

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Чугунова Анастасия Андреевна

**Митохондриальный пептид L116 является посредником между
клеточным дыханием и липидным метаболизмом**

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2019

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители –

Донцова Ольга Анатольевна
доктор химических наук, профессор,
академик РАН

Сергиев Петр Владимирович
доктор химических наук,
профессор РАН

Официальные оппоненты -

Животовский Борис Давидович
доктор биологических наук, профессор
заведующий лабораторией
исследования механизмов апоптоза
Факультет фундаментальной медицины
МГУ имени М.В. Ломоносова

Малыгин Алексей Аркадьевич
доктор химических наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории структуры и функции рибосом
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины

Хомутов Алексей Радиевич
доктор химических наук
ведущий научный
сотрудник лаборатории
молекулярных основ действия
физиологически активных соединений
Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится «29» октября 2019 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:
<https://istina.msu.ru/dissertations/237179989/>

Автореферат разослан «__» сентября 2019г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
к.х.н., доцент



И.Г. Смирнова

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Пептиды и маленькие белки – это класс биомолекул, играющих важную роль в клетке. Например, существуют пептиды и маленькие белки, регулирующих сон (орексин), стресс (CFR), метаболизм (лептин) и другие процессы. Поиск новых биологически активных пептидов привел к открытию огромного числа ранее неаннотированных пептидов, кодируемых короткими открытыми рамками считывания. Подобные пептиды, синтезируемые рибосомой сразу короткими, следует отличать от известных нейропептидов и гормонов, которые протеолитически вырезаются из более длинного предшественника. Последние исследования демонстрируют, что кОПС-пептиды являются важными регуляторами во многих фундаментальных процессах (Рисунок 1), таких, как развитие и оплодотворение, репарация ДНК, регуляция транскрипции и трансляции, гомеостаз кальция, метаболизм, клеточная смерть.

Степень разработанности темы

Хотя исследования в этой области начались несколько десятилетий назад, именно сейчас стало очевидным, что разнообразие данных биологически активных молекул было недооценено. За последние несколько лет стало понятно, что около 5-10% генов могут кодировать кОПС-пептиды. Большое число таких пептидов было идентифицировано в различных организмах от бактерий до человека. Большинство из них высококонсервативны и они выполняют как внутри-, так и внеклеточные функции, однако функция многих кОПС-пептидов остается неизученной.

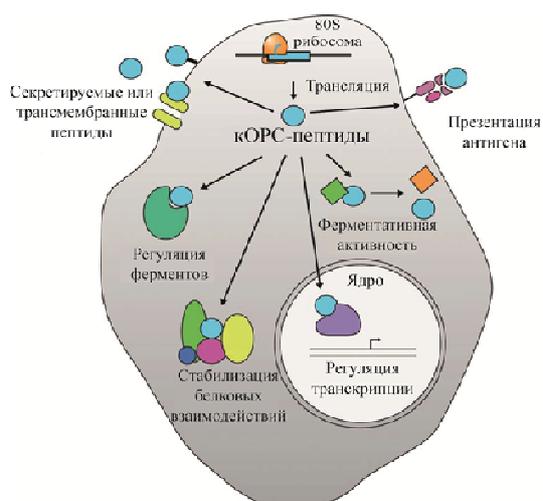


Рисунок 1. Различные функции, выполняемые кОПС-пептидами. кОПС кодируют пептиды с различными внутриклеточными и внеклеточными функциями. Они могут принимать участие в процессах регуляции активности ферментов, стабилизации белок-

белковых взаимодействий в цитоплазме, межклеточной сигнализации и регуляции транскрипции. Синим шариком обозначен кОПС-пептид.

Хотя последние достижения в вычислительной биологии и экспериментальных методах позволили идентифицировать огромное число кОПС-пептидов, это не означает, что все они обладают биологической функцией. Для того чтобы определить физиологическую роль идентифицированного пептида, в каждом случае необходимо отдельное экспериментальное исследование.

Данная работа посвящена изучению 56 ак пептида, кодируемого геном, ранее ошибочно аннотированным как длинная некодирующая РНК. Данный пептид, названный нами L116, локализуется в митохондриях и связан с несколькими функциями этих органелл.

Цели и задачи исследования

Целью данного проекта являлось изучение функциональной роли высококонсервативного пептида, кодируемого геном 1500011k15Rik.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить, синтезируется ли данный пептид в клеточных линиях и живом организме.
2. Определить внутриклеточную локализацию L116 пептида.
3. Инактивировать ген 1500011k15Rik в линиях клеток и исследовать фенотип нокаутных клеток.
4. Найти белковых партнеров исследуемого пептида.

Объект исследования

Механизмы регуляции клеточных процессов кОПС-пептидами.

Предмет исследования

Функция митохондриального пептида, кодируемого геном 1500011k16Rik.

Научная новизна исследования

Впервые проведено исследование функциональной роли гена 1500011k16Rik. Результаты экспериментов, полученные при использовании нескольких разных взаимодополняющих методов, свидетельствуют об участии пептида, кодируемого данным геном, в регуляции активности комплекса I дыхательной цепи и липидного метаболизма. В результате более тщательного анализа последовательности, мы обнаружили открытую рамку считывания, которая кодировала консервативный среди хордовых пептид длиной 56 ак. Для доказательства того, что предполагаемый пептид действительно синтезируется в клетках, с помощью CRISPR/Cas9 системы были создана клеточная линия с точным

встраиванием участка, кодирующего флюоресцентный белок mCherry непосредственно перед стоп кодоном гена 1500011k16Rik.

