACC AAA AT |
| pRS416-GPD- <i>COX6B1</i> обратный (XhoI)  | AGA CCG <b>CTCGAG</b> CGG TTA TCA GAT CTT CCC GGG AAA CGT    |
| Cox12 R20H прямой                          | ACA GTT GGT TTC GAT GCT <b>CAC</b> TTT CCC CAA AAC CAA       |
| Cox12 R20H обратный                        | TTG GTT TTG GGG AAA <b>GTG</b> AGC ATC GAA ACC AAC TGT       |
| Cox12 R20C прямой                          | ACA GTT GGT TTC GAT GCT <b>TGC</b> TTT CCC CAA AAC CAA       |
| Cox12 R20C обратный                        | TTG GTT TTG GGG AAA <b>GCA</b> AGC ATC GAA ACC AAC TGT       |

Cox12 (1 : 1500; любезно предоставлены сотрудниками лаборатории доктора С. Мейсингера); анти-CoaB (1 : 1500) и анти-Rip1 (1 : 300 000) (любезно предоставлены сотрудниками лаборатории доктора В. Зара); анти-Rcf1 (1 : 1000) и анти-Rcf2 (1 : 1500) (любезно предоставлены сотрудниками лаборатории доктора М. Отта); анти-Vdac1 (1 : 10 000; «Abscam») и анти-Pgk1 (1 : 5000; «Abscam»). Мембраны инкубировали со вторичными антителами в разведении 1 : 5000 в течение 1 ч при комнатной температуре и производили окрашивание с использованием реагентов Clarity Western-ECL («Bio-Rad», США) или Super Signal West Femto («Thermo Scientific»). Все изображения гелей были получены с помощью системы «Bio-Rad Chemidoc», США.

**Определение активности в геле.** Нативные белковые комплексы разделяли с помощью чистого нативного электрофореза в ПААГ (CN-ПААГ), после чего проводили определение активности в геле комплекса V (CV) и объединённой активности CIII + CIV [33]. Белки мембраны митохондрий получали, как было описано выше перед проведением BN-ПААГ. После центрифугирования при 20 000 *g* в течение 30 мин при 4 °С собирали прозрачный супернатант, и перед нанесением на 3–13%-ный нативный Bis-Tris градиентный гель в него добавляли 10% глицерина. Для определения активности CIII + CIV гель окрашивали 25 мМ диаминобензидином (DAB), растворённым в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,2), в течение 1 ч. Далее добавляли 60 мкМ цитохрома *c* из сердца лошади и инкубировали ещё 30 мин до появления полос, окрашенных в коричневый цвет. Реакцию останавливали добавлением 50% метанола, содержащего 10% уксусной кислоты.

Для измерения АТФ-гидролизующей активности CV гель предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч в буфере, содержащем 35 мМ Tris-HCl (pH 8,3) и 270 мМ глицин. Затем гель переносили в буфер, содержащий 35 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 270 мМ глицин, 14 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,2% Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и 8 мМ АТФ, ещё на 1 ч. АТФ-гидролизующую активность определяли по появлению белого осадка фосфата свинца. Реакцию останавливали добавлением 50% метанола на 30 мин. Все изображения гелей получали с помощью системы «Bio-Rad Chemidoc».

**Спектрофотометрическое определение активности комплекса IV.** Активность CIV оценивали спектрофотометрически, отслеживая использование восстановленного цитохрома *c* при 550 нм [34]. Реакционная смесь (1 мл) содержала 50 мМ фосфата калия (pH 7,5) и 50 мкМ восстановленного цитохрома *c*. Реакцию запускали добавле-

нием 2–3 мкг митопластов и проводили в течение 5 мин. Чтобы рассчитать действительную активность CIV, из полученных данных вычитали скорость этой реакции в присутствии 100 мкМ азида натрия.

**Скорость поглощения кислорода.** Чтобы измерить дыхательную активность на уровне клетки, дрожжевые клетки выращивали в среде YPGal, собирали на поздней лаг-фазе ( $A_{600} = 8$ ) и ресуспендировали в свежей среде YPGal при концентрации 10<sup>8</sup> клеток/мл. Базальную скорость потребления кислорода (OCR) измеряли при 30 °С с помощью прибора Oxytherm («Hansatech», Великобритания), снабжённого электродом Кларка. Клетки, трансформированные пустым вектором pRS416-GPD или плазмидами, несущими гены *COX12HA*, *R17H* или *R17C* (*R17H* и *R17C* – мутантные формы гена *COX12HA*, кодирующие мутантные белки с заменами R17H или R17C), культивировали в среде SCD (-URA) до  $A_{600} = 8$  и ресуспендировали в свежей среде при концентрации 10<sup>8</sup> клеток/мл, чтобы определить базальное значение OCR при 30 °С. Дыхание блокировали через 4 мин измерений добавлением 1 мМ азида натрия (специфический ингибитор CIV). Среднее значение OCR (нмоль кислорода/мин на 10<sup>8</sup> клеток) оценивали по данным как минимум трёх независимых экспериментов. Исходный уровень и значения неспецифической OCR (после добавления азида натрия) были незначительными.

Чтобы измерить уровень митохондриального дыхания, свежесыведенные митохондрии ресуспендировали в 1 мл дыхательной среды, содержащей 0,6 М маннитол, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,2), 1 мМ ЭДТА и 10 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Для индукции дыхания использовали различные субстраты, специфичные к отдельным комплексам, такие как 10 мМ динатриевой соли янтарной кислоты (CII) или 12,5 мМ аскорбиновой кислоты + 1,4 мМ N,N,N',N'-тетраметил-*p*-фенилендиамин (TMPD) (CIV). Для индукции дыхательного состояния 3 добавляли АДФ (200 мкМ). Для блокировки митохондриального дыхания через 4 мин добавляли 1 мМ азида натрия. Максимальное значение дыхательной ёмкости определяли путём добавления 5 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона (СССР, разобщитель) в присутствии 10 мМ динатрий-сукцината + 200 мкМ АДФ (см. типичный график скорости для последовательности различных добавок на рисунках). В каждой серии определений концентрация митохондриального белка составляла 250–350 мкг/мл. Среднее значение OCR (нмоль кислорода/мин на мг митохондриального белка) оценивалось по данным как минимум трёх независимых экс-

периментов. Исходный уровень и значения неспецифической OCR были незначительными.

**Анализ чувствительности клеток к окислительному стрессу.** Клетки WT и *cox12Δ* выращивали до значения  $A_{600} = 3$  в среде, содержащей 2%-ную декстрозу, при 30 °C, и затем их обрабатывали 2,5 мМ перекисью водорода в течение 30 мин или использовали сразу. Приготовленные серии разведений клеточных культур в стерильной воде высевали в чашки с YPD. Снимки делали через каждые 2 дня. Клетки WT и *cox12Δ*, трансформированные плазмидой pRS416-GPD, содержащей гены *COX12HA*, *R17H* или *R17C*, выращивали в среде SCD (-URA) при 30 °C до  $A_{600} = 3$ , а затем обрабатывали 2,5 мМ перекисью водорода в течение 30 мин или же использовали сразу. Десятикратные серийные разведения клеток наносили на чашки со средой SCD (-URA), и клетки выращивали при 30 °C [35].

**Определение мембранного потенциала митохондрий.** Дрожжевые клетки выращивали в среде YPD до  $A_{600} = 3$  и затем инкубировали с 10 мкМ CCCP или без него в течение 30 мин при 30 °C. Далее клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Полученные осадки ресуспендировали в 500 мкл фосфатного солевого буфера (PBS) и трижды промывали в течение 5 мин при комнатной температуре. К 500 мкл клеточной суспензии в PBS добавляли специфичный к мембранам митохондрий флуоресцентный краситель DiOC<sub>6</sub> («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 20 нг/мл и инкубировали в течение 30 мин в темноте. Чтобы удалить избыток красителя, клетки осаждали и промывали 3 раза PBS. Клетки изучали с помощью флуоресцентной микроскопии («Olympus», Япония): возбуждение при 485 нм и эмиссия при 520 нм. Изображения анализировали с помощью программ FLUO VIEW («Olympus») и ImageJ («NIH»).

**Изучение белок-белковых взаимодействий с помощью программы PyMOL.** *In silico* моделирование проводили с использованием недавно опубликованных структур дрожжевых суперкомплексов III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> и III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>, полученных с помощью крио-ЭМ (PDB IDs: 6T0B и 6T15) [29]. Ионные взаимодействия Cox12 с другими субъединицами CIV были проанализированы с помощью программы PyMOL.

