

# **ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА МТ-СУТВ НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК С НАРУШЕНИЯМИ, РАЗВИВАЮЩИМИСЯ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

**Шитикова Е.Ю.<sup>1</sup>, Казаков М.С.<sup>1</sup>, Попов Д.Ю.<sup>1,2</sup>, Федотова Е.И.<sup>1,2</sup>,  
Бережнова А.В.<sup>1,2</sup>, Вишокурова Ю.<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орёл*

*<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино*

**Аннотация.** В работе рассматривается совместное влияние связанных с атеросклерозом мутаций цитохрома В на функционирование электронтранспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий на основе оценки скорости продукции митохондриальных активных форм кислорода (мтАФК) и митохондриального мембранныго потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ).

**Ключевые слова:** митохондриальный геном, атеросклероз, мутации, АФК

Атеросклероз имеет мультифакторную природу, которая приводит к развитию системных нарушений включая окислительный стресс [1, с 223]. Эндогенные механизмы увеличения генерации АФК зачастую связаны с нарушениями работы ЭТЦ, 13 субъединиц которой закодированы в мтДНК[2, с 392], характеризующейся высокой частотой мутаций. Комплекс III играет ключевую роль в работе ЭТЦ, обеспечивая движение электронов не только от комплексов I и II, но и от участников бета-окисления жирных кислот и глицерол-3-fosфатного шаттла, а также выступая одним из источников образования мтАФК. Это делает актуальным выяснения роли ассоциированных с атеросклерозом мутаций цитохрома В в функционировании митохондрий, включая образование АТФ и АФК.

В работе использовали линии цитоплазматических гибридов с различными уровнями гетероплазмии мутаций цитохрома В, ассоциированных с атеросклеротическими поражениями сонных артерий [3, с 377] – m.G15059A и m.G14846A: линия TC-HSMAM1 (m.G15059A – 38%, m.G14846A – 0%), TC-HSMAM2 (26%, 25%), TC-HSMAM3 (18%, 36%) и TC-HSM2 (17%, 7%), созданных на основе THP-1 (1%, 29%). Скорость продукции мтАФК, оцененная с использованием зонда MitoTrackerRed CM-H2Xros, для линии TC-HSMAM1 составила 225% от клеток THP-1, TC-HSMSM2 – 593%, TC-HSMAM3 – 114%, TC-HSM2 – 844% (отличия от THP-1 являются статистически значимы при уровне  $p<0,001$ ). Поскольку продукция мтАФК может быть тесно связана с  $\Delta\Psi_m$ , была проведена оценка его величины при помощи зонда тетраметилродамина. Величина  $\Delta\Psi_m$  у линии TC-HSMAM1 оказалась выше THP-1 (120%) ( $p<0,05$ ), в то время как у линии TC-HSMAM3 – ниже (72%) ( $p<0,001$ ). Для линий TC-HSMAM2 и TC-HSM2 этот показатель равен 116% и 114% соответственно. Сопоставление представленных данных показывает, что скорость продукции мтАФК и  $\Delta\Psi_m$  зависят от сочетания рассматриваемых мутаций.

Поскольку м.G15059A приводит к формированию укороченного белка, который, судя по экспериментальным данным, встраивается в комплекс III, это может приводить к изменению движения электронов в рамках Q-цикла и увеличению утечки на кислород. При этом протонтранспортная функция комплекса III, видимо, даже усиливается. Однако повышение гетероплазмии м.G14846A снижает данный эффект. Вероятно, это связано с такими структурными изменениями цитохрома В, которые уже исключают его встраивание в ЭТЦ и приводят к снижению продукции мтАФК и величины  $\Delta \Psi_m$ . В результате этого происходит образование функционального комплекса III и увеличение синтеза АТФ, что подтверждается данными о количестве последнего в клетках: ТС-HSM2 – 0,32 нмоль/млн кл; ТС-HSMAM1 – 1,04 нмоль/млн кл; ТС-HSMAM2 – 2,2 нмоль/млн кл; ТС-HSMAM3 – 2,48 нмоль/млн кл. Полученная информация может быть одним из объяснений данных об атерогенности м.G15059A и антиатерогенности м.G14846A [4, с 954].