Теоретическая значимость исследования

В представленной работе нам удалось показать, что пептид локализуется в митохондриях. При исследовании нокаутных клеточных линий мы обнаружили, что активность НАДН-убихинон оксиредуктазы, комплекса I дыхательной цепи, снижена, однако это снижение не обусловлено тем, что пептид является его компонентом. Анализ с помощью ко-иммунопреципитации показал, что пептид взаимодействует с цитохром b5 редуктазой 3 (Cyb5r3). Мы предположили, что пептид может регулировать Cyb5r3 и таким образом влиять на активность комплекса I дыхательной цепи. Впоследствии, мы показали, что митохондриальный нокаут Cyb5r3 обладает таким же фенотипом, что и нокаут по данному пептиду.

Практическая значимость исследования

Результаты данной работы способствуют пониманию функциональной роли в клетке пептида, кодируемого геном 1500011k16Rik. Также данная работа показывает важность изучения неисследованного класса биомолекул кОПС-пептидов, играющих важную роль в различных клеточных процессах.

Методология диссертационного исследования

В данной работе использовались современные методы исследований, такие как точная модификация генома с помощью CRISPR/Cas9 системы, биосенсоры и анализ липидного состава клеток. Для изучения функции пептида было создано множество клеточных линий с модифицированным геномом, например, клеточные линии нокаутные по данному пептиду или митохондриальной форме Cyb5r3. Для получения клеток нокаутных и с точной мутацией в геноме использовали CRISPR/Cas9 систему. Также для ко-иммунопреципитации были получены линии с суперэкспрессией тагированного пептида. Для экзогенной экспрессии применялась транспозоновая система Sleeping Beauty. Чтобы понять, как пептид влияет на функцию митохондрий, было исследовано митохондриальное дыхание в культуре клеток. Процессы клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования исследовали с помощью прибора Оксиграф (Hansatech instruments). Для изучения липидного состава клеток была использована жидкостная хроматография с последующей масс-спектрометрией и биоинформатическим анализом большого объема данных.

Основные положения, выносимые на защиту

- Ген 1500011k16Rik кодирует пептид, который локализуется в митохондриях и экспрессируется как в клеточных линиях, так и в живом организме.
- Пептид L116 влияет на функцию Cytb5r3 через прямое взаимодействие.
- Удаление пептида L116 и митохондриальной формы Cytb5r3 приводит к нарушению активности комплекса I дыхательной цепи.
- Регулируя функцию Cytb5r3 в митохондриях, L116 влияет на липидный состав клеток, что скорее всего, является причиной уменьшения активности комплекса I.

Степень достоверности результатов

Воспроизводимость экспериментов и статистическая обработка данных подтверждает достоверность результатов диссертационного исследования. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании и с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями.

Апробация работы

Результаты были представлены на следующих научных мероприятиях: The 42nd FEBS Congress 2017, Иерусалим, Израиль 07.09.-10.09.2017; “Shaping the future: big data, biomedicine and frontier technologies-2017” ежегодная Skoltech-MIT конференция, Москва, Россия, 25.04.-26.04.2017. Также результаты работы обсуждались на семинарах лаборатории химии нуклеопротеидов с 2014 по 2018 гг.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 5 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключался в анализе литературных данных для постановки задач и целей проекта, планировании и проведении экспериментальных процедур, анализе и оформлении полученных данных, представлении результатов на научных мероприятиях и подготовке публикаций в научные журналы.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из списка обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, который включает 222 источник. Объем диссертации 118 страниц, 29 рисунков и 2 таблицы.

Основное содержание работы

Пептид, кодируемый геном 1500011k16Rik, локализуется в митохондриях

Чтобы определить локализацию исследуемого пептида, мы создали клеточную линию, в которой перед стоп кодоном гена 1500011k16Rik встроили участок, кодирующий флюоресцентный белок mCherry. Для этих целей мы воспользовались системой транспозиции Sleeping Beauty, которая позволяет встраивать экспрессирующую кассету в случайное место генома клеточной линии. Встраивание кассеты, кодирующей гибридный белок L116-mCherry под контролем гибридного доксициклин-индуцируемого промотора на основе промотора RPBSA в геном происходило при котрансфекции созданной кассеты с плазмидой, кодирующей транспозазу SB100X. В результате использования линии клеток с повышенной экспрессией L116-mCherry было выяснено, что пептид L116 находится в митохондриях, о чем свидетельствует его ко-локализация со специальным красителем для митохондрий MitoTracker GreenFM (Рисунок 2).

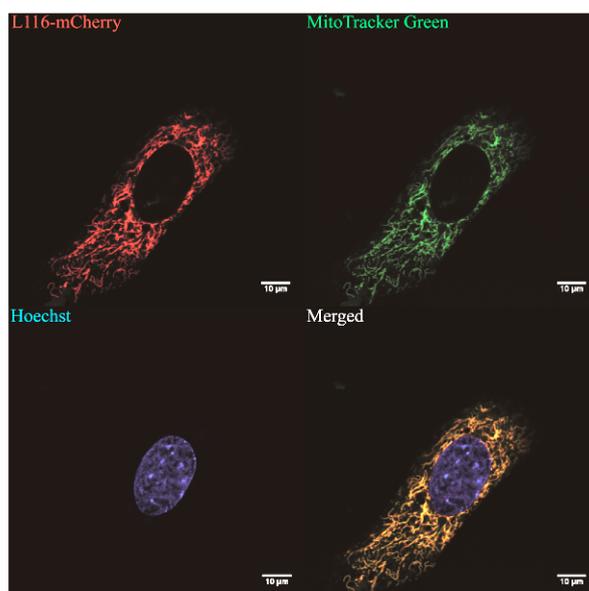


Рисунок 2. Конфокальная микроскопия клеток с повышенной экспрессией гена гибридного белка L116-mCherry. Митохондрии окрашены с помощью MitoTracker Green FM, ядра - Hoechst 33342. Размерная шкала 10 мкм.