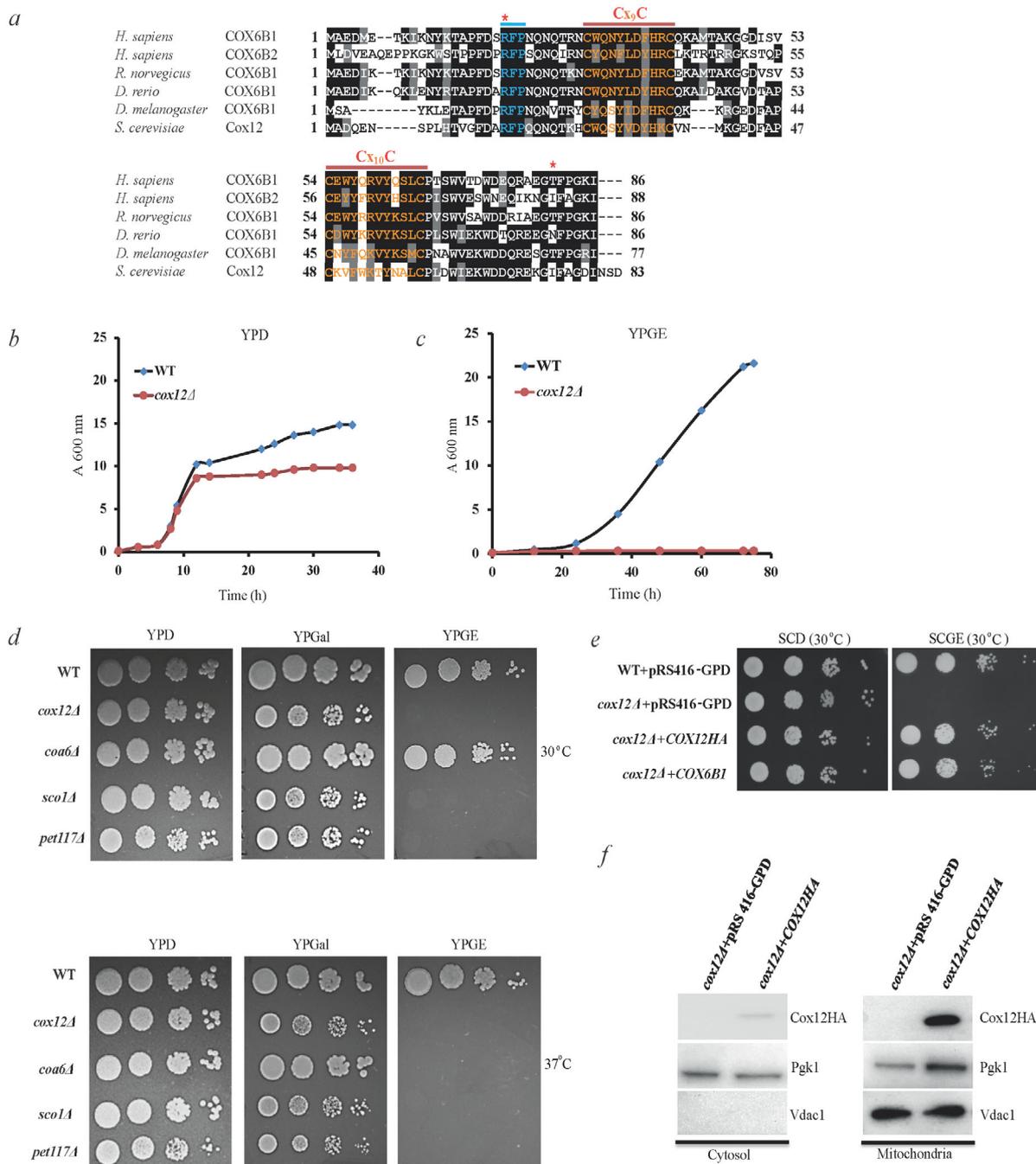
**Статистическая обработка данных.** Полученные результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Статистическую обработку данных (*t*-критерий Стьюдента) проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. \*  $p < 0,05$  и \*\*  $p < 0,001$  считались статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Cox12/COX6B1 необходим для роста дрожжей в аэробной среде.** Выравнивание аминокислотной последовательности белков COX6B человека, крысы, рыбок Данио, мух и дрожжей с использованием программы ClustalW показало, что COX6B является эволюционно консервативным белком. Cox12 дрожжей имеет более чем 42 и 37% идентичности последовательности с изоформами COX6B1 и COX6B2 соответственно (рис. 1, а).

Для определения биологической роли субъединицы COX6B1 в сборке митохондриального дыхательного комплекса мы использовали дрожжевые клетки WT и *cox12Δ S. cerevisiae*. Мы регистрировали рост этих клеток на различных источниках углерода при различных температурах, чтобы оценить эффективность их дыхания. Оба типа клеток выращивали в течение 2–3 дней в богатой ферментационной среде YPD, содержащей декстрозу, и в дыхательной среде YPGE, содержащей глицерин и этанол. Рост клеток WT и *cox12Δ* в среде YPD был сопоставим до 10 ч. После этого скорость роста клеток *cox12Δ* снижалась без перехода в двухфазный рост, что свидетельствует об отсутствии способности использовать этанол (конечный продукт ферментации), поскольку такая способность требует активную митохондриальную ЭТЦ (рис. 1, б). Как и ожидалось, клетки *cox12Δ* не росли в среде YPGE, что подтвердило наличие дефекта в дыхательной системе этих клеток (рис. 1, с). Мы также проанализировали рост клеток WT и *cox12Δ* на твердых средах YPD, YPGE и YPGal (т.е. средах с различными источниками углерода) при различных температурах. В качестве отрицательного контроля были использованы дрожжевые клетки с известными дефектами CIV (*coa6Δ*, *sco1Δ* и *pet117Δ*) (рис. 1, д) [28]. Как ожидалось, рост клеток *cox12Δ* на твердых средах YPD и YPGal был почти такой же, как рост клеток дикого типа, но был сильно понижен при культивировании в среде YPGE как при 30 °C, так и при 37 °C (рис. 1, д).

Далее мы трансформировали клетки *cox12Δ* генами *COX12HA* или *COX6B1* человека, клонированными в низкокопийную плазмиду pRS416 под контролем промотора *GPD* и определили способность этих генов восполнить недостаток респираторного роста в дыхательной среде SCGE с глицерином/этанолом. Оба гена, *COX12HA* и *COX6B1*, способствовали восстановлению дыхательного фенотипа клеток *cox12Δ* (рис. 1, е). Ген *COX12* дикого типа без гемагглютининового тэга также восстанавливал дыха-



**Рис. 1.** Клетки *cox12Δ* дрожжей показывают сниженный рост на аэробной дыхательной среде. *a* – Выравнивание последовательностей белка COX6B из различных видов (в клетках человека имеются 2 изоформы: COX6B1 и COX6B2). Горизонтальными линиями над последовательностью отмечены консервативные мотивы  $Cx_9$ ,  $Cx_n$ ,  $Cx_{10}$  и RFP. Звездочками показаны аминокислотные остатки, подвергающиеся мутациям у людей. *b–c* – При проведении анализа кривой роста клетки WT и *cox12Δ* культивировали в бульоне YPD, а затем инокулировали в свежей среде YPD (*b*) или YPGE (*c*) до  $A_{600} = 1$ . Рост клеток регистрировали через указанные интервалы времени при 30 °C. *d* – Серийные десятикратные разведения клеток WT и *cox12Δ*, выращенных в течение ночи в среде YPD, наносили на чашки с YPD, YPGal и YPGE и инкубировали при 30 или 37 °C. Снимки были сделаны через 2–5 дней роста. В качестве отрицательного контроля использовали клетки с известными дефектами CIV (*coa6Δ*, *sco1Δ* и *pet117Δ*). *e* – Клетки WT и *cox12Δ*, трансформированные пустым вектором (pRS416-GPD) или векторами, экспрессирующими дрожжевой белок Cox12HA или COX6B1 человека, наносили на чашки со средами без урацила (-URA) – SCD и SCGE и выращивали при 30 °C. Снимки были сделаны через 2–5 дней роста. *f* – SDS-ПААГ и вестерн-блот-анализ уровней белка Cox12HA в митохондриальной и цитозольной фракциях клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором или геном COX12HA. Vdac1 и Pgc1 были использованы в качестве контроля нагрузки митохондриальной и цитозольной фракций соответственно. Все результаты блоттинга представляют по крайней мере 3 независимых эксперимента

тельный фенотип в клетках *cox12Δ* (данные не показаны). Внутриклеточная локализация белка Cox12 была установлена с помощью метода SDS-ПААГ и последующего иммуноблоттинга цитозольной и митохондриальной фракций лизата клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором или *COX12HA*. Как ожидалось, белок Cox12HA экспрессировался и локализовался в митохондриях (рис. 1, *f*). Следовательно, COX6B1 человека и Cox12 являются ортологами, и каждый из этих двух белков может восстанавливать дефект роста в аэробной среде клеток *cox12Δ*.

**Делеция Cox12 вызывает снижение активности CIV.** Чтобы выяснить биохимическую основу пониженного респираторного роста клеток *cox12Δ*, нами была изучена стационарная экспрессия субъединиц ЭТЦ в митохондриальных экстрактах клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*, растущих в аэробной/ферментационной среде YPGal. SDS-ПААГ и последующий вестерн-блоттинг не выявили значительных различий в содержании свободных CIII-специфичных (Rip1) и CIV-специфичных (Cox1–4) субъединиц и факторов сборки SC (Rcf1 и Rcf2) в митохондриях *cox12Δ* по сравнению с митохондриями клеток WT и *coa6Δ* (рис. 2, *a*).

Был проведён VN-ПААГ/вестерн-блоттинг митохондрий, солюбилизованных 2%-ным дигитонином, чтобы выявить в образцах митохондрий нативные суперкомплексы. Интересно, что аналогично данным, полученным для стационарной экспрессии белка, наблюдалось только частичное снижение количества SC III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> и III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>, когда использовались антитела против Cox1 и Rip1 (рис. 2, *b*). Это не удивительно, поскольку CIII<sub>2</sub> может образовывать SC до того момента, когда будет полностью сформирован CIV [29]. Однако встраивание Rcf2 и Cox2 в SC в клетках *cox12Δ* было в значительной степени снижено, в то время как возрастала ассоциация Rcf1 с SC (рис. 2, *b*) (см. раздел «Обсуждение»). Далее мы провели CN-ПААГ с последующим анализом активности в геле экстрактов митохондрий, солюбилизованных дигитонином. В клетках *cox12Δ* было обнаружено значительное снижение активности C(III + IV) по сравнению с клетками WT, в то время как объединённая активность CV (V<sub>1</sub> + V<sub>2</sub>) оставалась без изменений (рис. 2, *c*).