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

## INFLUENC OF MT-CYTB GENE MUTATIONS ON THE STATE OF CELLS WITH DISORDERS DEVELOPING IN ATHEROSCLEROSIS

Shitikova E.Yu.<sup>1</sup>, Kazakov M.S.<sup>1</sup>, Popov D.Yu.<sup>1,2</sup>, Fedotova E.I.<sup>1,2</sup>,  
Berezhnov A.V.<sup>1,2</sup>, Vinokurov A.Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Oryol State University named after I.S. Turgenev, Oryol*

<sup>2</sup>*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino.*

**Abstract** In this work we consider the joint effect of cytochrome B (Cytb) mutations associated with atherosclerosis on the functioning of the mitochondrial electron transport chain (ETC) based on the estimation of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) production rate and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ).

**Keywords:** mitochondrial genome, atherosclerosis, mutations, ROS

Atherosclerosis has a multifactorial nature that leads to the development of systemic disorders including oxidative stress [1, p. 223]. Endogenous mechanisms of ROS generation increase are often associated with disturbances of ETC, 13 subunits of which are encoded in mtDNA [2, p. 392], characterized by a high frequency of mutations. Complex III plays a key role in ETC function, providing electron flow not only from complexes I and II but also from participants in fatty acid beta-oxidation and the glycerol-3-phosphate shuttle, as well as acting as one of the sources of mtROS formation. This makes it relevant to elucidate the role of atherosclerosis-associated Cytb mutations in mitochondrial functioning, including ATP and ROS formation.

We used cytoplasmic hybrid lines with different levels of heteroplasmy of Cytb mutations associated with atherosclerotic lesions of carotid arteries [3, p. 377] - m. G15059A and m.G14846A: TC-HSMAM1 (m.G15059A - 38%, m.G14846A - 0%), TC-HSMAM2 (26%, 25%), TC-HSMAM3 (18%, 36%) and TC-HSM2 (17%, 7%) lineage derived from THP-1 (1%, 29%). The rate of mtROS production, assessed using the MitoTracker Red CM-H2Xros, for the TC-HSMAM1 line was 225% of THP-1 cells, TC-HSMSM2 was 593%, TC-HSMAM3 was 114%, and TC-HSM2 was 844% (differences from THP-1 are statistically significant at the  $p<0.001$  level). Since mtROS production may be closely related to  $\Delta\Psi_m$ , its value was assessed using a tetramethylrhodamine. The value of  $\Delta\Psi_m$  in the TS-HSMAM1 line was higher than THP-1 (120%) ( $p<0.05$ ), while in the TS-HSMAM3 line it was lower (72%) ( $p<0.001$ ). For TS-HSMAM2 and TS-HSM2 lines, this indicator is 116% and 114%, respectively. Comparison of the presented data shows that the rate of mtROS production and  $\Delta\Psi_m$  depend on the combination of the mutations considered.

The presence of the m.G15059A mutation leads to a shortened protein formation that is incorporated into complex III, resulting in a change in electron movement and increased

leakage to oxygen. This enhances the proton transport function of complex III. However, the increased presence of the m.G14846A mutation reduces this effect, possibly due to structural changes in Cytb that prevent its incorporation into the electron transport chain. This leads to a decrease in mtROS production and  $\Delta\Psi_m$  value, resulting in the formation of functional complex III and an increase in ATP synthesis. The data on ATP levels in cells further supports this: TC-HSM2 – 0,32 nmol/mill cells; TC-HSMAM1 – 1,04 nmol/mill cells; TC-HSMAM2 – 2,2 nmol/mill cells; TC-HSMAM3 – 2,48 nmol/mill cells. The obtained information may be one of the explanations for the data on atherogenicity of m.G15059A and antiatherogenicity of m.G14846A [4, p. 954].

This work was supported by Grant No. 22-15-00317 of the Russian Science Foundation.

**References:**

1. Emma P. K. //Free Radical Biology and Medicine. 2016. 100: 223-30.
2. Hahn A. //Antioxidants. 2019. 8 (9): 392.
3. Volobueva A. //Biomolecules. 2019. 9(8): 377.
4. Синёв В. В. //Генетика. 2016. 52 (8): 951-57.