Инактивация гена 1500011k16Rik приводит к снижению активности комплекса I

Вследствие того, что пептид L116 локализуется в митохондриях, мы предположили, что его удаление может влиять на функцию митохондрий. Для того чтобы проверить, влияет ли пептид L116 на активность комплексов дыхательной цепи, было решено сравнить скорости поглощения кислорода клетками с интактным и инактивированным геном 1500011k16Rik. Скорость поглощения кислорода позволяет оценить поток электронов через

комплексы I-IV дыхательной цепи (Рисунок 3а). Активность комплекса I (НАДН убухинон оксиредуктаза), измеряемая как ротенон чувствительное поглощение кислорода с использованием глутамата и малата в качестве субстратов, оказалась ниже в случае удаления L116 в обеих клеточных линиях.

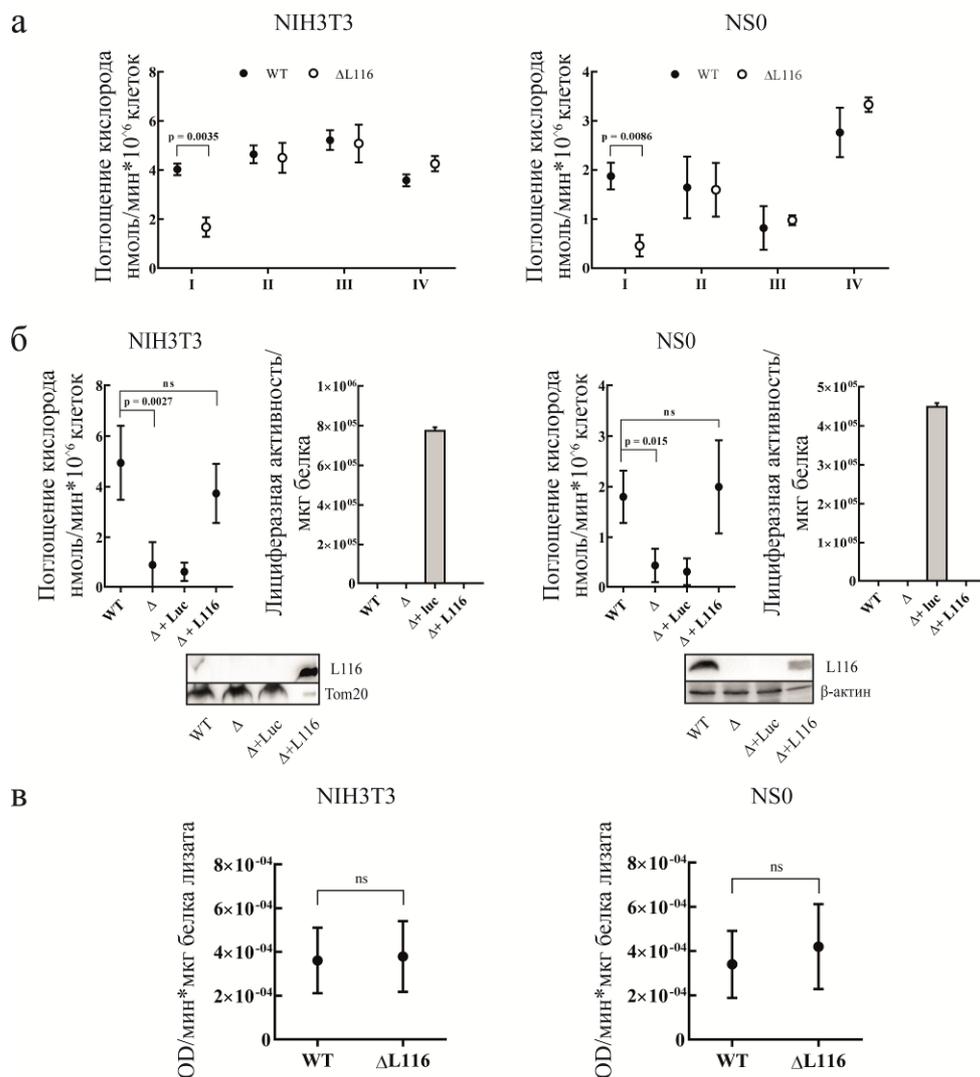


Рисунок 3. (а) Скорость поглощения кислорода для комплексов I-IV дыхательной цепи клеток дикого типа и нокаутных. Для НИН3Т3 использована нокаутная линия ΔL116-3. Представленные значения являются средним для 3 независимых экспериментов (3 технические реплики каждый). Для статистически достоверного изменения указан уровень вероятности с поправкой на множественное сравнение ($p < 0.05$, *t*-тест Стюдента, поправка Холма-Сидака). (б) Скорость поглощения кислорода для комплекса I в клетках дикого типа и нокаутных, нокаутных, комплементированных конструкцией, кодирующей люциферазу, и нокаутных, комплементированных конструкцией, кодирующей L116 (для НИН3Т3 использована нокаутная линия ΔL116-3). Представленные значения являются средним для 3 независимых экспериментов (3 технические реплики каждый). Для статистически достоверного изменения указан уровень вероятности с поправкой на

множественное сравнение ($p < 0.05$, однофакторный ANOVA, поправка Даннетта). Ниже представлен иммуноблоттинг продуктов электрофоретического разделения изолированных митохондрий из клеток NIH3T3 и клеточных экстрактов из NS0, который показывает экспрессию пептида L116. Том20 и β -актин были использованы как контроли нанесения для митохондрий и клеточных экстрактов соответственно. Люциферазный анализ показывает активность только в клетках, комплементированных конструкцией, кодирующей люциферазу. Во всех случаях данные представлены как среднее \pm SD. (в) Активность изолированного комплекса I в клетках дикого типа и нокаутных (для NIH3T3 были измерены все три нокаутных линии клеток Δ L116-1,2,3). Представленные значения являются средним для 6 независимых экспериментов для NIH3T3 и 5 независимых экспериментов для NS0 (2 технические реплики каждый). t-тест Стюдента (ns - незначительно). Во всех случаях данные представлены как среднее \pm SD.