Мы также измерили специфическую активность CIV в образцах митохондрий из клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*. Удельная активность CIV в митохондриях из клеток WT была равна 148 нмоль/мин на мг белка. Лишь 18% этой активности было обнаружено в митохондриях из клеток *cox12Δ* (рис. 2, *d*). В целом эти данные

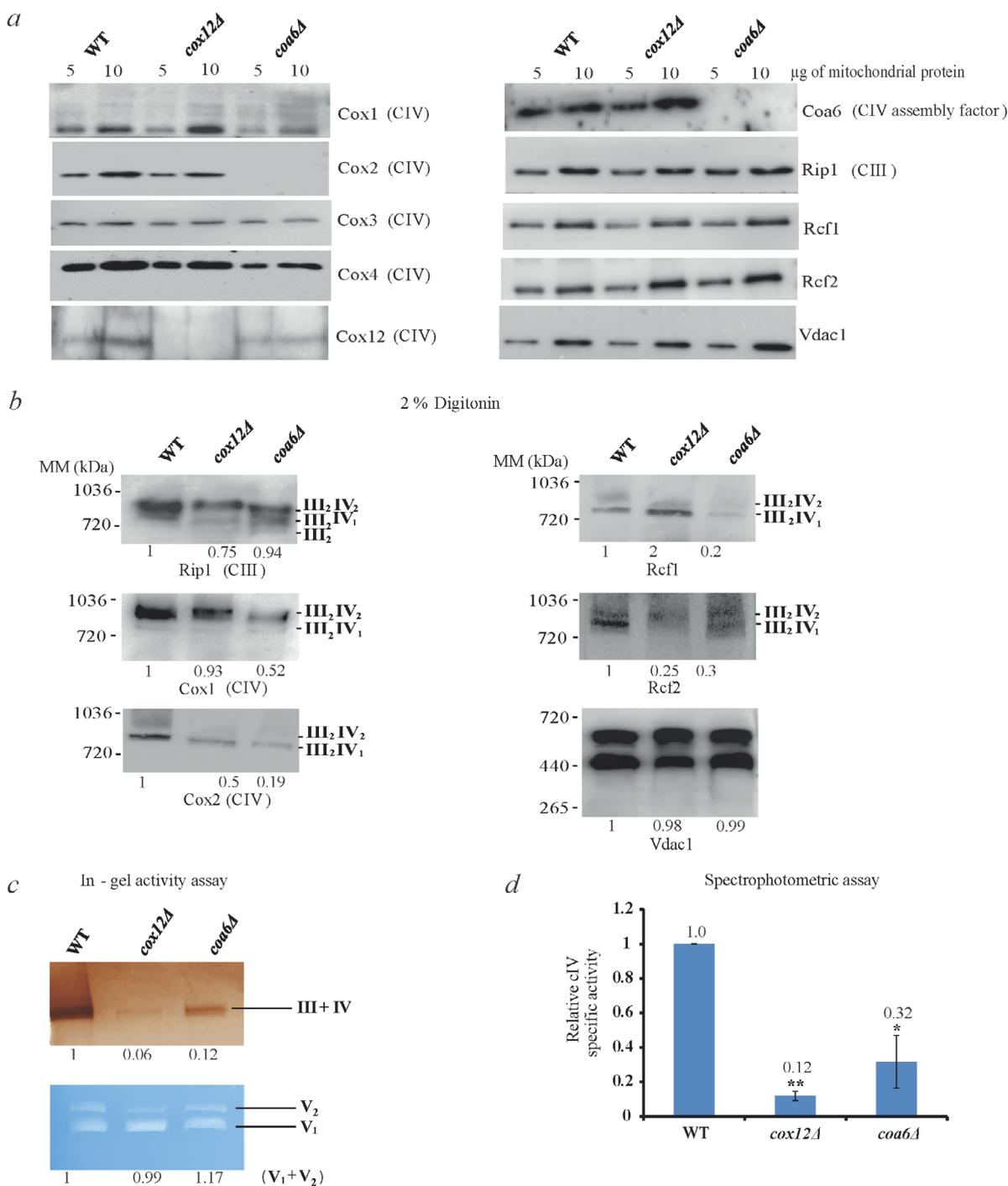
подтверждают то, что хотя Cox12 может быть незаменим для частичного биогенеза CIV, его делеция делает CIV неактивным.

**OCR и максимальная дыхательная ёмкость серьёзно нарушены в клетках *cox12Δ*.** Чтобы оценить физиологическое влияние пониженной активности CIV в клетках *cox12Δ*, мы измерили OCR целых клеток и митохондрий с использованием электрода Кларка для полярографического определения содержания O<sub>2</sub>. Как и ожидалось, клетки дефицитные по гену *COX12*, показывали значительное снижение (90%) базального уровня клеточной OCR по сравнению с клетками WT, тогда как контрольные клетки *coa6Δ* показывали снижение уровня OCR на 45% (рис. 3, *a*).

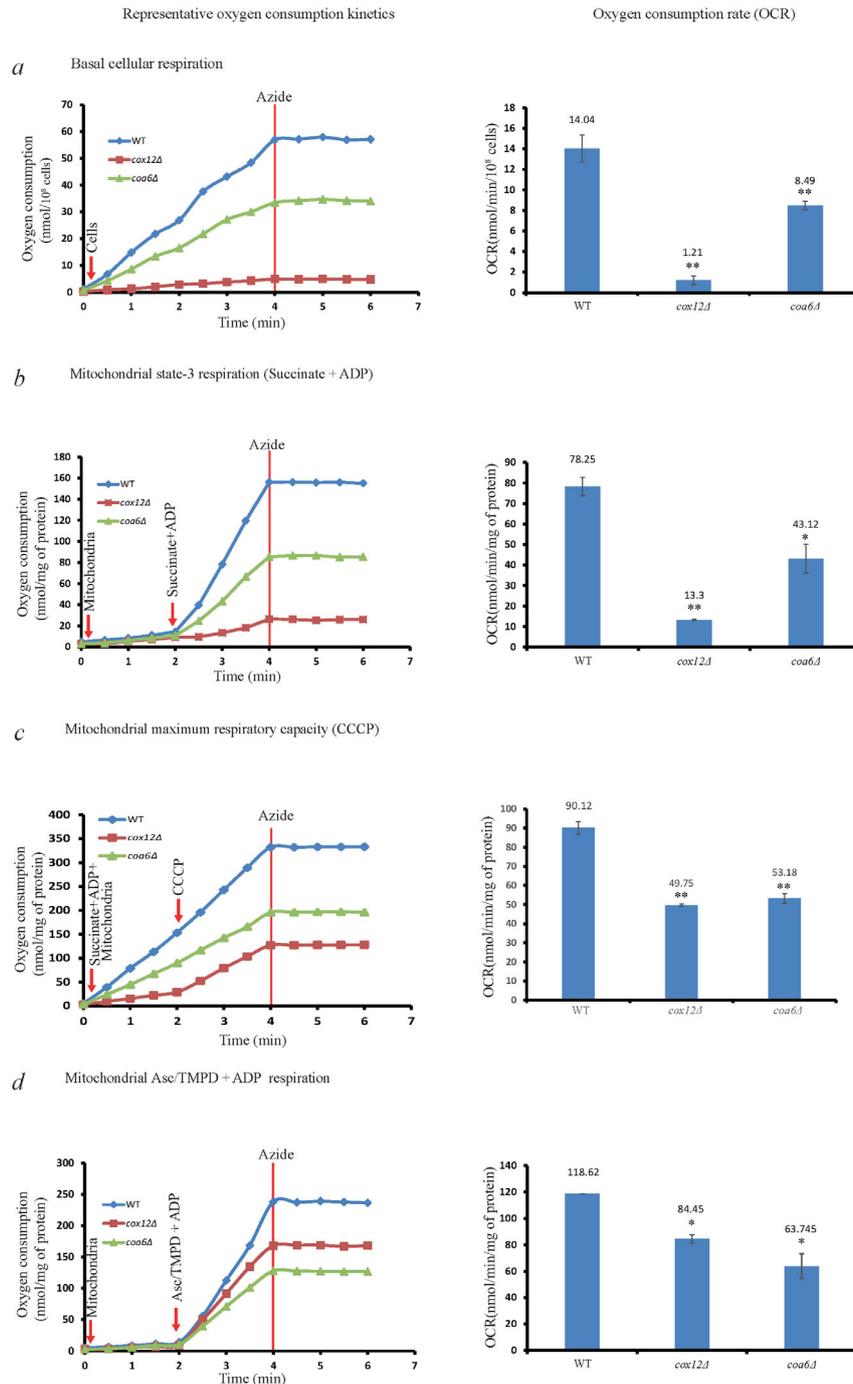
Затем измеряли OCR в стимулированном сукцинатом/ADP состоянии 3. Митохондрии из клеток *cox12Δ* показали снижение OCR более чем на 80% по сравнению с клетками WT (рис. 3, *b*). Мы также измерили CIV-опосредованную OCR в присутствии высоких миллимолярных концентраций аскорбата и TMPD (искусственные субстраты дыхания). Удивительно, но в клетках *cox12Δ* было обнаружено только 29%-ное снижение управляемой CIV OCR, что позволяет предположить, что есть некоторое восполнение OCR по сравнению с сукцинат-опосредованным дыханием (рис. 3, *c*; см. раздел «Обсуждение»). В присутствии 5 мкМ СССР значение максимальной дыхательной ёмкости митохондрий снижалось на 45% по сравнению с клетками WT (рис. 3, *d*). Запасная дыхательная ёмкость (разница между OCR в состоянии 3 и максимальной OCR) была также значительно снижена в клетках *cox12Δ* (данные не показаны). Следовательно, отсутствие правильной сборки CIV в клетках *cox12Δ* может серьёзно нарушить поток электронов через ETC.

**Подавление мембранного потенциала митохондрий в клетках *cox12Δ*.** Мембранный потенциал ( $\Delta\psi_m$ ) является основной силой в митохондриях, которая способствует переносу протонов через комплекс V, в результате чего образуется АТФ. Чтобы выяснить, влияет ли снижение дыхания и дефекты ЭТЦ клеток *cox12Δ* на величину  $\Delta\psi_m$ , мы измерили  $\Delta\psi_m$  в клетках WT и *cox12Δ*, используя цианин-содержащий флуоресцентный краситель DiOC<sub>6</sub>, который на протяжении долгого времени применяется для определения митохондриального  $\Delta\psi_m$ .

