

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-205

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ВЛИЯЕТ НА ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА И НЕЙТРАЛИЗАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА МИТОХОНДРИЯМИ<sup>\*</sup>

### LOCALIZATION OF MITOCHONDRIAL DNA MUTATIONS AFFECTS THE PATTERN OF CHANGES IN THE PRODUCTION AND NEUTRALIZATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY MITOCHONDRIA

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

Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет им. И. С. Тургенева

D. Yu. Popov, M. S. Kazakov, E. Yu. Shitikova, A. Y. Vinokurov

*Cell Physiology and Pathology Laboratory, Turgenev Orel State University*

✉ rennda@yandex.ru

#### Аннотация

Механизм влияния мутаций mtДНК на изменение окислительно-восстановительного баланса зависит от их нахождения в геноме. В то время как повреждение гена цитохрома b вызывает снижение скорости утечки электронов в матрикс митохондрий и межмембранные пространство и соразмерное уменьшение содержания восстановленного глутатиона, мутации генов рРНК и тРНК или субъединиц комплекса I приводят к росту образования АФК и дефициту антиоксидантной системы.

#### Abstract

The mechanism of the effect of mtDNA mutations on changes in redox balance depends on their location in the genome. While damage to the cytochrome b gene causes a decrease in the rate of electron leakage into the mitochondrial matrix and intermembrane space and a commensurate decrease in the content of reduced glutathione, mutations of rRNA and tRNA genes or subunits of complex I lead to an increase in AFC formation and deficiency of the antioxidant system.

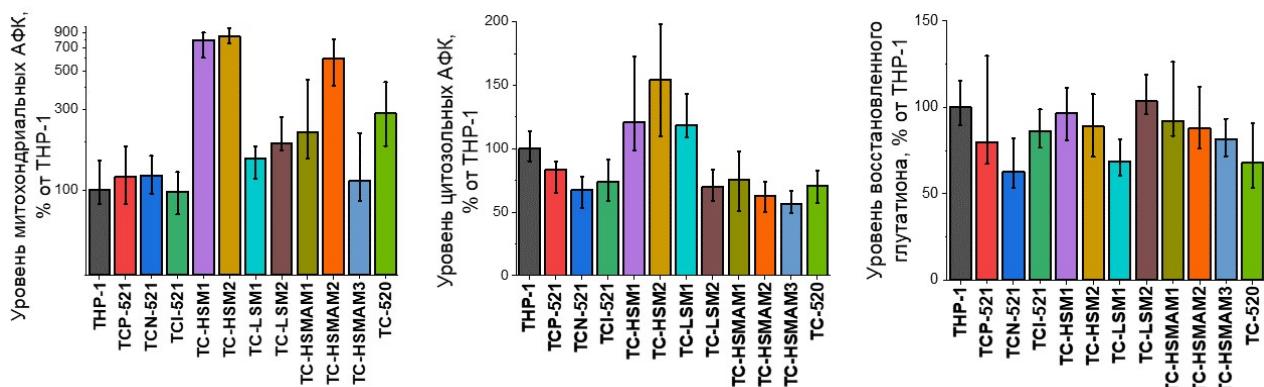
Митохондриальный геном подвержен частым мутациям, поскольку располагается вблизи электронтранспортной цепи (ЭТЦ), являющейся основным местом образования активных форм кислорода (АФК) в клетке. При этом возникающие повреждения имеют тенденцию к закреплению ввиду низкой эффективности системы reparации и чаще всего влияют на экспрессию кодируемых продуктов по причине практического отсутствия в молекуле митохондриальной ДНК (mtДНК) некодирующих участков [1]. В литературе показана связь многих мутаций mtДНК с заболеваниями [2], однако большинство исследований выявляет корреляцию между уровнем гетероплазмии отдельных мутаций и фенотипом без объяснения механизма возникновения патологии. Поскольку mtДНК кодирует субъединицы комплексов ЭТЦ, логично предположить, что мутации в соответствующих генах могут приводить к изменению скорости утечки электронов и, как следствие, нарушению окислительно-восстановительного баланса — соотношения между образованием и нейтрализацией АФК. В связи с этим целью данной работы было выявление степени и направления изменения редокс-баланса в клетках под влиянием различных комбинаций мутаций mtДНК.