В связи с тем, что данный эффект мог быть обусловлен побочными мутациями, вызванными CRISPR-Cas9 системой, мы решили сделать дополнительный контроль. Для этого в нокаутную клеточную линию мы ввели экспрессионную конструкцию на основе транспозонного вектора, кодирующую L116 или люциферазу, как отрицательный контроль. Это позволило нам определить, является ли данный эффект следствием отсутствия пептида L116 в клетках. Действительно, именно экспрессия L116, но не люциферазы, приводила к восстановлению активности комплекса I (Рисунок 3б).

На следующем этапе работы у нас возник вопрос, каким образом пептид может влиять на функцию комплекса I. НАДН убихинон оксиредуктаза – это большой мультисубъединичный комплекс, которому помимо собственно структурных компонентов, необходимо несколько дополнительных факторов сборки. Первым предположением было, что пептид L116 может являться одним из компонентов первого комплекса, либо нужен для его сборки. Для проверки данного предположения, мы выделили комплекс I из клеток дикого типа и нокаутных по L116 и сравнили его способность окислять НАДН (Рисунок 3в). Активность изолированного комплекса I оказалась одинаковой в обоих случаях, что говорит о том, что пептид L116 не является частью комплекса I и не принимает участие в его сборке. Таким образом, можно сделать вывод о том, что пептид L116 влияет на функцию комплекса I опосредованно.

L116 взаимодействует с Cyb5r3

Так как пептид L116 влияет на активность комплекса I опосредованно, мы предположили, что это может происходить через взаимодействие с другим белком или ферментом, который необходим для правильной работы комплекса I. Для поиска белков, с

которыми взаимодействует L116, мы создали линию клеток, в которой экспрессировался ген пептида L116 с HA-эпитопом. На первом этапе работы было принято решение сделать клеточную линию с точным встраиванием HA-довеска на N-конец пептида с помощью CRISPR/Cas9 системы. Нам удалось получить ряд клонов с необходимой вставкой. Однако проверка экспрессии гена пептида с помощью иммуноблоттига антителами на HA-эпитоп показала, что в природном геномном контексте L116 ген гибридного белка HA-L116 не экспрессируется. Для проведения опытов по иммунопреципитации L116 была получена клеточная линия с повышенной экспрессией HA-L116. Она была использована для поиска белковых партнеров L116. Единственным белком, который воспроизводимо и достоверно совыделялся с L116, оказалась НАДН цитохром b5 редуктаза 3 (Cyb5r3) (Рисунок 4а, б). Для того чтобы убедиться, что это взаимодействие специфично, а не обусловлено наличием HA-эпитопа, мы провели ко-иммунопреципитацию партнеров L116-mCherry из клеток, в геном которых была встроена соответствующая конструкция. Как и в случае с HA-L116, в результате иммунопреципитации L116 за довесок mCherry нам удалось выделить Cyb5r3 (Рисунок 4в). Чтобы проверить возможную колокализацию L116 и Cyb5r3, мы экспрессировали L116-mCherry и Cyb5r3-eGFP одновременно в клетках NIH3T3 (Рисунок 4г). С помощью этого опыта нам удалось показать, что L116 колокализуется с Cyb5r3, подтверждая то, что наблюдаемое взаимодействие этих белков не является артефактом разрушения клеток при выделении экстракта.

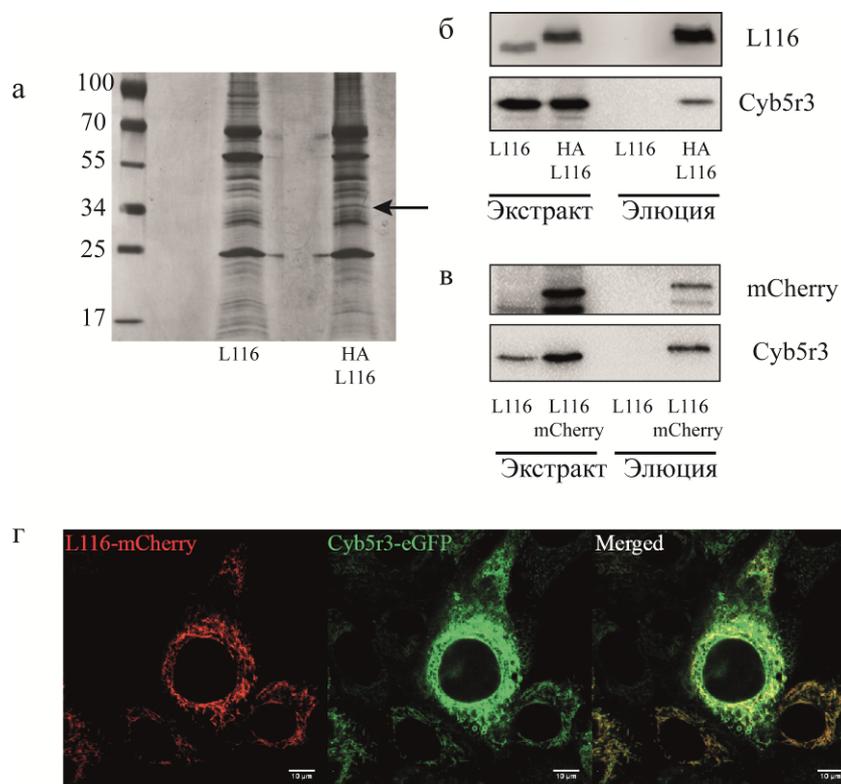


Рисунок 4. Окрашивание нитратом серебра продуктов электрофоретического разделения элюата иммунопреципитации L116 за HA-эпитоп из клеточной линии NIH3T3 с

