

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС КЛЕТОК

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

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

Введение. Число заболеваний, являющихся следствием мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК), на сегодняшний день близится к 400 [1]. С учетом того, что внутриклеточный пул мтДНК может содержать одновременно несколько мутаций с различным уровнем гетероплазмии, возможность проявления мутаций и степень их влияния на фенотип определяются их сочетанием, локализацией в мтДНК и степенью гетероплазмии. Поскольку из 37 содержащихся в мтДНК генов около трети кодирует белки электронотранспортной цепи (ЭТЦ), нарушения митохондриального генома должны повлечь за собой изменения в окислительно-восстановительном балансе клеток, а именно продукции АФК и работе антиоксидантной системы [2]. Хотя в норме АФК участвуют в развитии ряда физиологических процессов, их гиперпродукция может приводить к развитию окислительных повреждений клеток [3]. Последнее является следствием нарушения внутриклеточного редокс-баланса при истощении антиоксидантной системы, одним из основных компонентов которой является восстановленный глутатион (GSH). Его количественное содержание в митохондриях также может быть зависимо от мутаций мтДНК [4].

Цель исследования. В связи с этим целью настоящей работы является выявление влияния природы мутаций мтДНК, их комбинаций и степени гетероплазмии на скорость и локализацию продукции АФК, а также обеспечение редокс-баланса за счет функционирования антиоксидантной системы клетки.

Материалы и методы. Объектами исследования выступали линии цитоплазматических гибридов (цибридов) (TCP-521, TCN-521, TCI-521, TC-HSM1, TC-HSM2, TC-LSM1, TC-LSM2, TC-HSMAM1, TC-HSMAM2, TC-HSMAM3, TC-520, TC-521, TC-522) на основе клеток ТНР-1, каждая из которых имеет от 7 до 9 мутаций мтДНК с различным уровнем гетероплазмии, затрагивающих гены первой (t3336с) (в зависимости от клеточной линии уровень гетероплазмии варьируется в интервале от 2% до 52%), второй (с5178а) (от 38% до 50%), пятой (g13513а) (от 0% до 26%) и шестой (g14459а) (от 30% до 50%) субъединиц I комплекса, цитохрома b (g15059а и g14846а) (g15059а – от 40% до 55%, g14846а – от 34% до 50%) III комплекса ЭТЦ, а также 12S рРНК (a750g и a1555g) (a750g – от 78% до 90,8%, a1555g – от 0% до 11%) и рРНКлей (с3256t) (от 1% до 8%). Оценку скорости продукции АФК в матриксе митохондрий проводили с использованием зонда MitoTracker Red CM-H2Xros (500 нМ) при длине волны возбуждения 561 нм. Перед проведением исследования клетки инкубировали в растворе зонда в течение 10 минут. Оценку содержания в клетках GSH проводили с использованием зонда монохлорбиман (MBC), с рабочей концентрацией 50 мкМ. Зонд образует с низкомолекулярными тиолами способные к флуоресценции конъюгаты (длина волны возбуждения 405 нм). В качестве меры содержания GSH использовали среднее значение флуоресценции в клетке. Анализ проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе ZEISS LSM 900. Для анализа уровня образования цитозольных АФК применяли зонд дигидроэтидий (HEt). Исследование проводили в 5 мкМ растворе HEt без предварительного инкубирования клеток, чтобы избежать токсического эффекта продуктов его окисления. Для измерения интенсивности флуоресценции окисленной (длина волны возбуждения – 530 нм) и восстановленной форм (360 нм) зонда использовали установку Cairn Research Ltd на базе флуоресцентного микроскопа Olympus IX73P1F.