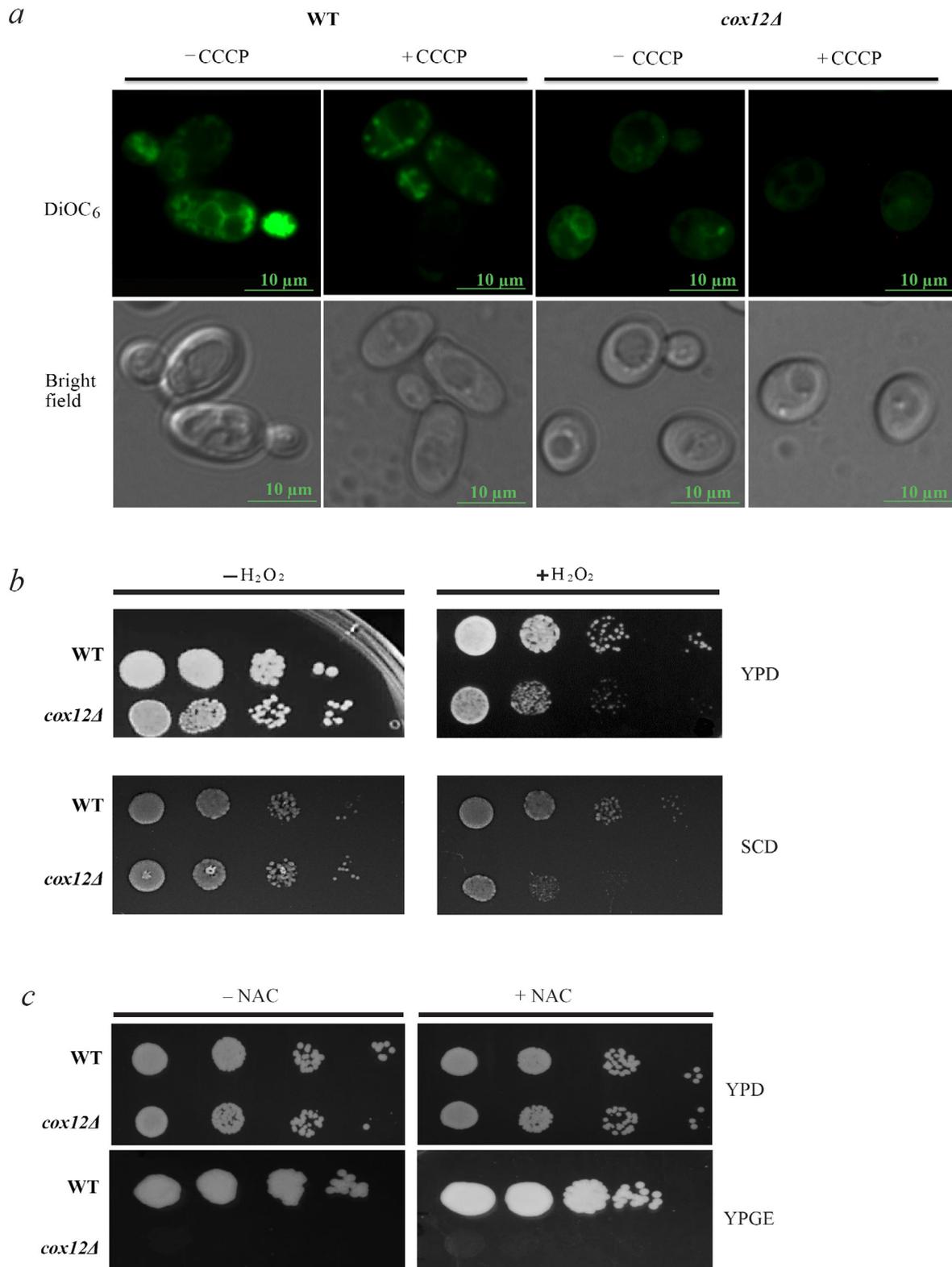
Наши результаты показали, что отсутствие Cox12 изменяет нормальное формирование потенциала митохондриальной мембраны. Добавление 10 мкМ СССР рассеивало  $\Delta\psi_m$  как в клетках WT, так и в клетках *cox12Δ* (рис. 4, *a*). Совместное ингибирование дыхания и  $\Delta\psi_m$  может также



**Рис. 2.** Делеция *Cox12* понижает активность CIV. *a* – SDS-ПААГ/иммуноблоттинг митохондриальных лизатов из клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*, выращенных в среде YPGal до  $A_{600} = 8$ . Далее 5–10 мкг белка митохондрий подвергались разделению в 15%-ном Tris-глициновом геле с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против CIII (Rip1), CIV (Cox1–4 и Cox12), специфических субъединиц и факторов сборки (Coa6, Rcf1 и Rcf2). Vdac1 был использован в качестве контроля нагрузки. *b* – BN-ПААГ/иммуноблоттинг образцов митохондрий (20 мкг белка), солюбилизованных 2%-ным дигитонином и разделённых в 3–13%-ном градиентном Bis-Tris-геле с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против CIII, CIV и факторов сборки SC (Rcf1 и Rcf2). Vdac1 был использован в качестве контроля нагрузки (денситометрически определённые комбинированные интенсивности полос для всех SC показаны под отдельными полосами). *c* – Окрашивание в геле активности C(III + IV)- и CV-содержащих SC в образцах митохондрий, солюбилизованных 2%-ным дигитонином, из клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*. *d* – CIV-специфичная активность в вышеупомянутых образцах митохондрий, измеренная спектрофотометрически при 550 нм. Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка,  $n = 3$  или более, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Все представленные результаты блоттинга были получены при проведении по крайней мере трёх независимых экспериментов



**Рис. 3.** Митохондриальное дыхание в клетках *cox12Δ* серьезно нарушено. Левая часть рисунка – репрезентативная кинетика потребления кислорода. Правая часть рисунка – значения OCR, рассчитанные на основании по крайней мере трёх независимых экспериментов. Средние значения OCR определяли от 2 до 4 мин после добавления субстрата. *a* – Эндогенное дыхание клеток WT, *cox12Δ* и *coa6Δ*, измеренное при концентрации  $10^8$  клеток/мл, в среде YPGal при 30 °C с использованием электрода для определения  $O_2$ . Через 4 мин для блокировки дыхания добавляли азид натрия (1 мМ) (вертикальная линия). *b* – Кинетика потребления кислорода и OCR свежесыведенных митохондрий, измеренная в 1 мл респираторного буфера, содержащего 0,6 М маннитол, 2 мМ  $MgCl_2$ , 20 мМ HEPES-КОН (pH 7,2), 1 мМ ЭДТА и 10 мМ  $K_2HPO_4$ . Уровень дыхания определяли в присутствии 10 мМ сукцината + 200 мкМ АДФ. *c* – Максимальную дыхательную ёмкость митохондрий измеряли при добавлении 5 мкМ CCCP в присутствии 10 мМ сукцината + 200 мкМ АДФ при 30 °C. *d* – Уровень дыхания, измеренный с использованием 1,4 мМ TMPD/12,5 мМ аскорбата + 200 мкМ АДФ, при 30 °C при постоянном перемешивании. Во всех экспериментах стрелками показаны добавки, а вертикальные линии представляют добавки азид натрия. Числа над отдельными столбиками показывают среднее значение OCR. Все результаты были получены с помощью прибора Oxytherm, снабжённого электродом Кларка («Hansatech»). Значения OCR представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка,  $n \geq 3$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$



**Рис. 4.** Мембранный потенциал митохондрий в клетках *cox12Δ* был понижен. *a* – Клетки WT и *cox12Δ*, окрашенные специфическим для мембранного потенциала митохондрий красителем DiOC<sub>6</sub> (20 нг/мл). Флуоресцентные микрофотографии и соответствующие фазово-контрастные изображения клеток WT и *cox12Δ* были получены на флуоресцентном микроскопе («Olympus»). *b* – Для определения чувствительности к окислительному стрессу клетки WT и *cox12Δ* были обработаны 2,5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, наносили на чашки со средами YPD и SCD. *c* – Аэробный рост клеток WT и *cox12Δ* в присутствии 25 мМ NAC в среде YPGE через 2–5 дней

вызвать образование АФК [36]. Клетки, у которых отсутствовал ген *COX12*, демонстрировали слабый рост на чашках со средами YPD и SCD в присутствии 2,5 мМ  $H_2O_2$  (рис. 4, *b*), что предполагает, что клетки *cox12Δ* чувствительны к окислительному стрессу, индуцированному  $H_2O_2$ . Однако добавка тушителя активных форм кислорода NAC (25 мМ) не привела к восстановлению роста клеток *cox12Δ* на аэробной среде YPGE (рис. 4, *c*).

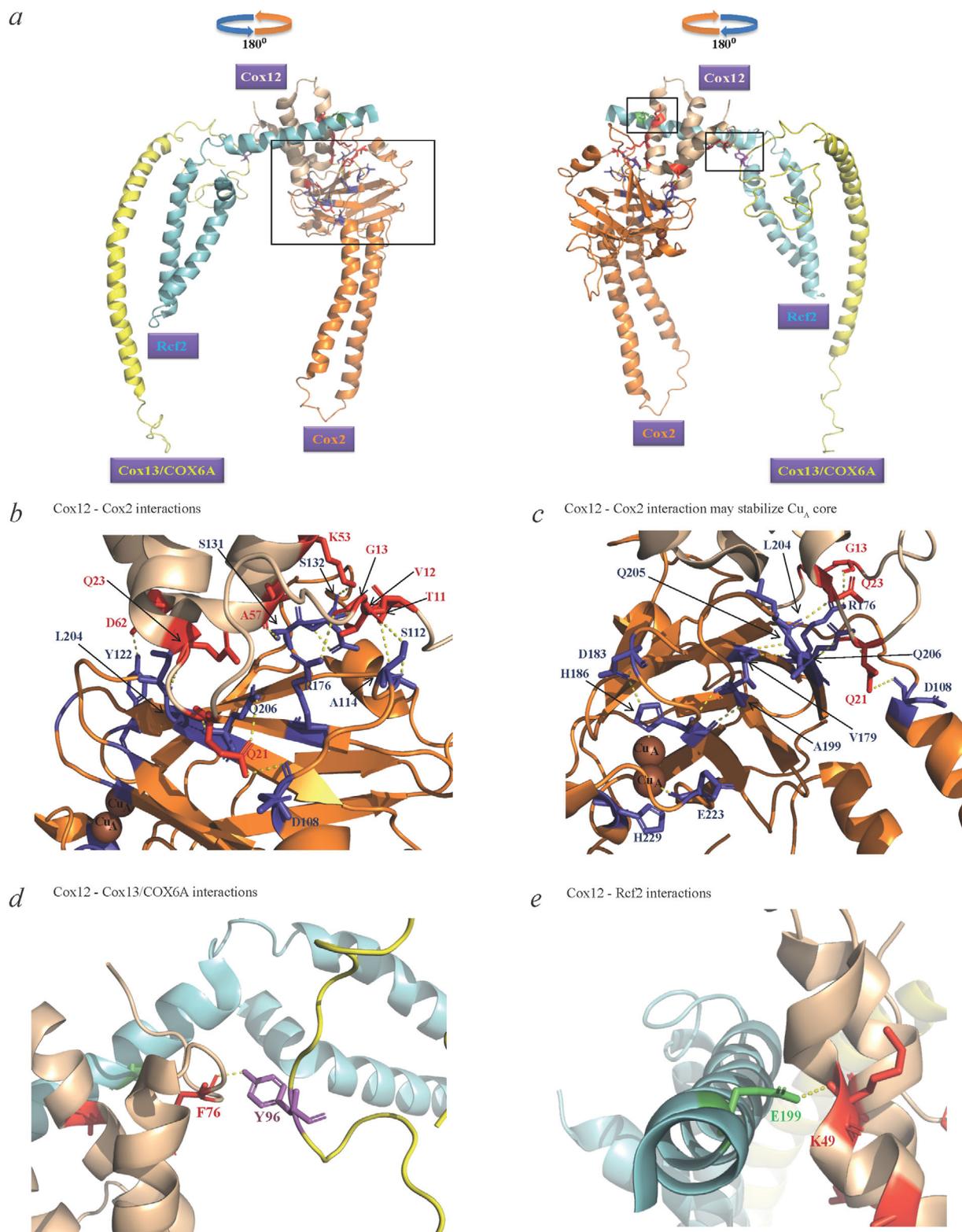
**Компьютерный анализ партнёров по взаимодействию Cox12.** Чтобы получить более полное представление о предполагаемой функции Cox12, мы выполнили *in silico* моделирование доступных структур SC из *S. cerevisiae* (PDB IDs 6T0B и 6T15) [29] для идентификации сети взаимодействий субъединицы Cox12. Было показано, что Cox12 образует водородные связи с тремя субъединицами CIV (Cox1, Cox2 и Cox6a/Cox13) и одним фактором SC (Rcf2) (рис. 5, *a–e*; табл. 2), помимо уже известной субъединицы Cox3 [5]. Cox12 имеет 8 контакт-