повышенной экспрессией гена HA-L116. Клетки, экспрессирующие ген L116 без доведка были использованы в качестве контроля. (б) Иммуноблоттинг продуктов электрофоретического разделения элюата иммунопреципитации L116 за HA-эпитоп из клеточной линии NIH3T3, с повышенной экспрессией гена HA-L116 антителами на L116 (верхняя панель) и антителами на Cyb5r3 (нижняя панель). Клетки, экспрессирующие L116 без тага были использованы в качестве контроля. (в) Иммуноблоттинг продуктов электрофоретического разделения элюата иммунопреципитации L116 за mCherry из клеточной линии NIH3T3, с повышенной экспрессией гена L116-mCherry антителами на mCherry (верхняя панель) и антителами на Cyb5r3 (нижняя панель). Клетки, экспрессирующие ген L116 без тага были использованы в качестве контроля. (г) Конфокальная микроскопия клеток экспрессирующих L116-mCherry и Cyb5r3- eGFP. Шкала 10 мкм.

Нарушение митохондриальной локализации Cyb5r3 приводит к снижению активности комплекса I

Чтобы понять, действительно ли L116 влияет на работу комплекса I через Cyb5r3, мы решили инактивировать Cyb5r3 в клетках. Известно, что Cyb5r3 локализуется как в митохондриях, так и в ЭПР, что затрудняет задачу селективной инактивации Cyb5r3 в митохондриях. Cyb5r3 должен быть N-меристилизован по аминокислоте Gly2 для локализации в митохондриях. Из анализа научной литературы известно, что мутация Gly на Ala приводит к тому, что Cyb5r3 перестает интегрироваться в мембрану митохондрий. Поэтому мы создали клеточную линию с точечной заменой кодона Gly на кодон Ala в гене 1500011k16Rik, что позволило нам нарушить митохондриальную локализацию Cyb5r3.

Иммуноблоттинг продуктов электрофоретического разделения митохондриальных экстрактов из клеток дикого типа и мутантных Cyb5r3 Gly2Ala показал, что мутация приводит к снижению количества Cyb5r3 в митохондриях (Рисунок 5а). Не полное отсутствие белка в митохондриальных экстрактах может быть связано с частичным совыделением ЭПР фракции при очистке митохондрий. Измерение скорости поглощения кислорода для мутантных клеток (Рисунок 5б) показало, что нарушение митохондриальной локализации белка Cyb5r3 приводит к такому же фенотипу, что и инактивация пептида L116. Таким образом, можно заключить, что и пептид и Cyb5r3 одинаково влияют на активность комплекса I.

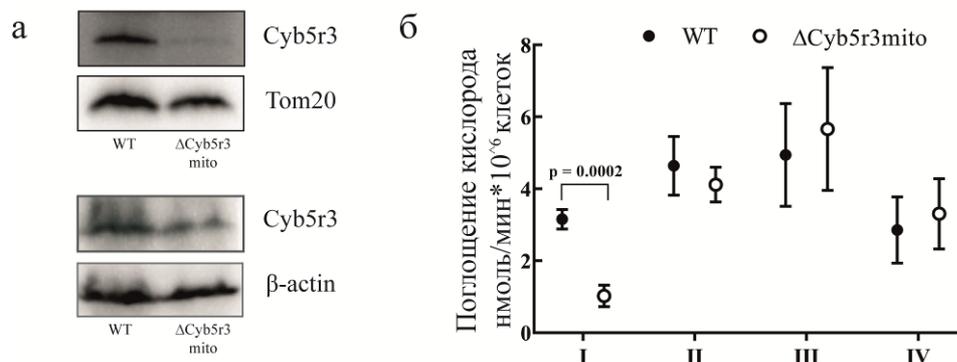


Рисунок 5. (а) Иммуноблоттинг продуктов электрофоретического разделения митохондриальных и полных клеточных экстрактов клеток дикого типа и мутантных *Cyb5r3 Gly2Ala* с помощью антител на *Cyb5r3*. *Tom20* и β -актин были использованы в качестве контроля нанесения. (б) Активность комплексов I-IV в клетках с инактивированной митохондриальной *Cyb5r3*. Представленные значения являются средним для 4 независимых экспериментов (3 технические реплики каждый). Для статистически достоверного изменения указан уровень вероятности с поправкой на множественное сравнение ($p < 0.05$, *t*-тест Стюдента, поправка Холма-Сидака). Данные представлены как среднее \pm SD.

Изучение функциональности взаимодействия L116 и *Cyb5r3*

Наша следующая задача состояла в том, чтобы установить функционируют ли L116 и *Cyb5r3* в одном пути или в параллельных путях. Для этого мы решили создать линии с нокаутами по обоим белкам, нокаут *Cyb5r3* с суперэкспрессией L116, нокаут L116 с суперэкспрессией *Cyb5r3* (Рисунок 6а). Чтобы понять будет ли инактивация или суперэкспрессия L116 приводить к каким-то изменениям в фенотипе Δ *Cyb5r3*_{mito}, мы сравнили потребление кислорода в данных клетках (Рисунок 6б). Результаты эксперимента показали, что инактивация или суперэкспрессия L116 в Δ *Cyb5r3*_{mito} мутантных клетках не приводит ни к ухудшению, ни к улучшению фенотипа клеток. Таким образом, мы сделали вывод, что вероятно L116 выполняет свою функцию через *Cyb5r3* и они функционируют в одном пути.