Результаты. Как показали выполненные исследования, использованные в работе цибриды характеризуются как пониженной, так и повышенной относительно TNP-1 скоростью окисления NEt, что, вероятно, определяется различной активностью митохондрий. Вклад последних на продукцию АФК в цитоплазме опосредовано функционированием кодируемых яДНК моноаминоксидаз, а также утечкой электронов с III комплекса ЭТЦ. Проведенный анализ позволил сделать вывод о наличии достаточно высокой корреляции между увеличением образования цитозольных АФК и ростом степени гетероплазмии мутации g15059a, влияющей на комплекс III ЭТЦ (значение коэффициента корреляции Спирмена составило 0,51, $p=0,08$). Это объясняется тем, что данная мутация приводит к замене кодирующего глицин триплета на стоп-кодон, в результате чего происходит потеря 244 из 380 аминокислот С-конца цитохрома b [5]. Вероятно, такое сильное повреждение структуры III комплекса сказывается на его функциональности, а именно на переносе электронов в рамках Q-цикла, нарушение которого приводит к усилению образования супероксиданиона в Qo-центре цитохрома b. Причем такое нарушение носит хронический характер, то есть постоянно повышенный относительно нормального, уровень продукции АФК приводит к увеличению роли антиоксидантной системы клетки, которая ввиду стабильной гиперпродукции АФК вынуждена поддерживать повышенный уровень антиоксидантов. Это предположение находит подтверждение в полученных нами данных по содержанию GSH в клетках, которое положительно коррелирует с повышением уровня гетероплазмии мутации g15059a (коэффициент корреляции Спирмена составил 0,55, $p=0,04$). Помимо этого, вклад митохондрий в цитозольную продукцию АФК также контролируется мутацией субъединиц НАДН-дегидрогеназного комплекса, в частности мутации g13513a субъединицы V. Увеличение степени гетероплазмии указанной мутации приводит к снижению выделения митохондриями супероксиданиона в трансмембранное пространство (коэффициент корреляции Спирмена составил -0,61, $p=0,1$) при превышении порогового значения, составляющего 12,7%. Субъединица V комплекса I находится в гидрофобной его части, выполняя функцию транспорта протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. Однако она отличается от других аналогичных по функционалу субъединиц наличием гидрофильного участка, выступающего в матрикс митохондрий и, по мнению ряда исследователей, обеспечивающего структурную стабильность мембранного плеча и, следовательно, НАДН-дегидрогеназы в целом [6]. Можно предположить, что при мутации g13513a происходит ингибирование комплекса I и снижение интенсивности потока электронов через ЭТЦ, что, соответственно, уменьшает и их утечку с цитохром-bc1-комплекса. Важно отметить, что нарушение баланса между скоростью высвобождения электронов в результате окисления НАДН и скоростью их передачи на убихинон и далее на комплекс III приводит к большей утечке электронов с НАДН-дегидрогеназы в матрикс митохондрий. Это подтверждается выявленной прямой зависимостью между степенью гетероплазмии мутации g13513a и образованием митохондриальных АФК (коэффициент корреляции Спирмена составил 0,78, $p=0,03$).

Выводы. Выявлено увеличение производства цитозольных активных форм кислорода с увеличением степени гетероплазмии мутации g15059a, нарушающей целостность структуры цитохрома b. Также обнаружено увеличение продукции митохондриальных АФК, а также уменьшение производства цитозольных в ответ на повышение степени гетероплазмии мутации g13513a, изменяющей нуклеотидную последовательность гена, кодирующего субъединицу V комплекса I электронотранспортной цепи митохондрий.

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

Список литературы

1. Naviaux R.K. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease // *Mitochondrion*. – 2004. – Т. 4. – N 5-6. – P. 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. – N 3. – P. 909-950.
3. Mittler R. ROS are good // *Trends in plant science*. – 2017. – Т. 22. – N 1. – P. 11-19.
4. Da Hye Kwon. Protective Effect of Glutathione against Oxidative Stress-induced Cytotoxicity in RAW 264.7 Macrophages through Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor-2/Heme Oxygenase-1 Pathway // *MDPI* – 2019. – P. 1-17.
5. Andreu A.L. et al. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 1999. – Т. 45. – N 1. – P. 127-130.
6. 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.