

МУТАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНО КОДИРУЕМОГО ГЕНА NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЕ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Погонялова М.Ю., Кузнецова Е.А., Микенькина М.А., Винокуров А.Ю.

Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники
ОГУ имени И.С. Тургенева, Орел, Российская Федерация

Актуальность. Митохондрии содержат свой собственный геном, образованный митохондриальной ДНК (мтДНК), которая имеет отличные от ядерной ДНК структуру и код [2]. Наследуемая по материнской линии мтДНК содержит 37 генов, 13 из которых кодирует полипептиды, входящие в состав дыхательной цепи митохондрий [1]. Мутации мтДНК могут приводить к различным заболеваниям, что зависит от локализации мутаций, от их сочетания и уровня гетероплазии. Последний может варьироваться в широких пределах, и проявление болезни зависит от процента аллелей, несущих мутации, что позволяет предположить существование порогового уровня содержания мутаций в клетках, при превышении которого происходит изменение функции митохондрий [3]. Изучение зависимости митохондриального метаболизма от повреждений мтДНК требует выбора адекватного параметра, соответствующего цели исследования. В этом плане интегральным показателем является величина митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), который формируется за счет транспорта протонов через комплексы I, III и IV электронотранспортной цепи (ЭТЦ) [4]. NADH-дегидрогеназный комплекс является первым участком дыхательной цепи митохондрий, через который электроны передаются на убихинон. Данный ферментный комплекс образуется путем интегрированной сборки белковых субъединиц, часть которых закодировано в мтДНК [5]. В аспекте направления наших исследований NADH-дегидрогеназа представляет особый интерес, так как этот комплекс осуществляет окисление NADH с передачей электронов в ЭТЦ, образование протонов водорода, а также перенос последних через внутреннюю митохондриальную мембрану против градиента концентрации [6].

Цель исследования. Целью настоящего исследования являлось определение влияния конкретных мутаций мтДНК и уровня их гетероплазии на изменение $\Delta\Psi_m$ и состояние НАДН.

Материалы и методы. Объектами исследования выступали цибридные линии на основе клеток THP-1 (TCP-521, TCN-521, TCI-521, HSM1, HSM2, LSM1, LSM2, HSMAM1, HSMAM2, HSMAM3). Каждая из них имеет от 5 до 10 мутаций митохондриальной ДНК, затрагивающих гены первой (t3336c, уровень гетероплазии варьируется в интервале 2-52%), второй (c5178a, 37-50%), пятой (g13513a, 10-25%) и шестой (g14459a, 29-52%) субъединиц I комплекса, третьей субъединицы (g15059a, 39-55% и g14846a, 34-50%) III комплекса ЭТЦ, а также 12S рРНК (del652g, 0,65-2% и a1555g, 0,25-10%) и тРНК_{Лей} (c3256t, 0,81-8%). Изучение биоэнергетических параметров мутантных клеток проводили на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 900, а также на установке возбуждения и регистрации флуоресценции Cairn Research Ltd на базе флуоресцентного микроскопа Olympus IX73P1F. Оценку величины $\Delta\Psi_m$ проводили на основе интенсивности флуоресценции зонда TMRM с рабочей концентрацией раствора 25 нМ. Эксперимент проводили с использованием лазерного излучения с длиной волны 561 нм в режиме. Для изучения механизма поддержания $\Delta\Psi_m$ проводили регистрацию интенсивности флуоресценции зонда TMRM во времени с записью базового сигнала с последующим добавлением олигомицина (5 мкг/мл), ротенона (3 мкМ) и FCCP (1

мкМ). При оценке величины $\Delta\Psi_m$ в режиме «Z-stack» получали 5 оптических срезов отдельных клеток. Для анализа использовали оптический срез с наибольшей интенсивностью флуоресценции, величину которой использовали для сравнительной оценки $\Delta\Psi_m$ в клетках. Для оценки состояния НАДН по величине автофлуоресценции были использованы раствор FCCP (1 мкМ) для максимального увеличения дыхания и раствор ротенона (2 мкМ) для блокирования I комплекса. Сначала регистрировали базовый уровень флуоресценции при возбуждении на длине волны 360 нм, затем проводили добавление FCCP и ротенона с последующей регистрацией происходящих изменений. Значение пула рассчитывали как разницу между максимальным значением после внесения ингибитора I комплекса и минимальным в ответ на введение разобщителя.

