Изменение уровня митохондриального мембранного потенциала при дисфункции дыхательной цепи, вызванной мутациями мтДНК

Попов Д.Ю.[1]*, Погонялова М.Ю.[1], Винокуров А.Ю.[1]
[1]*ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»;*
rennda@yandex.ru

Введение. Мутации митохондриальной ДНК могут оказывать различное воздействие на биоэнергетику клеток, в частности на величину митохондриального мембранного потенциала (ΔΨm), снижение или увеличение которого негативно сказывается на клеточной жизнеспособности и может быть причиной развития патологий [1]. Снижение ΔΨm приводит к конденсации матрикса и попаданию цитохрома с в межмембранное пространство, запуску апоптоза [2]. Увеличение ΔΨm приводит к гиперпродукции активных форм кислорода, которые вызывают повреждения не только в митохондриях, но и во всей клетке в целом [3].

Целью настоящего исследования являлось определение влияния мутаций митохондриальной ДНК на изменение и механизм поддержания ΔΨm.

Материалы и методы. Объектами исследования выступали линии цитоплазматических гибридов на основе клеток THP-1, каждая из которых имеет от 5 до 10 мутаций мтДНК.

Изучение величины ΔΨm, а также состояние митохондриального ФАД проводили на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 900. Для оценки уровня ΔΨm клетки инкубировали в 25 нМ растворе TMRM в среде Хенкса в течение 45 мин при 37 °C без отмывки. Регистрацию интенсивности флуоресценции TMRM во времени проводили с записью базового сигнала с последующим добавлением СССР (2 мкМ). Величину ΔΨm оценивали по изменению интенсивности флуоресценции. Общее митохондриальное содержание, скорость восстановления ФАД, а также отношение ФАДН2/ФАД оценивали на основании автофлуоресценции при использовании длины волны возбуждения 488 нм. Для перевода кофермента в полностью окисленную или восстановленную форму использовали СССР (2 мкМ) и азид натрия (10 мМ) соответственно.

Исследование состояния НАДН проводили на широкопольном флуоресцентном микроскопе с флюоритовым иммерсионным объективом x20 с использованием возбуждающего излучения ксеноновой дуговой лампы. Регистрацию автофлуоресценции осуществляли в интервале длин волн 430-480 нм при использовании возбуждающего излучения с длиной волны 340 нм. Для оценки митохондриального содержания, скорости восстановления НАД, а также соотношения НАДН/НАД были использованы СССР (10 мкМ) для максимального увеличения дыхания и раствор ротенона (10 мМ), блокирующего комплекс I дыхательной цепи. Числовые данные представлены в виде (медиана [Q1;Q3], число проанализированных клеток). Приведенные в % значения нормированы на медиану THP-1.

Результаты. Снижение ΔΨm относительно THP-1 (100% [86%; 119%], N=45) в мутантных клетках линий HSM1 (76% [55%; 108%], N=48) и MAM3 (72% [56%; 91%], N=60) может быть результатом увеличенного уровня гетероплазмии мутации в гене тРНКЛей (44 и 32% соответственно). Снижение ΔΨm объясняется тем, что мутации в гене тРНКЛей нарушают конформацию и стабильность тРНК, эффективность реакции аминоацилирования. Мутации тРНК могут приводить к нарушениям механизма трансляции и, соответственно, к изменению синтеза митохондриального белка, что ведет к снижению активности комплексов I и V дыхательной цепи [4-6]. Однако в линиях MAM1 (120% [95%; 156%], N=44) и MAM2 (117% [76%; 257%], N=54) наблюдается повышение уровня ΔΨm при степени гетероплазмии мутации гена тРНКЛей 23 и 25% соответственно. Это может объясняться включением компенсаторных механизмов поддержания ΔΨm, которые в зависимости от набора мутаций и уровня гетероплазмии могут отличаться. В случае линии MAM2 таким механизмом поддержания ΔΨm выступает более активная работа комплекса II ЭТЦ, что подтверждается сниженным соотношением FADH2/FAD (0,66 [0,44; 1,99], N=48) соотношением и высокой скоростью образования FADH2 (253% [121%; 372%], N=99). В цибридной линии MAM1 обнаружено высокое соотношение FADH2/FAD (2,65 [1,28; 3,91], N=36), сниженное содержание митохондриального FAD (70% [58%; 91%], N=59), а также низкая скорость образования FADH2 (110% [56%; 156%], N=49), что свидетельствует о сниженной работе комплекса II ЭТЦ. В этой линии механизм поддержания ΔΨm может быть связан с большим вкладом комплекса I ЭТЦ (NADH/NAD (0,28 [0,18; 0,38], N=102)), что может объясняться высоким уровнем гетероплазмии (68%) мутации в 5 субъединице комплекса I, которая, по литературным данным, отрицательно коррелирует с развитием атеросклероза [7, 8].