ных сайтов для каталитической субъединицы Cox2. Среди них в Cox12 есть 4 консервативных а.о., которые также присутствуют в COX6B1 человека (табл. 2). Однако эти остатки не взаимодействуют непосредственно с каталитическим центром  $Cu_A$ . Аминокислотные остатки Q21 и Q23 Cox12 участвуют в формировании структурного микроокружения, которое стабилизирует центр  $Cu_A$  Cox2 (рис. 5, *c*). Два других контактных сайта предназначены для Cox1 и Cox13 соответственно. Предположительно, они ответственны за правильное функционирование белка (рис. 5, *d*, табл. 2). Cox12 также взаимодействует с C-концевым участком Rcf2, расположенным после домена белка индуцируемого гипоксией гена (HIG) (рис. 5, *e*). Было показано, что это взаимодействие необходимо для рекрутинга Cox12 в модуль Cox3 во время сборки CIV (табл. 2) [29]. Анализ данных, полученных по SC III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>, показал, что сайт (K49) взаимодействия с Rcf2 (E199) находится внутри мотива CX<sub>10</sub>C Cox12 (рис. 5, *e* и табл. 2). В суперком-

**Таблица 2.** Аминокислотные остатки Cox12, взаимодействующие с другими субъединицами CIV и фактором сборки SC

| Аминокислотные остатки Cox12 | Взаимодействующие остатки субъединицы | Образование связей между цепями | Обнаружены в суперкомплексах   | Предполагаемые функции                              |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--|---|
| T11*                         | Cox2–A114                             | A114 с H174                     | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)<br>III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B) | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| V12                          | Cox2–S112                             | R176 с T116                     | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| G13                          | Cox2–R176                             |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| G13                          | Cox2–R176                             | R176 с M115 и I117              | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| Q20                          | Cox2–Q206                             |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| Q21*                         | Cox2–D108, Q206                       |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| Q21*                         | Cox1–R302<br>Cox2–Q206                |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)  | стабилизирует микроокружение вблизи $Cu_A$ и $Cu_B$ |
| Q23*                         | Cox2–L204                             |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)<br>III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B) | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| Q29*<br>D33*                 | RCF2–R187                             |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)  | стабилизирует COX-содержащий SC                     |
| K49                          | RCF2–E199                             |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует COX-содержащий SC                     |
| K53                          | Cox2–D132                             |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| N56                          | Cox2–S131                             | S131 с K118                     | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| A57                          | Cox2–K118                             | K118 с E129 и S131              | III <sub>2</sub> IV <sub>1</sub> (PDB ID: 6T15)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| A57                          | Cox2–S131                             | S131 с T116 и E129              | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| D62                          | Cox2–Y122                             | Y122 с W124                     | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует центр $Cu_A$                          |
| F76*                         | Cox13/COX6A–Y96                       |                                 | III <sub>2</sub> IV <sub>2</sub> (PDB ID: 6T0B)  | стабилизирует мономерную структуру COX              |

Примечание. \* Эволюционно консервативные а.о.



**Рис. 5.** Анализ *in silico* подтверждает, что взаимодействия Cox12 важны для функционирования CIV. *a* – Cox12 и 3 взаимодействующих с ним партнёра (Cox2, Cox13 и Rcf2) смоделированы из структур крио-ЭМ SC (идентификаторы PDB: 6T0B и 6T15). Субъединицы CIV и фактор сборки суперкомплекса Rcf2 показаны различным цветом. *b* – Взаимодействия между аминокислотными остатками Cox12 и Cox2 (показаны красным и фиолетовым цветом соответственно). *c* – Каталитический карман, образуемый между остатками Cox2 и Cox12, который может стабилизировать каталитическое микроокружение на сайте Cu<sub>A</sub> Cox2. Три а.о., окрашенных фиолетовым цветом (H186, E223, H229) являются сайтами Cox2, координируемые по Cu<sub>A</sub>. *d–e* – Взаимодействия Cox12 с Cox13 (показаны жёлтым цветом) (*d*) и с Rcf2 (показаны зелёным цветом) (*e*)

плексе III<sub>2</sub>IV сайт (Q49, D33) взаимодействия с Rcf2 (R187) локализован внутри мотива CX<sub>9</sub>C Cox12 (табл. 2). В целом эти данные позволяют предположить, что Cox12 взаимодействует с двумя каталитическими субъединицами и одной структурной субъединицей и также с одним фактором SC, которые могут регулировать функционирование CIV.

**Мутации R17H и R17C могут нарушить функционирование Cox12.** Были сообщения о трёх мутациях двух а.о., R20 и T81, белка COX6B1 человека [18–20]. Среди этих остатков R20 консервативен в дрожжах (R17 в Cox12 дрожжей) (рис. 1, *a*). Мы сконструировали два мутанта, R17C и R17H (аналогично мутациям в белках человека), в векторе pRS416-GPD и протестировали их способность к восстановлению аэробного роста клеток *cox12Δ* в дыхательной среде, содержащей глицерин и этанол. Мы обнаружили, что оба мутанта лишь частично восстанавливают аэробный рост клеток *cox12Δ*. Наблюдаемая пролонгированная лаг-фаза кривой роста клеток (рис. 6, *a* и *b*) позволяет предположить, что остаток R17 очень важен для функционирования Cox12.

SDS-ПААГ с последующим иммуноблоттингом цитозольной и митохондриальной фракций показали, что экспрессируемые в эписомах мутантные белки локализованы в митохондриях. Однако мутация R17H значительно снижает стационарную митохондриальную экспрессию Cox12 по сравнению с клетками WT и трансформантами R17C, что может быть связано с дефектом импорта в митохондрии этого белка либо с его пониженной стабильностью. Интересно, что мутация R17C не вызывала изменений в стационарной экспрессии белка в митохондриях, но не устраняла дефект роста клеток *cox12Δ* (рис. 6, *c*).

**Мутации R17H и R17C влияют на биоэнергетику митохондрий и чувствительность клеток к окислительному стрессу.** Используя BN-ПААГ и последующий вестерн-блоттинг, нами было показано, что мутация R17H серьёзно нарушает сборку Cox12 в SC III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> и III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>. В то же самое время у мутантов R17C не наблюдалось значительного снижения сборки SC (рис. 7, *a*). Поскольку антисыворотка против пептидов Cox12 не выявила Cox12 в нативных SC, мы использовали белок Cox12HA для изучения ассоциации Cox12 с SC. Мы также измерили OCR в клетках *cox12Δ*, трансформированных геном *COX12HA* или его мутантными формами *R17H* и *R17C* с использованием электрода Кларка для полярографического определения O<sub>2</sub>. Как и ожидалось, в клетках *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором, наблюдалось снижение базальной