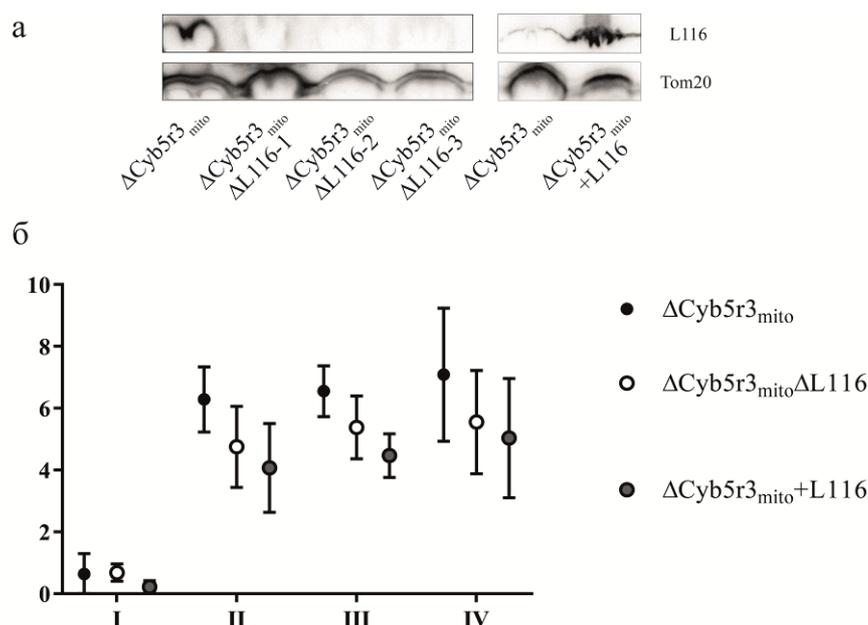


Рисунок 6. (а) Иммуноблоттинг продуктов электрофоретического разделения митохондриальных экстрактов клеток мутантных по Gly2 аминокислоте *Cyb5r3* и клеток с инактивацией митохондриальной формы *Cyb5r3* и *L116* с помощью антител на *L116*. *Tom20* был использован в качестве контроля нанесения. (б) Активность комплексов I-IV в мутантных клетках *Cyb5r3_{mito}*, *Cyb5r3_{mito}* с инактивацией *L116* и *Cyb5r3_{mito}* с суперэкспрессией *L116*. Представленные значения являются средним для 4 независимых экспериментов (3 технические реплики каждый). Для статистически достоверного изменения указан уровень вероятности с поправкой на множественное сравнение ($p < 0.05$, *t*-тест Стюдента, поправка Холма-Сидака). Данные представлены как среднее \pm SD.

Инактивация гена 1500011k16Rik приводит к изменению липидного состава клеток

Существует два важных процесса, в которых принимает участие мембранная форма *Cyb5r3*: образование $\Delta 9$ двойной связи в гидрофобном хвосте жирных кислот и биосинтез холестерина. Для того, чтобы оценить влияние пептида *L116* на активность *Cyb5r3* в липидном метаболизме, было решено сравнить полный липидный состав клеток дикого типа и нокаутных по *L116*. Работа была выполнена совместно с научной группой профессора Хайтовича Сколковского института науки и технологии. В результате эксперимента были получены данные о представленности в клетках более чем тысячи липидов для каждой клеточной линии. Количество около сотни липидов значительно (Рисунок 7а) и воспроизводимо (Рисунок 7б) меняются при удалении *L116*. Большинство триглицеридов (TAG) повышается, тогда как количество фосфолипидов снижается при инактивации *L116*. Эти результаты воспроизводятся также в клеточной линии NS0 при инактивации гена *L116* (Рисунок 7в).

