

Изменение активности митохондрий в присутствии перспективных лекарственных средств

Загрядская Ю.А.³, Ломакина Г.Ю.^{1,2}, Охрименко И.С.^{3*}

¹*Химический факультет, Кафедра химической энзимологии, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*

²*Факультет Фундаментальные науки, МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия;*

³*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), МФТИ, Долгопрудный, Россия;*
ivan.okhrimenko@phystech.edu

Количество АТФ и скорость продукции АТФ митохондриями человека снижаются в присутствии пептида Аβ(1-42), который, как известно, вовлечён в патогенез болезни Альцгеймера. 1-я экспериментальная группа клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y культивировалась в течение 24 ч в присутствии 200 нМ пептида Аβ мономеризованного по стандартной методике (Jao, 1997; Džinić, 2018), 2-я группа клеток (контрольная) не содержала каких-либо добавок, 3-я группа содержала 0,1% ДМСО (это количество ДМСО добавляли к 1-й группе с Аβ), а 4-ая и 5-ая кроме Аβ соержжала и D-пептиды взаимодействующие с различными формами Аβ и его предшественниками (Bocharov et al., 2021; Van Groen et al., 2008) одно из которых прошло вторую фазу клинических испытаний (Mathew, 2023). После культивирования клеток митохондрии выделяли по стандартной методике (Martin, 1998; Daum, 1982). К изолированным митохондриям добавляли субстраты комплексов I, II и IV и соответствующие ингибиторы комплексов OxPhos - в отдельных экспериментах, чтобы сфокусироваться на изучении изменения активности каждого комплекса, индуцированных Аβ и другими веществами. Непосредственно перед измерениями люминесценции к митохондриям добавляли АДФ и люциферазу с люциферинном (Lomakina, 2022). Для каждой экспериментальной группы строили график люминесценции (RLU) в зависимости от времени. Сравнивали максимальные значения первых производных левых частей полученных колоколообразных кривых (скорость продукции АТФ). Также сравнивали высоты пиков (соответствовали количеству произведённого митохондриями АТФ). Присутствие ДМСО приводило к незначительному снижению количества и скорости продукции АТФ митохондриями человека по сравнению с контрольной группой. Культивирование клеток с Аβ приводит к уменьшению синтеза АТФ митохондриями и к падению скорости синтеза вдвое, когда как присутствие D-пептидов восстанавливает эти показатели до контрольных значений. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-03-2023-106 от 13.01.2023, номер темы FSMG-2021-0002).

Изменение параметров метаболизма в клетках с множественными мутациями мтДНК, ассоциированными с заболеваниями

Винокуров А.Ю.^{1*}, Попов Д.Ю.¹, Погонялова М.Ю.¹, Шитикова Е.Ю.¹, Казаков М.С.¹, Кузнецова Е.А.¹
¹*Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева;*
tolmach_88@mail.ru

Митохондрии (МХ) играют ключевую роль в развитии большинства внутриклеточных процессов. Генетическая регуляция функционирования МХ определяется как ядерной ДНК (ядДНК), так и митохондриальной ДНК (мтДНК), которая содержит гены 12S и 16S рРНК, тРНК, а также отдельных полипептидов электронтранспортной цепи (ЭТЦ) МХ. В сравнении с яДНК для мтДНК характерен существенно более высокий уровень возникновения мутаций [1,2]. По разным оценкам, частота поражений заболеваниями, которые связаны с мутациями мтДНК составляет около одного случая на 4000-5000 человек [3]. Ввиду наличия в клетке большого количества молекул мтДНК (может достигать нескольких тысяч), симптомы ассоциированных с мутациями патологий, проявляются при уровне гетероплазмии 60-90 % [4, 5]. Однако необходимо отметить, что эти данные получены в результате исследований с содержанием ограниченного (обычно, одна-две) числа мутаций мтДНК в клетке. В то время как ввиду высокой частоты повреждений мтДНК нередки случаи существенно более высокого уровня мутационной нагрузки. И в этом случае возможны различные эффекты взаимодействия, приводящие к изменению фенотипа клеток при существенно более низком уровне гетероплазмии. Молекулярные механизмы проявления мутаций мтДНК изучены в недостаточной степени. Характер изменения синтеза АТФ, митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$), содержания и активности белков ЭТЦ, продукции АФК в различных работах отличается как качественно, так и количественно

(даже при рассмотрении одних и тех же мутаций), что, вероятно, обусловлено как значениями гетероплазмы, так и сочетанием мутаций [6-9]. Таким образом, развитие исследований, целью которых является анализ связи между сложными сочетаниями мутаций мтДНК и проявляющимися на различных уровнях фенотипическими изменениями, является весьма актуальным.