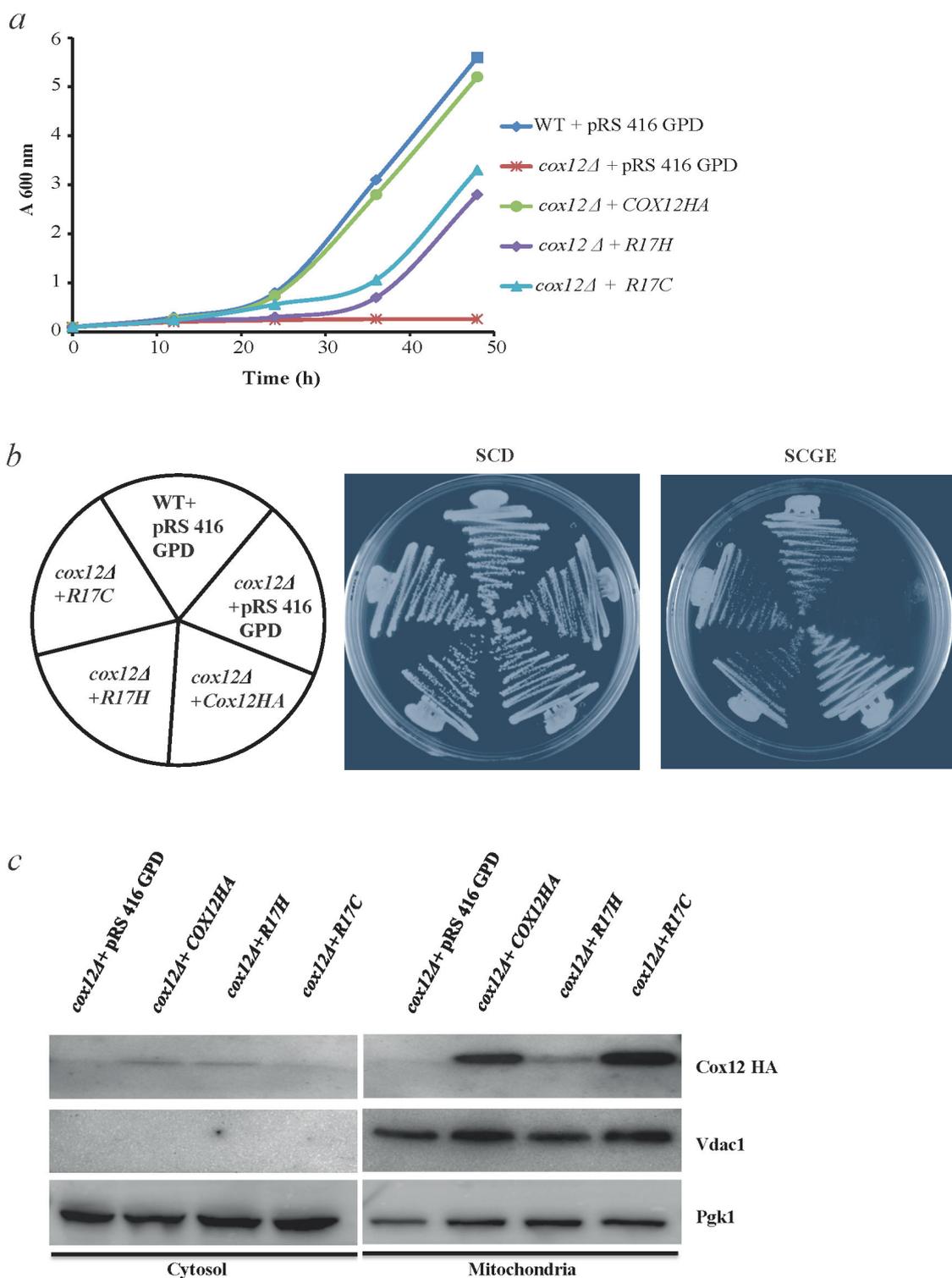
OCR более чем на 70% по сравнению с клетками WT. OCR в клетках *cox12Δ*, экспрессирующих Cox12, была схожа с OCR в клетках WT. OCR для мутантных форм R17H и R17C была снижена на 56 и 30% соответственно по сравнению с клетками WT (рис. 7, *b* и *c*). Кроме того, клетки *cox12Δ*, трансформированные пустым вектором, были чрезвычайно чувствительны к окислительному стрессу и не могли расти на чашках со средой SCD (-URA) после обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Сходная чувствительность к действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдалась в клетках *cox12Δ*, трансформированных мутантами *R17H* и *R17C*. Однако экспрессия гена *COX12* дикого типа в клетках *cox12Δ* полностью подавляла фенотипы, чувствительные к действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 7, *d*). Следовательно, наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что обе мутации, наблюдаемые у людей (R17H и R17C), могут быть причиной развития патогенеза заболевания, уменьшая дыхание и вызывая окислительный стресс.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

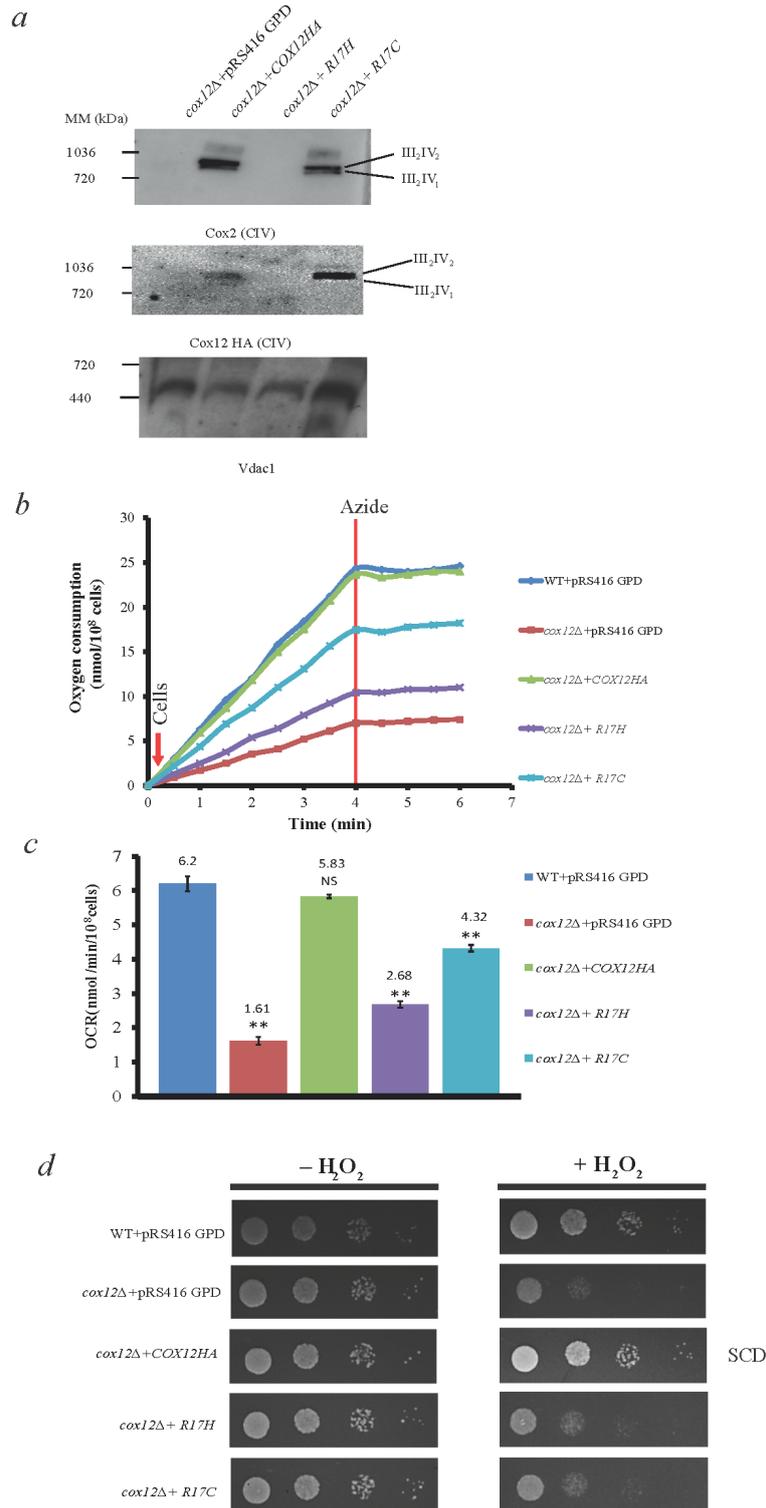
Биогенез митохондриальной электрон-транспортной цепи является чрезвычайно сложным процессом, в котором задействовано более 92 субъединиц [37]. Однако, помимо каталитических субъединиц, содержащих редокс-центры, точная роль отдельных субъединиц остаётся неясной. Это ограничивает не только наше понимание процесса образования энергии, но также является основным препятствием для проведения связи между структурными генами ЭТЦ, участвующими в развитии различных патологий, и их биологическими функциями. В этом исследовании мы использовали дрожжевую модель дефицита Cox12, чтобы установить патофизиологическую и дыхательную роли этого белка.

Нами было показано, что делеция субъединицы CIV Cox12 приводит к заметной потере дрожжевыми клетками способности к росту в аэробных условиях (рис. 1, *b–d*). Гены *COX12* дрожжей или *COX6B1* человека, внедрённые в клетки *cox12Δ*, в полной мере восстанавливали дыхательный фенотип этих клеток, подтверждая, что белки, кодируемые этими генами, являются ортологами (рис. 1, *e*). Фенотипический анализ также выявил, что мутантные формы Cox12 (R17H и R17C) лишь частично дополняют функции Cox12 в клетках WT (рис. 6 и 7).

При изучении причины снижения уровня дыхательного роста клеток *cox12Δ* мы обнаружили, что в отличие от COX-дефицитных клеток *coa6Δ*, стационарная экспрессия факторов SC (Rcf1 и Rcf2) и субъединиц CIII (Rip1) и



**Рис. 6.** Клетки *cox12Δ* из *S. cerevisiae*, экспрессирующие мутантные белки Cox12 с аминокислотными заменами R17H и R17C, показывают замедленный аэробный рост. *a* – Кривые роста клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором pRS416-GPD или векторами, несущими гены *COX12HA*, *R17H* или *R17C*. Клетки выращивали в среде SCD (-URA), затем их инокулировали в свежую среду SCGE (-URA) до  $A_{600} = 0,1$ . Рост клеток при 30 °C регистрировали через обозначенные интервалы времени. Клетки WT, трансформированные плазмидой pRS416-GPD, использовали в качестве контроля. *b* – Трансформированные клетки помещали на чашки со средами SCD и SCGE и инкубировали в течение 2–5 дней перед визуализацией. *c* – Иммуноблоттинг митохондриальных и цитозольных экстрактов клеток *cox12Δ*, трансформированных пустым вектором, *COX12HA* и мутантными генами. Pgk1 и Vdac1 использовали как цитозольные и митохондриальные маркеры соответственно



**Рис. 7.** Влияние мутаций R17H и R17C на митохондриальное дыхание и чувствительность клеток *S. cerevisiae* к окислительному стрессу. *a* – BN-ПААГ/иммуноблоттинг образцов митохондрий (20 мкг), солюбилизированных 2%-ным дигитонином и разделённых в 3–13%-ном градиентном Bis-Tris-геле с последующим иммуноблоттингом с использованием антител против Cox2 и Cox12HA. Vdac1 был использован в качестве контроля загрузки. *b* – Эндогенное клеточное дыхание WT + pRS416 GPD, *cox12Δ* + pRS416 GPD, *cox12Δ* + COX12HA, *cox12Δ* + R17H и *cox12Δ* + R17C, измеряемое при концентрации  $10^8$  клеток/мл в среде SCD (-URA) при 30 °C. Через 4 мин для блокировки дыхания добавляли азид натрия (1 мМ) (вертикальная линия). *c* – Значения OCR были рассчитаны как минимум по трём независимым экспериментам. *d* – Чувствительность к окислительному стрессу определяется обработкой вышеуказанных штаммов 2,5 мМ  $H_2O_2$  и последующим нанесением клеток на среду SCD (-URA). Изображения были получены через 2 дня роста клеток

CIV (Cox1–4) в клетках *cox12Δ* не отличалась от клеток WT (рис. 2, *a*). BN-ПААГ/вестерн-блоттинг с использованием антител против Rip1 и Cox1 не выявил заметного снижения количества суперкомплексов III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> и III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> в клетках *cox12Δ* (рис. 2, *b*). Интересно, что количество субъединицы Cox2 в SC снижалось на 50% по сравнению с клетками WT. Делеция Cox12 не сказывается на синтезе и стабильности свободной субъединицы CIV (рис. 2, *a*). Следовательно, эти субъединицы могут образовывать неполный холокомплекс CIV (без Cox12), который может далее связываться с CIII<sub>2</sub> с образованием SC (рис. 2, *b*). Либо отсутствие Cox12 нарушает включение на поздних стадиях субъединицы CIV (например, Cox2), либо стабилизация Cox12 в SC нарушается. В любом случае каталитическая активность CIV в клетках *cox12Δ* существенно нарушена (рис. 2, *c* и *d*).