Вывод. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о незначительном вкладе I комплекса в поддержание $\Delta\Psi_m$ во всех линиях цитоплазматических гибридов, что подтверждается слабым ответом на введение ингибитора I комплекса, ротенона (для линий THP-1-28%, TCP-521-12%, TCN-521-27%, TCI-521-13%, HSM2-21%, LSM1-13%, LSM2-21%, HSMAM1-8%, HSMAM2-18%, HSMAM3-24%). У THP-1 данный показатель также находится на низком уровне, что может быть связано с уровнем гетероплазмии, так как в случае некоторых мутаций эти значения у клеток THP-1 даже выше, чем у других линий.

При этом между исследованными линиями клеток существует значительная разница по $\Delta\Psi_m$, которая, вероятно, зависит от мутаций мтДНК. Методом регрессионного анализа выявлена отрицательная корреляция между величиной $\Delta\Psi_m$ и мутацией g13513a в гене 5-й субъединицы комплекса I (коэффициент корреляции Спирмена составил -0,54; $p=0,22$). При относительно низком уровне гетероплазмии в данном гене наблюдается высокое значение потенциала. С увеличением доли мутантных по этим субъединицам молекул мтДНК происходит снижение $\Delta\Psi_m$. При этом наблюдается наличие порогового значения гетероплазмии, равного 12,72%, выше которого мутация проявляется в фенотипе клетки. Можно предположить, что 5-я субъединица оказывает очень значительное влияние на работу всего комплекса I за счет особенностей своего строения. Она имеет сложное строение, включающее гидрофильный фрагмент, находящийся в матриксе митохондрий. И имеются данные о том, что именно ввиду такой особенности строения данная субъединица обладает некоторым регуляторным эффектом [7].

С учетом того, что на I комплексе происходит процесс окисления НАДН, то важным критерием оценки его функционирования, который может позволить дать дополнительную характеристику выявленной дисфункции, служит пул НАДН. Используемые в эксперименте клеточные линии демонстрируют снижение данного показателя в сравнении с материнской линией THP-1. Представленные по НАДН данные могут свидетельствовать о различных нарушениях в клетках, одним из которых может являться недостаток субстрата I комплекса вследствие нарушения транспорта через плазматическую мембрану, а также внутри клетки, его расходования на другие внутриклеточные процессы или нарушения в восстановлении НАДН в матриксе митохондрий. Эксперимент с предварительным инкубированием клеток с пируватом (20 мМ), который характеризуется высокой способностью проникать через мембрану, а также при метаболизме которого образуется НАДН, показал, что в большинстве линий пируват не оказывает влияния на величину $\Delta\Psi_m$, что позволяет сделать предположение о незначительной роли возможного дефицита субстрата в развитии митохондриальной патологии. Можно сделать вывод о том, что в данных клетках присутствуют обусловленные мутацией гена 5-й субъединицы НАДН-

дегидрогеназы структурные нарушения, приводящие к развитию митохондриальной дисфункции.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00317.

Список литературы

1. Blier P.U., Dufresne F., Burton R.S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation // *TRENDS in Genetics*. – 2001. – Т. 17. – N 7. – P. 400-406.

2. Stewart J.B., Chinnery P.F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease // *Nature Reviews Genetics*. – 2015. – Т. 16. – N 9. – P. 530-542.

3. Sobenin I.A. et al. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome: perspectives in diagnostics and methodological pitfalls // *BioMed research international*. – 2014. – Т. 2014.

4. Adam-Vizi V., Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species // *Trends in pharmacological sciences*. – 2006. – Т. 27. – N 12. – CP 639-645.

5. Carelli V., Giordano C., d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction // *TRENDS in Genetics*. – 2003. – Т. 19. – N 5. – P. 257-262.

6. Cadonic C., Sabbir M.G., Albeni B.C. Mechanisms of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease // *Molecular neurobiology*. – 2016. – Т. 53. – N 9. – P. 6078-6090.

7. Wirth C. et al. Structure and function of mitochondrial complex I // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2016. – Т. 1857. – N 7. – P. 902-914.