Объектами исследования выступали линии цитоплазматических гибридов (цибридов), созданных на базе ТНР-1 с использованием клеток пациентов, страдающих от митохондриальных заболеваний и характеризующихся различными сочетаниями мутаций mtДНК как на качественном (локализация мутаций), так и количественном (степень гетероплазмии) уровне. Уровень цитозольных АФК, которые частично связаны с утечкой электронов с комплекса III ЭТЦ в межмембранные пространство митохондрий, оценивали с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа по скорости изменения соотношения окисленной и восстановленной форм дигидроэтидия (5 мкМ). Уровень митохондриальных АФК, определяемых утечкой электронов в матрикс митохондрий с комплексов I и III ЭТЦ, определяли методом конфокальной микроскопии по скорости изменения флуоресценции MitoTracker Red CM-XRos (500 нМ), который образуется в результате накопления в митохондриях и окисления его восстановленной формы. Для оценки уровня восстановленного глутатиона (GSH) в клетках проводили анализ интенсивности флуоресценции зонда монохлорбиман (50 мкМ), который в результате взаимодействия с GSH образует флуоресцирующие конъюгаты.

\* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-15-00317.

© Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров, 2023

Полученные данные подтверждают предположение о влиянии мутаций на рассматриваемые параметры, которые характеризуются как увеличением, так и уменьшением относительно линии THP-1 (см. рисунок). Это может свидетельствовать о том, что нарушения редокс-баланса и потенциально связанные с ними заболевания могут развиваться за счет различных механизмов.



Изменение параметров окислительно-восстановительного баланса в клетках с множественным мутациями митохондриального генома

Проведенный анализ полученных экспериментальных данных позволил сгруппировать клеточные линии по характеру изменения исследуемых параметров. В случае линий TCP-521, TCN-521, TCI-521 и TC-HSMAM3 наблюдается снижение уровня цитозольных АФК, GSH и статистически незначимое изменение уровня митохондриальных АФК. Эти линии характеризуются наиболее высокими уровня гетероплазмии мутации m.14846G>A в гене MT-CYTB, кодирующем субъединицу комплекса III ЭТЦ. Мы предполагаем, что такие изменения параметров окислительно-восстановительного баланса являются результатом снижения скорости митохондриального метаболизма из-за нарушения работы комплекса III, который играет центральную роль в транспорте электронов митохондрий на цитохром-с-оксидазу [3].

В случае линий TC-HSM1, TC-HSM2 и TC-LSM1 происходит увеличение уровня АФК как в цитозоле клеток, так и в матриксе митохондрий вместе с одновременным снижением уровня GSH. В этих клетках преобладают мутации del652G, m.1555A>G, m.3256C>T и m.12315G>A в генах MT-RNR1, MT-TL1 и MT-TL2, кодирующих митохондриальные рРНК и тРНК. Такие изменения могут быть результатом нарушения соотношения между белками ЭТЦ, а также формируемыми ими комплексами, и увеличением утечки электронов из-за соответствующего нарушения транспорта электронов.

Линии TC-HSMAM1, TC-HSMAM2 и TC-520 показывают рост уровня митохондриальных АФК, а также снижения цитозольных АФК и GSH. Эти линии имеют высокие уровни гетероплазмии мутаций m.3336T>C, m.5178C>A, и m.13513G>A в генах MT-ND1, MT-ND2 и MT-ND5, кодирующих различные субъединицы комплекса I. Очевидно, что вызываемые мутациями изменения приводят к снижению эффективности работы именно НАДН-дегидрогеназного комплекса и соответствующему увеличению утечки электронов в матрикс митохондрий.

### Литература

1. Taanman J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1999. Vol. 1410, № 2. P. 103–123.
2. Mustafa M. F. et al. Pathogenic mitochondria DNA mutations: current detection tools and interventions // *Genes*. 2020. Vol. 11, № 2. P. 192.
3. Ahmad M., Wolberg A., Kahwaji C. I. Biochemistry, electron transport chain. 2022.