Интересно, что мы также выявили дифференциальную экспрессию факторов дыхательных SC (Rcf1 и Rcf2) в суперкомплексах III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> и III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> клеток *cox12Δ*: уровень Rcf1 повышался, в то время как уровень Rcf2 был понижен (рис. 2, *b*). Роль факторов Rcf1 и Rcf2 остаётся невыясненной. Было показано, что ортолог Rcf1 у человека (HIGD1A) необходим на поздних стадиях биогенеза CIII<sub>2</sub> и на начальной стадии биогенеза CIV. Человеческий ортолог Rcf2 (HIGD2A) крайне необходим на поздней стадии биогенеза CIV [38, 39]. Однако роли дрожжевых Rcf1 и Rcf2 в регуляции активности CIV перекрываются [40]. Сейчас возникает вопрос: почему уровни Rcf1 и Rcf2 изменились в SC клеток *cox12Δ* по сравнению с клетками WT? Может быть два ответа. Во-первых, Rcf1 может связываться с CIV на очень ранней стадии сборки CIV, тогда как Rcf2 участвует в привлечении или стабилизации Cox12 на поздней стадии сборки CIV [29]. Следовательно, при отсутствии Cox12 интеграция Rcf2 в SC нарушается. Альтернативная возможность состоит в том, что Rcf1 и Rcf2 являются положительным и отрицательным модуляторами активности CIV соответственно [41]. Следовательно, чтобы компенсировать пониженную активность CIV в клетках *cox12Δ*, уровень Rcf1 должен повышаться, а уровень Rcf2 должен понижаться.

Анализ биоэнергетики клетки показал, что потеря гена *COX12* снижает базальную OCR клетки на 90% и значительно снижает максимальную респираторную ёмкость клеток (в присутствии СССР) (рис. 3, *a–d*). Стимулируемое сукцинатом комбинированное дыхание C(II + V) было затруднено на 84% по сравнению с дыханием клеток WT (рис. 3, *b*). Интересно, что дыхательная активность CIV при 1,4 мМ TMPD и

аскорбате снижалась лишь на 29% (рис. 3, *d*). Это можно объяснить тем, что TMPD при более высоких концентрациях непосредственно переносит электроны на центр Cu<sub>A</sub>/гем *a* в CIV в обход цитохрома *c* [42]. Следовательно, возможно, отсутствие Cox12 может вызывать дефекты в сайте стыковки цитохрома *c* CIV и препятствовать потоку электронов от цитохрома *c* к центру Cu<sub>A</sub>.

Анализ с помощью программы PyMol показал, что Cox12 располагается на противоположной стороне интерфейса CIV–CIII в обоих SC. Следовательно, отсутствие Cox12 не мешает формированию SC. Более того, анализ белок-белковых взаимодействий показал, что Cox12 взаимодействует с каталитическими субъединицами CIV, регулирующими поток электронов (рис. 5 и табл. 2). Мы обнаружили, что остатки Q21 и Q23 в Cox12 обеспечивают стабильность каталитического координационного сайта Cu<sub>A</sub> через сеть не прямых взаимодействий с остатками Q206 и L204 субъединицы Cox2 соответственно (табл. 2). Эти остатки помогают координировать правильную ориентацию лигандов Cu<sub>A</sub> (H186, E223 и H229) Cox2. Было обнаружено, что остаток D62, специфичный для Cox12 грибов, взаимодействовал с остатком Y122 Cox2, расположенным в непосредственной близости от одного из остатков (Y125) сайта докинга цитохрома *c* (рис. 5, *b*). Cox12 также связывается с Rcf2, который взаимодействует с другими субъединицами CIV (Cox3 и Cox13), имеющими значение для сайта докинга цитохрома *c* [29] (рис. 5, *e*). В целом эти данные говорят о том, что Cox12 действует как «мост» между модулями Cox2 и Cox3. Следовательно, делеция Cox12 может нарушить ассоциацию/стабильность Cox2 в SC, что предотвращает формирование правильного кармана для связывания цитохрома *c* в CIV.

Дисфункции отдельных комплексов ЭТЦ и биогенеза SC часто связаны с активацией генерации АФК [43–45]. Митохондрии являются основным источником образования АФК в клетке [46]. Нами было показано, что отсутствие Cox12 приводит к нарушениям роста дрожжей в результате H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированного окислительного стресса (рис. 4, *b*) и приводит к деполяризации митохондриальной мембраны (рис. 4, *a*). Пониженный мембранный потенциал митохондрий может вызвать запуск митофагии, что приводит к уменьшению числа митохондрий. Однако это предположение следует проверить [47]. Поскольку НАС не был способен восстановить дыхательный рост клеток *cox12Δ* (рис. 4, *c*), нарушение регуляции образования АФК может быть не единственной причиной

возникновения дефекта респираторного роста клеток *cox12Δ*.

В заключение, делеция гена *COX12* приводит к нарушению респираторного роста клеток дрожжей. Ортолог человека, *COX6B1*, может дополнить функцию *COX12* у дрожжей. Однако белки Cox12 с аминокислотными заменами R17H и R17C (аналоги мутаций *COX6B1*, наблюдаемые у людей) не смогли дополнить дыхательную функцию гена *COX12* (рис. 6 и 7). Поскольку субъединица Cox12 встраивается лишь после сборки модулей Cox1 и Cox2, мы показали, что в клетках *cox12Δ* синтезированный недостроенным CIV может связываться с CIII<sub>2</sub> с образованием суперкомплексов III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> и III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>. Однако эти SC ферментативно неактивны, предположительно, из-за дестабилизации сайта докинга цитохрома *c*. В результате в клетках *cox12Δ* сукцинат-стимулированная OCR митохондрий понижена на 84%. Интересно, что добавка миллимолярных концентраций TMPD/аскорбата частично восстанавливала потребление кислорода, вероятно, за счёт усиления потока электронов через недостроенные SC. *In silico* анализ белок-белковых взаимодействий показал, что Cox12 встраивается в SC и образует контакты с Cox2 и Rcf2. Методом BN-ПААГ было показано, что отсутствие Cox12 затрудняет связывание Cox2 и Rcf2 с суперкомплексами. Следовательно, эти функционально дефектные недостроенные дыхательные комплексы могут замедлять скорость потока электронов через ЭТЦ и снижать мем-

бранный потенциал митохондрий в клетках *cox12Δ*, что может играть роль в возникновении патологий, ассоциированных с дефицитом Cox12.

**Финансирование.** Данная работа была поддержана DST-SERB (ECR/2016/001127), правительством Индии и грантами ВІ Калькуттского университета для AG; стипендией UGC-JRF (MAY2018-353734) для SM и стипендией CSIR-JRF (09/028 (1127)/2019-EMR-I) для MB.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность докторам С. Мейсингеру, Мартину Отту и Винсенцо Зара за любезно предоставленные ими препараты антител. Мы хотели бы выразить благодарность доктору Каусику Чакраборти, IGIB, Индия за получение штаммов дрожжей с делециями. Мы также благодарны Д.К. Бозе и Н. Сингху за техническую помощь в приготовлении текста настоящей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Данная статья не содержит результаты каких-либо работ с участием людей или лабораторных животных, выполненных с участием кого-либо из её авторов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/bioximiya/>) и на сайте издательства Springer ([www.springer.com/journal/10541](http://www.springer.com/journal/10541)), том 86, вып. 12, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rak, M., Benit, P., Chretien, D., Bouchereau, J., Schiff, M., et al. (2016) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase deficiency, *Clin. Sci. (Lond)*, **130**, 393-407, doi: 10.1042/CS20150707.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J., and Barrientos, A. (2012) Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome *c* oxidase catalytic core, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 883-897, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.09.005.
- Barros, M. H., and McStay, G. P. (2020) Modular biogenesis of mitochondrial respiratory complexes, *Mitochondrion*, **50**, 94-114, doi: 10.1016/j.mito.2019.10.008.
- Mukherjee, S., and Ghosh, A. (2020) Molecular mechanism of mitochondrial respiratory chain assembly and its relation to mitochondrial diseases, *Mitochondrion*, **53**, 1-20, doi: 10.1016/j.mito.2020.04.002.
- Su, C. H., and Tzagoloff, A. (2017) Cox16 protein is physically associated with Cox1p assembly intermediates and with cytochrome oxidase, *J. Biol. Chem.*, **292**, 16277-16283, doi: 10.1074/jbc.M117.801811.
- Vidoni, S., Harbour, M. E., Guerrero-Castillo, S., Signes, A., Ding, S., et al. (2017) MR-1S interacts with PET100 and PET117 in module-based assembly of human cytochrome *c* oxidase, *Cell Rep.*, **18**, 1727-1738, doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.044.
- 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.
- Fornuskova, D., Stiburek, L., Wenchich, L., Vinsova, K., Hansikova, H., et al. (2010) Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome *c* oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b, *Biochem. J.*, **428**, 363-374, doi: 10.1042/BJ20091714.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., et al. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, **269**, 1069-1074, doi: 10.1126/science.7652554.
- Letts, J. A., Fiedorczuk, K., and Sazanov, L. A. (2016) The architecture of respiratory supercomplexes, *Nature*, **537**, 644-648, doi: 10.1038/nature19774.
- Timon-Gomez, A., Nyvtova, 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.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M. L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J. A. (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes, *Mol. Cell*, **32**, 529-539, doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.