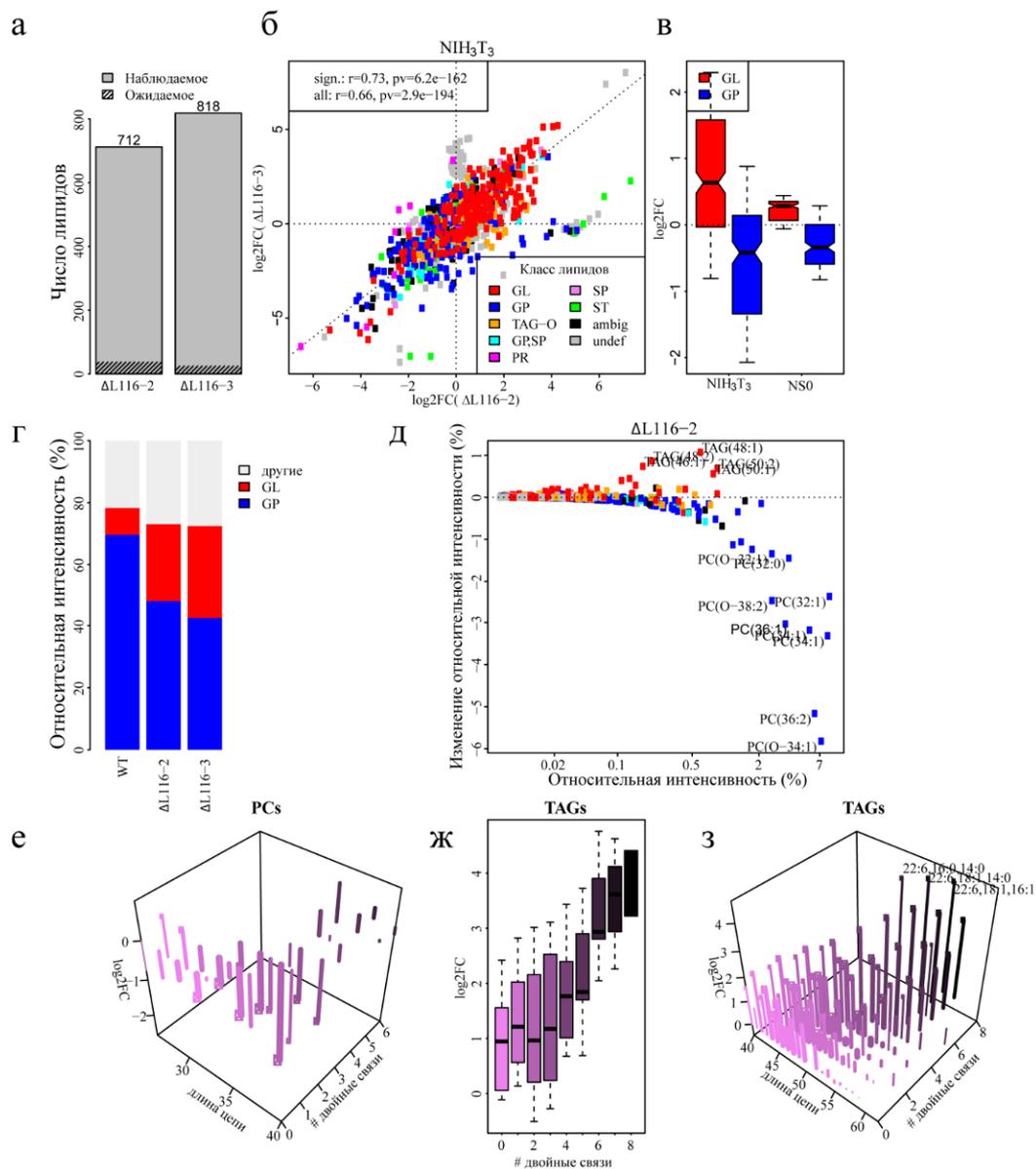


Рисунок 7. (а) Число липидов статистически достоверно изменяющихся в нокаутных по L116 линиях $\Delta L116-2$ и $\Delta L116-3$, случайное ожидание показано штриховкой. (б) Корреляция изменений липидного состава между $\Delta L116-2$ и $\Delta L116-3$. Различные цвета обозначают различные классы липидов: глицеролипиды, глицерофосфолипиды, 1-алкил-2,3-ацилглицериды, сфинголипиды, пренолы, стеролы. Липиды, значительно изменяющиеся в обоих нокаутах, показаны заполненными кружками. (в) Распределение представленности классов глицеролипидов (красный) и глицерофосфолипидов (синий) в клетках линий NIH3T3 и NS0 без L116 относительно контрольных изогенных линий с интактым L116. (г) Относительная интенсивность (количество) глицеролипидов (красный), глицерофосфолипидов (синий) и других липидов (серый) в NIH3T3 и нокаутных по L116 линиях. (д) Связь между относительной интенсивностью (количеством) липидов в диком типе (по оси x) и изменением относительной интенсивности (количества) в линии $\Delta L116-2$ (ось y). (е и з) Зависимость степени изменения количеств представителей классов

фосфатидилхолина (е) или триглицеридов (з) в $\Delta L116-2$ и $\Delta L116-3$ (по оси z) от общей длины цепи (по оси x) и количества двойных связей (ось y и цвет). Точный состав цепей жирной кислоты показан для трех TAG с наибольшим изменением. Концентрация TAG и PC в диком типе показана шириной линии (в масштабе шкалы). Липиды со статистически значимыми изменениями отмечены кружком в конце линии. Статистическая значимость была определена с помощью t-теста Стюдента ($p < 0.05$, поправка Бенджамини-Хохберга). (ж) Распределение изменений количества триглицеридов (TAG) в зависимости от общего числа двойных связей.

Несмотря на то, что фосфатидилхолины (PC) являются одной из наиболее представленных групп липидов в используемых в нашей работе клеточных линиях, их количество значительно уменьшается (порядка 20%) при инактивации гена L116 (Рисунок 7г, д). Фосфатидилхолины, содержащие относительно длинные цепи с 1-3 ненасыщенными связями, изменяются больше всего (Рисунок 7е). В противоположность фосфатидилхолинам, количество триглицеридов повышается в нокаутных по L116 клетках (Рисунок 7ж). Стоит отметить, что в основном это либо короткие, либо полиненасыщенные триглицериды. Больше всего изменяется триглицериды с числом атомов углерода и ненасыщенных связей 52:6, 54:7 и 56:8 (Рисунок 7з). MS-MS анализ показал, что все они содержат в качестве ацильной группы докозагексаеновую кислоту.

Для того чтобы проверить, что L116 влияет на липидный состав клеток через взаимодействие с Sub5r3, мы сравнили клеточный состав липидов клеток дикого типа, с инактивацией L116 и с инактивацией митохондриальной формы Sub5r3.