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

1. Zorova L. D. et al. Mitochondrial membrane potential //Analytical biochemistry. – 2018. – Т. 552. – С. 50-59.

2. Gottlieb E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis //Cell Death & Differentiation. – 2003. – Т. 10. – №. 6. – С. 709-717.

3. Zorova L. D. et al. Functional significance of the mitochondrial membrane potential //Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2018. – Т. 12. – С. 20-26.

4. Lin Y. et al. A mitochondrial myopathy-associated tRNASer (UCN) 7453G> A mutation alters tRNA metabolism and mitochondrial function //Mitochondrion. – 2021. – Т. 57. – С. 1-8.

5. Martín-Jiménez R. et al. Clinical and cellular consequences of the mutation m. 12300G> A in the mitochondrial tRNALeu (CUN) gene //Mitochondrion. – 2012. – Т. 12. – №. 2. – С. 288-293.

6. Zhou M. et al. A hypertension-associated mitochondrial DNA mutation alters the tertiary interaction and function of tRNALeu (UUR) //Journal of Biological Chemistry. – 2017. – Т. 292. – №. 34. – С. 13934-13946.

7. Sazonova M. A. et al. Association of mutations in the mitochondrial genome with the subclinical carotid atherosclerosis in women //Experimental and Molecular Pathology. – 2015. – Т. 99. – №. 1. – С. 25-32.

8. Sazonova M. A. et al. Mosaicism of mitochondrial genetic variation in atherosclerotic lesions of the human aorta //BioMed research international. – 2015. – Т. 2015.

****

Изучение механизмов митохондриального разобщения аналогами бутил(трифенил)фосфония с заместителями в фенильных кольцах

Рокицкая Т.И.[1]*, Хайлова Л.С.[1], Коршунова Г.А.[1], Антоненко Ю.Н.[1]

[1]*НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова;*

rokitskaya@genebee.msu.ru

В последние годы активно синтезируются и изучаются конъюгаты биологически важных молекул с липофильными катионами для увеличения электрофоретического накопления таких соединений в митохондриях клеток. Одними из наиболее известных митохондриально-направленных соединений являются конъюгаты трифенилфосфония с антиоксидантами убихиноном или пластохиноном ковалентно сшитые с помощью углеводородного децильного линкера, MitoQ и SkQ1, соответственно. Было обнаружено, что кроме антиоксидантного действия MitoQ, SkQ1 и не содержащие хинон алкил(трифенил)фосфониевые катионы вызывают разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования на митохондриях, благодаря протонофорному действию ионной пары: липофильный катион – анион жирной кислоты [1] или индукции неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий [2].

Ранее мы показали, что константа скорости флип-флопа аналогов додецил(трифенил)фосфония [3] и проницаемость аналогов бутил(трифенил)фосфония (C4TPP-X) значительно зависят от заместителей в фенильных кольцах [4]. Поэтому можно ожидать значительных различий в протонофорной активности ионной пары - аналога бутил(трифенил)фосфония и жирной кислоты в модельных и биологических липидных системах.

На выделенных митохондриях печени крысы C4TPP-X катионы приводили к увеличению скорости дыхания и уменьшению потенциала внутренней мембраны. Эффективность этих процессов значительно увеличивалась в присутствии пальмитата и коррелировала с коэффициентом распределения в системе октанол – вода для липофильных катионов. Способность C4TPP-X катионов индуцировать протонный транспорт через липидную мембрану липосом, нагруженных pH-чувствительным флуоресцентным красителем пиранином, также возрастала с увеличением их липофильности и зависела от присутствия пальмитиновой кислоты в мембранформирующем составе. Из всех изученных катионов только бутил [три(3.5-диметилфенил)]фосфоний (C4TPP-diMe) оказался способным индуцировать транспорт протонов через плоские бислойные липидные мембраны и липосомы по механизму образования ионной пары (катион – жирная кислота). Скорость потребления кислорода митохондриями при добавлении C4TPP-diMe увеличивалась до максимальных значений, характерных для обычных разобщителей. В присутствии остальных катионов скорость дыхания митохондрий была существенно меньше. Наиболее липофильные катионы ряда C4TPP-X в высоких концентрациях приводили к набуханию выделенных митохондрий печени крысы в средах, содержащих хлорид калия или сахарозу. Мы предполагаем, что изученные C4TPP-X катионы, за исключением C4TPP-diMe в низких концентрациях, вызывают неспецифическую утечку неорганических ионов через модельные липидные и биологические мембраны, которая увеличивается в присутствии жирных кислот. Таким образом, разобщение дыхания и фосфорилирования митохондрий происходит в основном по механизму, подобному детергентному.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ №23-24-00038.

[1] Severin, F.F. et al. Penetrating Cation/Fatty Acid Anion Pair As a Mitochondria-Targeted Protonophore. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010, 107, 663-668.

[2] Trendeleva, T. A. et al. Interaction of Tetraphenylphosphonium and Dodecyltriphenylphosphonium With Lipid Membranes and Mitochondria. Biochemistry (Moscow). 2012, 77, 1021-8.