13. Khalimonchuk, O., and Winge, D. R. (2008) Function and redox state of mitochondrial localized cysteine-rich proteins important in the assembly of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 618-628, doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.016.
14. Kim, S. E., Mori, R., Komatsu, T., Chiba, T., Hayashi, H., et al. (2015) Upregulation of cytochrome *c* oxidase subunit 6b1 (Cox6b1) and formation of mitochondrial supercomplexes: implication of Cox6b1 in the effect of calorie restriction, *Age (Dordr)*, **37**, 9787, doi: 10.1007/s11357-015-9787-8.
15. Modjtahedi, N., Tokatlidis, K., Dessen, P., and Kroemer, G. (2016) Mitochondrial proteins containing coiled-coil-helix-coiled-coil-helix (CHCH) domains in health and disease, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 245-260, doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.004.
16. Yang, S., Wu, P., Xiao, J., and Jiang, L. (2019) Overexpression of COX6B1 protects against I/R-induced neuronal injury in rat hippocampal neurons, *Mol. Med. Rep.*, **19**, 4852-4862, doi: 10.3892/mmr.2019.10144.
17. Nie, K., Li, J., He, X., Wang, Y., Zhao, Q., et al. (2020) COX6B2 drives metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation to promote metastasis in pancreatic ductal cancer cells, *Oncogenesis*, **9**, 51, doi: 10.1038/s41389-020-0231-2.
18. Abdulhag, U. N., Soiferman, D., Schueler-Furman, O., Miller, C., Shaag, A., et al. (2015) Mitochondrial complex IV deficiency, caused by mutated COX6B1, is associated with encephalomyopathy, hydrocephalus and cardiomyopathy, *Eur. J. Hum. Genet.*, **23**, 159-164, doi: 10.1038/ejhg.2014.85.
19. Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., et al. (2012) Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 118ra110, doi: 10.1126/scitranslmed.3003310.
20. Massa, V., Fernandez-Vizorra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., et al. (2008) Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome *c* oxidase, *Am. J. Hum. Genet.*, **82**, 1281-1289, doi: 10.1016/j.ajhg.2008.05.002.
21. Baertling, F., Brand, M. A. M., Hertecant, J. L., Al-Shamsi, A., 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.
22. Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., et al. (2016) Mitochondrial diseases, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2**, 16080, doi: 10.1038/nrdp.2016.80.
23. Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., et al. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology, *Cell*, **134**, 112-123, doi: 10.1016/j.cell.2008.06.016.
24. Vondrackova, A., Vesela, K., Hansikova, H., Docekalova, D. Z., Rozsypalova, E., et al. (2012) High-resolution melting analysis of 15 genes in 60 patients with cytochrome-*c* oxidase deficiency, *J. Hum. Genet.*, **57**, 442-448, doi: 10.1038/jhg.2012.49.
25. Zhang, W., Wang, Y., Wan, J., Zhang, P., and Pei, F. (2019) COX6B1 relieves hypoxia/reoxygenation injury of neonatal rat cardiomyocytes by regulating mitochondrial function, *Biotechnol. Lett.*, **41**, 59-68, doi: 10.1007/s10529-018-2614-4.
26. LaMarche, A. E., Abate, M. I., Chan, S. H., and Trumpower, B. L. (1992) Isolation and characterization of COX12, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *c* oxidase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 22473-22480.
27. Ghosh, A., Pratt, A. T., Soma, S., Theriault, S. G., Griffin, A. T., et al. (2016) Mitochondrial disease genes COA6, COX6B and SCO2 have overlapping roles in COX2 biogenesis, *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 660-671, doi: 10.1093/hmg/ddv503.
28. Ghosh, A., Trivedi, P. P., Timbalia, S. A., Griffin, A. T., Rahn, J. J., et al. (2014) Copper supplementation restores cytochrome *c* oxidase assembly defect in a mitochondrial disease model of COA6 deficiency, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 3596-3606, doi: 10.1093/hmg/ddu069.
29. Hartley, A. M., Meunier, B., Pinotsis, N., and Marechal, A. (2020) Rcf2 revealed in cryo-EM structures of hypoxic isoforms of mature mitochondrial III-IV supercomplexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 9329-9337, doi: 10.1073/pnas.1920612117.
30. Strogolova, V., Furness, A., Robb-McGrath, M., Garlich, J., and Stuart, R. A. (2012) Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome *bc*<sub>1</sub>-cytochrome *c* oxidase supercomplex, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 1363-1373, doi: 10.1128/MCB.06369-11.
31. Vukotic, M., Oeljeklaus, S., Wiese, S., Vogtle, F. N., Meisinger, C., et al. (2012) Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex, *Cell Metab.*, **15**, 336-347, doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.016.
32. Meisinger, C., Pfanner, N., and Truscott, K. N. (2006) Isolation of yeast mitochondria, *Methods Mol. Biol.*, **313**, 33-39, doi: 10.1385/1-59259-958-3:033.
33. Wittig, I., Karas, M., and Schagger, H. (2007) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes, *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 1215-1225, doi: 10.1074/mcp.M700076-MCP200.
34. Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., and Angelini, C. (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells, *Nat. Protoc.*, **7**, 1235-1246, doi: 10.1038/nprot.2012.058.
35. Jamar, N. H., Kritsiligkou, P., and Grant, C. M. (2017) The non-stop decay mRNA surveillance pathway is required for oxidative stress tolerance, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6881-6893, doi: 10.1093/nar/gkx306.
36. Brand, M. D. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production, *Exp. Gerontol.*, **45**, 466-472, doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003.
37. Chinnery, P. F., and Hudson, G. (2013) Mitochondrial genetics, *Br. Med. Bull.*, **106**, 135-159, doi: 10.1093/bmb/ldt017.
38. Fernandez-Vizorra, E., and Zeviani, M. (2018) Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly, *Cell Cycle*, **17**, 681-687, doi: 10.1080/15384101.2017.1417707.
39. Timon-Gomez, A., Garlich, J., Stuart, R. A., Ugalde, C., and Barrientos, A. (2020) Distinct roles of mitochondrial HIGD1A and HIGD2A in respiratory complex and supercomplex biogenesis, *Cell Rep.*, **31**, 107607, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107607.
40. Strogolova, V., Hoang, N. H., Hosler, J., and Stuart, R. A. (2019) The yeast mitochondrial proteins Rcf1 and Rcf2 support the enzymology of the cytochrome *c* oxidase complex and generation of the proton motive force, *J. Biol. Chem.*, **294**, 4867-4877, doi: 10.1074/jbc.RA118.006888.
41. Dawitz, H., Schafer, J., Schaart, J. M., Magits, W., Brzezinski, P., and Ott, M. (2019) Rcf1 modulates cytochrome *c* oxidase activity especially under energy-demanding conditions, *Front. Physiol.*, **10**, 1555, doi: 10.3389/fphys.2019.01555.

42. Hochman, J. H., Partridge, B., and Ferguson-Miller, S. (1981) An effective electron donor to cytochrome oxidase. Purification, identification, and kinetic characterization of a contaminant of ruthenium red, hexaamineruthenium II/III, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8693-8698.
43. Diaz, F., Enriquez, J. A., and Moraes, C. T. (2012) Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 415-429, doi: 10.1128/MCB.06051-11.
44. Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S., and Moraes, C. T. (2006) Cytochrome *c* oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts, *Mol. Cell Biol.*, **26**, 4872-4881, doi: 10.1128/MCB.01767-05.
45. Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., et al. (2016) Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 13063-13068, doi: 10.1073/pnas.1613701113.
46. Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., and Soldati, T. (2015) Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis, *Redox Biol.*, **6**, 472-485, doi: 10.1016/j.redox.2015.09.005.
47. Knorre, D. A., and Severin, F. F. (2012) Longevity and mitochondrial membrane potential, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 793-794, doi: 10.1134/S0006297912070127.

## MUTATIONS IN THE YEAST *Cox12* SUBUNIT SEVERELY COMPROMISE THE ACTIVITY OF THE MITOCHONDRIAL COMPLEX IV

S. Das, S. Mukherjee, M. Bedi, and A. Ghosh\*

*Department of Biochemistry, University of Calcutta, 35 Ballygunge Circular Road, Pin-700019, Kolkata, India; e-mail: alok.caluni@gmail.com*

Cytochrome *c* oxidase 6B1 (COX6B1) is one of the less characterized subunits of the mitochondrial electron transport chain complex IV (CIV). Here, we studied the pathobiochemical and respiratory functions of Cox12 (yeast ortholog of COX6B1) using *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*cox12Δ*) cells deficient by the Cox12 protein. The cells exhibited severe growth deficiency in the respiratory glycerol-ethanol medium, which could be reverted by complementation with the yeast *COX12* or human *COX6B1* genes. Cox12 with arginine 17 residue substituted by histidine (R17H) or cysteine (R17C) (mutations analogous to those observed in human patients) failed to complement the loss of Cox12 function. When *cox12Δ* cells were grown in rich respiratory/fermentative galactose medium, no changes in the expression of respiratory chain subunits were observed. Blue native PAGE/Western blotting analysis using antibodies against Rpl1 and Cox1, which are specific components of complexes III (CIII) and IV (CIV), respectively, revealed no noticeable decrease in the native CIII<sub>2</sub>CIV<sub>2</sub> and CIII<sub>2</sub>CIV<sub>1</sub> supercomplexes (SCs). However, the association of the respiratory SC factor 2 (Rcf2) and Cox2 subunit with the SCs in *cox12Δ* cells was reduced, while the specific activity of CIV was downregulated by 90%. Both basal respiration and succinate-ADP stimulated respiration in state 3, as well as the mitochondrial membrane potential, were decreased in *cox12Δ* cells. Furthermore, *cox12Δ* cells and cells synthesizing Cox12 mutants R17H and R17C showed higher sensitivity to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress compared to the wild-type (WT) cells. *In silico* structural modeling of the WT yeast SCs revealed that Cox12 forms a network of interactions with Rcf2 and Cox2. Together, our results establish that Cox12 is essential for the CIV activity.

**Keywords:** cytochrome *c* oxidase 6B1, Cox12, complex IV, supercomplexes