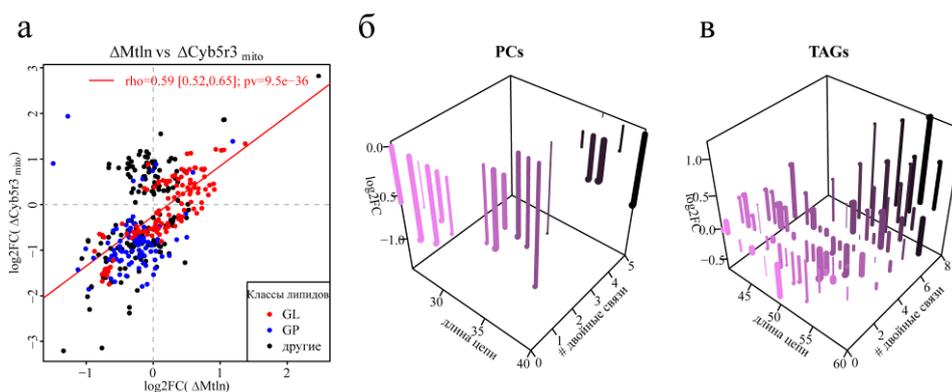


Рисунок 8. (а) Взаимосвязь между \log_2 изменениями, вызванными инактивацией L116 (ось x) и удалением митохондриальной формы Sub5r3 (ось y), по сравнению с диким типом. Каждая точка представляет один липид, глицеролипиды (GL), глицерофосфолипиды (GP) и другие классы липидов показаны красным, синим и черным соответственно. Линия регрессии наименьшего квадрата показана красным. Коэффициент корреляции Пирсона, 95% доверительный интервал и значение p (t-критерий)

показаны в верхнем левом углу. Зависимость степени изменения количеств различных видов фосфотидилхолина (б) или триглицеридов (в) в $\Delta\text{Cub5r3}_{\text{mito}}$ (по оси z) от общей длины цепи (по оси x) и количества двойных связей (ось y и цвет). Концентрация TAG и PC в диком типе показана шириной линии (в масштабе шкалы). Липиды со статистически значимыми изменениями отмечены кружком в конце линии. Статистическая значимость была определена с помощью t-теста Стюдента ($p < 0.05$, поправка Бенджамини-Хохберга).

Результаты эксперимента показали, что изменения в липидном составе клеток нокаутных по L116 хорошо коррелируют с изменениями в мутантных клетках $\Delta\text{Cub5r3}_{\text{mito}}$ (Рисунок 8а). Мы наблюдаем такую же тенденцию изменения фосфотидилхолинов и триглицеридов, как и в случае удаления L116 (Рисунок 8б, в). Возможно, именно изменение липидного состава клеток опосредованно влияет на активность комплекса I дыхательной цепи при инктивации гена 1500011k16Rik.

Заключение

В настоящей работе было впервые доказано, что пептид L116 присутствует как в клетках, так и в живом организме. L116 локализуется в митохондриях, и его удаление приводит к уменьшению активности комплекса I дыхательной цепи. Данный эффект можно объяснить тем, что L116 может регулировать работу Cub5r3, которая принимает участие в липидном метаболизме.

Выводы

1. Пептид L116 присутствует как в клеточных линиях, так и в живом организме.
2. L116 локализуется в митохондриях.
3. L116 взаимодействует с цитохром b5 редуктазой 3.
4. При инактивации гена пептида L116 и нарушении митохондриальной локализации *Cyb5r3*, активность комплекса I в клетке уменьшается.
5. В нокаутных клетках по L116 и митохондриальной *Cyb5r3* происходят изменения в липидном составе клеток, что скорее всего, является причиной уменьшения активности комплекса I.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus и WoS:

- 1) **Chugunova A.**, Loseva E., Mazin P., Mitina A., Navalayeu T., Bilan D., Vishnyakova P., Marey M., Golovina A., Serebryakova M., Pletnev P., Rubtsova M., Mair W., Vanyushkina A., Khaitovich P., Belousov V., Vysokikh M., Sergiev P. and Dontsova O. LINC00116 codes for a mitochondrial peptide linking respiration and lipid metabolism. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019. V. 116. pp. 4940-4945. IF 9, 504.
- 2) Smirnova V., Shestakova E., Bikmetov D., **Chugunova A.**, Osterman I., Serebryakova M., Sergeeva O., Zatsepin T., Shatsky I., Terenin I. eIF4G2 balances its own mRNA translation via a PCBP2-based feedback loop. // *RNA*. 2019. V. 25(7) pp. 757-767. IF 3,949
- 3) Petrova O., Mantsyzov A., Rodina E., Efimov S., Hackenberg C., Hakanpaa J., Klochkov V., Lebedev A., **Chugunova A.**, Malyavko A., Zatsepin T., Mishin A., Zvereva M., Lamzin V., Dontsova O. and Polshakov V. Structure and function of the N-terminal domain of the yeast telomerase reverse transcriptase. // *Nucleic Acids Res*. 2018. V. 46. pp. 1525-1540. IF 11,567.
- 4) **Chugunova A.**, Navalayeu T., Dontsova O., Sergiev P. Mining for Small Translated ORFs. // *J Proteome Res*. 2018. V. 17. pp. 1-11. IF 3,950.
- 5) **Chugunova A.**, Dontsova O. and Sergiev P. Methods of Genome Engineering: a New Era of Molecular Biology. // *Biochemistry (Mosc)*. 2016. V. 81. pp. 662-677. IF 1,724.

Тезисы докладов и материалы конференций:

- 1) **Chugunova A.**, Navalayeu T., Loseva E., Pletnev P., Vysokikh M., Osterman I., Sergeeva O., Sergiev P., Dontsova O. LncRNA-encoded short peptide is a functionally important component of mitochondria.// *The FEBS Journal* 284 (Suppl. 1) (2017) 70–99 DOI: 10.1111/febs.14171