

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МАТРИКСЕ И ТРАНСМЕМБРАННОМ ПРОСТРАНСТВЕ МИТОХОНДРИЙ*

Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров

*Лаборатория клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники
Орловского государственного университета им. И. С. Тургенева*

✉ rennda@yandex.ru

Аннотация

При исследовании цитоплазматических гидридов получены данные о роли природы, сочетания и степени выраженности мутаций митохондриального генома на продукцию активных форм кислорода (АФК). Выявлено ингибирование образования супероксиданиона в трансмембранном пространстве комплексом III и увеличение продукции в матриксе митохондрий за счет мутаций генов комплекса I электронтранспортной цепи (ЭТЦ), а также 12S рРНК и тРНК^{Leu}.

Общая численность ассоциированных с мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК) заболеваний приближается к 400 [1]. С учетом того, что пул мтДНК может содержать одновременно несколько мутаций с различным уровнем гетероплазии, возможность проявления мутаций в фенотипе определяется их сочетанием, локализацией в мтДНК и степенью гетероплазии. Поскольку из 37 содержащихся в мтДНК генов около трети кодирует белки ЭТЦ, нарушения митохондриального генома должны повлечь за собой изменения в уровне продукции АФК [2]. Хотя в норме АФК обеспечивают протекание ряда физиологических процессов, в случае преобладания над антиоксидантной системой они приводят к развитию повреждений клеток [3]. Поэтому являющееся целью настоящей работы выявление влияния природы мутаций мтДНК, их комбинаций и степени гетероплазии на скорость и локализацию продукции АФК является весьма актуальным.

Объектами исследования выступали цибридные линии на основе клеток ТНР-1, каждая из которых имеет от 7 до 10 мутаций мтДНК, затрагивающих гены первой (t3336c), второй (c5178a), пятой (g12315a и g13513a) и шестой (g14459a) субъединиц I комплекса, третьей субъединицы (g15059a и g14846a) III комплекса ЭТЦ, а также 12S рРНК (del652g и a1555g) и тРНК^{Leu} (c3256t).

Оценку продукции АФК в матриксе митохондрий проводили с использованием зонда MitoTracker Red CM-H2Xros (500 нМ) и конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 при длине волны возбуждения 561 нм, уровня цитозольных АФК — зонда дигидроэтидий (HEt) при концентрации 5 мкМ на флуоресцентном микроскопе с детекцией интенсивности флуоресценции окисленной (длина волны возбуждения — 530 нм) и восстановленной форм (360 нм) зонда.

Исследованные цибриды характеризуются пониженной относительно ТНР-1 скоростью окисления HEt. В наибольшей степени это ассоциировано с мутацией g14846a, уровни гетероплазии которой 24, 26 и 28 % вызывают снижение продукции цитозольных АФК на 20, 26 и 34 % соответственно. Более низкие уровни гетероплазии по данной мутации значительного эффекта не оказывают, что говорит о существовании порогового значения проявления в фенотипе нарушений мтДНК. Также 39- и 33-процентное снижение окисления HEt связано с мутацией t3336c с уровнем гетероплазии соответственно 37 и 14 %. В остальных линиях снижение продукции цитозольных АФК не превышает 24 % и определяется целой совокупностью мутаций субъединиц комплекса I ЭТЦ. В этом случае, видимо, речь идет о дисфункции НАДН-дегидрогеназы, приводящей к уменьшению потока электронов через ЭТЦ. Все рассмотренные мутации являются причиной снижения уровня утечки электронов с комплекса III с образованием в трансмембранном пространстве АФК, которые можно зарегистрировать с помощью HEt.

Практически все цибриды характеризуются повышенной (от 25 до 600 %) относительно ТНР-1 продукцией АФК в матриксе митохондрий, что в наибольшей степени коррелирует с мутациями g12315a и g13513a при высоком уровне гетероплазии мутаций в генах элементов системы синтеза белков (прежде всего мутаций c3256t в гене тРНК^{Leu} и del652g с уровнем гетероплазии выше 10 и 19 % соответственно). В целом увеличение скорости образования АФК в матриксе митохондрий можно рассматривать как следствие дисфункции НАДН-дегидрогеназы и утечки электронов с образованием супероксиданиона.

Литература

1. Naviaux R.K. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease // *Mitochondrion*. — 2004. — Т. 4. — №. 5-6. — С. 351-361.
2. Zorov D. B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release // *Physiological reviews*. — 2014. — Т. 94. — №. 3. — С. 909-950.
3. Mittler R. ROS are good // *Trends in plant science*. — 2017. — Т. 22. — №. 1. — С. 11-19.

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

© Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров, 2022