Для достижения этой цели нами используются линии созданных на базе клеток ТНР-1 цибридов и имеющих 5-8 мутаций мтДНК в генах МТ-RNR1, МТ-TL1, МТ-TL2, МТ-СУТВ, МТ-ND1, МТ-ND2, МТ-ND5 и МТ-ND6 с уровнем гетероплазмы от 1% до 68%. На данном этапе выполненные исследования включают анализ набора характеризующих биоэнергетику клеток параметров (уровень и механизм формирования $\Delta\Psi_m$; митохондриальное содержание, соотношение восстановленной и окисленной форм, а также скорость продукции НАДН и ФАДН₂; содержание и скорость потребления АТФ; дыхание клеток; образование АФК; уровень митофагии).

Полученные результаты позволяют сегодня говорить о значительном влиянии исследуемых мутаций на клеточный метаболизм даже несмотря на существенно более низкие в сравнении с указанными для случая присутствия единичных мутаций уровнями гетероплазмы. В частности, мутации генов тРНК_{Лей} оказываются значимыми уже при 20%-ном содержании при одновременном присутствии в клетке мутаций цитохрома b (m.14846G>A) или субъединиц комплекса I ЭТЦ (m.5178C>A, m.14459G>A). Для всех линий характерно значительное снижение уровня АТФ при отсутствии положительной корреляции данного параметра с временем полного исчерпания макроэрга при блокировании путей его биосинтеза. Это свидетельствует о различных причинах дефицита энергии – от нарушений образования АТФ до гиперактивации активно потребляющих его процессов. Представленные в цибридах сочетания мутаций ассоциированы со значительным уровнем разобщения окислительного фосфорилирования, которое может быть способом снижения негативных последствий гиперпродукции АФК как в матрикс МХ, так и межмембранное пространство при дисфункции участников ЭТЦ. Связанные с мутациями генов отдельных белков, а также генов тРНК нарушения работы комплекса I далеко не во всех линиях компенсируются увеличением уровня экспрессии или активности кодируемой яДНК сукцинатдегидрогеназы, что говорит об ограниченности применения субстратов комплекса II как инструмента защиты клеток при наличии мутаций мтДНК. Ряд цибридов характеризуется инверсным режимом функционирования комплекса V ЭТЦ, который позволяет поддерживать уровень $\Delta\Psi_m$ за счет расходования при этом АТФ. Несмотря на выявленные нарушения, некоторые линии цибридов характеризуются дефектной митофагией, приводящей к накоплению нефункциональных органелл. В ряде случаев сочетания мутаций могут приводить к улучшению характеризующих состояние клеток параметров, что наблюдается, в частности, при наличии мутаций m.13513G>A и m.1555A>G в генах МТ-ND1 и МТ-RNR1 соответственно.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда N 22-15-00317.

1. Kim H.R. et al. Mitochondrial DNA aberrations and pathophysiological implications in hematopoietic diseases, chronic inflammatory diseases, and cancers // *Ann. Lab. Med.* 2015. 35:1–14.
2. Kazak L. et al. Minimizing the damage: Repair pathways keep mitochondrial DNA intact // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. 13:659–671.
3. Gorman G.S. et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease // *Ann. Neurol.* 2015. 77:753–759.
4. Haig D. Intracellular evolution of mitochondrial DNA (mtDNA) and the tragedy of the cytoplasmic commons // *Bioessays.* 2016. 38:549–555
5. Yoneda M. et al. Heteroplasmic mitochondrial tRNA(Lys) mutation and its complementation in MERRF patient-derived mitochondrial transformants // *Muscle Nerve Suppl.* 1995. 3:95–101.
6. Lee S.R. et al. Mitochondrial DNA, mitochondrial dysfunction, and cardiac manifestations // *Front. Biosci.* 2017. 22:1177–1194.
7. von Kleist-Retzow J.C. et al. Impaired mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels // *Exp. Cell Res.* 2007. 313:3076–3089.
8. McKenzie M. et al. Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption // *J. Biol. Chem.* 2007. 282:36845–36852.
9. James A.M. et al. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations // *Eur. J. Biochem.* 1999. 259:462–469.