



Анализ уровня гетероплазмии мутации митохондриального генома G15059A гена Cytb в липофиброзных бляшках интимы аорты человека

В.А. Баринова², В.В. Синев², А.И. Рыжкова^{1, 3}, С.С. Трубинов¹, А.В. Желанкин², К.Ю. Митрофанов¹, А.Н. Орехов¹, А.Ю. Постнов², И.А. Собенин¹, М.А. Сазонова^{1, 2}

¹Лаборатория медицинской генетики, ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва

²Лаборатория ангиопатологии, ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва

³Биологический факультет, ФГБОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва

Абстракт

Цель. Митохондриальные мутации ассоциированы с определенными патологиями человека. Их пенетрантность и экспрессивность зависит от уровня гетероплазмии. Поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями человека необходима количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома. Целью настоящего исследования был пилотный анализ уровня гетероплазмии мутации *m.G15059A* гена *Cytb* (MT-CYB) в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорты человека. Как известно из литературных источников, данная мутация ассоциирована с митохондриальной миопатией, миоглобинурией, артериальной гипертензией и некоторыми другими патологиями человека.

Материал и методы. Материалом исследования служили образцы ткани из интимы аорты семи лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Нормальная интима аорты сравнивалась с липофиброзными бляшками. Амплификаты ДНК, содержащие область исследуемой мутации, были проанализированы оригинальным методом количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, основанным на технологии пиросеквенирования. Статистическая обработка результатов была проведена методом бутстрэп-анализа.

Результаты. Согласно полученным данным, уровень гетероплазмии мутации митохондриального генома *m.G15059A* оказался значительно выше в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью в 43% аорты. В остальных анализируемых аортах уровень гетероплазмии данной мутации в нормальной и пораженной атеросклерозом интиме аорты оказался приблизительно одинаковым. Корреляционный анализ, проведенный методом бутстрэп, показал, что мутация *m.G15059A* ассоциирована с липофиброзной бляшкой аорты на уровне значимости $p \leq 0,05$. В связи с тем, что *m.G15059A* является нонсенс-мутацией, вызывающей образование стоп-кодона, в результате которого происходит потеря 244 аминокислотных остатков цитохрома В, можно предположить, что данный генетический дефект фермента дыхательной цепи может вызвать окислительный стресс в интиме аорты, ведущий к локальному возникновению атеросклеротических поражений у человека.

Заключение. В настоящем исследовании обнаружено, что соматическая мутация митохондриального генома *m.G15059A*, локализованная в гене, кодирующем цитохром В, ассоциирована с липофиброзными бляшками интимы аорты человека. Данная информация может быть полезна ученым, специализирующимся в области исследования атерогенеза.

Ключевые слова: митохондриальный геном, мутация, уровень гетероплазмии, интима аорты, липофиброзная бляшка, атеросклероз, ген цитохрома В.

Analysis of heteroplasmy level in mitochondrial genome mutation m.G15059A of CYTB gene in lipofibrous plaques of human aortic intima

V.A. Barinova¹, V.V. Sinyov¹, A.I. Ryzhkova^{2,3}, S.S. Trubinov², A.V. Zhelankin¹, K. Yu. Mitrofanov², A.N. Orekhov², A. Yu. Postnov¹, I.A. Sobenin^{1,2}, M.A. Sazonova^{1,2}

¹Laboratory of medical genetics, Russian Cardiology Research Complex, Moscow, Russia

²Laboratory of angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

³Biological faculty, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

Objective. Mitochondrial mutations are associated with certain human pathologies. Their penetrance and expressivity depend on the heteroplasmy level. Therefore, a quantitative assessment of the mutant allele of mitochondrial genome is necessary in studying the association of mitochondrial mutations with human diseases. The aim of the present study was a pilot heteroplasmy analysis of mutation m.G15059A of CYTB (MT-CYB) gene in lipofibrous plaques and normal human aortic intima. According to the literature, this mutation is associated with mitochondrial myopathy, myoglobinuria, arterial hypertension and some other human pathologies.

Materials and methods. The materials for our study were tissue samples of aortic intima from 7 individuals, who died as a result of an accident or a sudden death. Normal aortic intima was compared to lipofibrous plaques. DNA amplicates, containing the region of investigated mutation, were analyzed by an original method of quantitative assessment of mitochondrial genome mutant allele, based on pyrosequencing technology. A statistical analysis of the results was performed by a bootstrap analysis.

Results. According to the obtained data, the heteroplasmy level of mitochondrial genome mutation m.G15059A was significantly higher in lipofibrous plaques compared to normal vascular tissue in 43% aortas. In the rest of the analyzed aortas the heteroplasmy level of this mutation in normal and atherosclerotic aortic intima was approximately the same. A correlation analysis, performed by a bootstrap method, revealed that mutation m.G15059A is associated with lipofibrous aortic plaques at the level of significance $p \leq 0,05$. Taking into consideration that m.G15059A is a nonsense mutation, causing a formation of a terminating codon, which results into a loss of 244 aminoacid residues of cytochrome B, it can be supposed that this genetic defect of respiratory chain enzyme may cause oxidative stress in aortic intima, which leads to local occurrence of human atherosclerotic lesions.

Conclusion. In the present study it is found that somatic mitochondrial genome mutation m.G15059A, localized in gene, coding cytochrome B, is associated with lipofibrous plaques of human aortic intima. This information can be useful for scientists who specialize in studying atherogenesis.

Keywords: mitochondrial genome, mutation, the heteroplasmy level, aortic intima, lipofibrous plaque, atherosclerosis, gene of cytochrome B.

Введение

В основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний, преобладающих среди причин смерти людей в XXI веке, лежат атеросклеротические поражения интимы сосудов [1–3]. Выявление молекулярно-генетических механизмов атеросклероза может помочь при ранней диагностике и своевременной профилактике атеросклероза.

В течение жизни индивида в митохондриальном геноме могут возникать соматические мутации [4–11]. Их пенетрантность и экспрессивность зависит от уровня гетероплазии. Поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями человека необходима количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома [12–14].

В настоящей работе проведена пилотная детекция уровня гетероплазии мутации m.G15059A митохондриального гена, кодирующего цитохром В, в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорты человека.

Как известно из литературных источников, данная мутация ассоциирована с митохондриальной миопатией, миоглобинурией, артериальной гипертензией и некоторыми другими патологиями человека [9–11].

Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы ткани из интимы аорты семи лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти.

Тотальную ДНК выделяли из образцов с помо-

щью набора AQUAPURE GENOMIC TISSUE KIT фирмы BioRad, следуя соответствующим протоколам.

Амплификацию фрагмента, содержащего область мутации, осуществляли с помощью следующих праймеров:

прямой праймер

bio-CATTATTCTCGCACGGACT (14671–14689),

обратный праймер

GCTATAGTTGCAAGCAGGAG (15120–15100),

праймер для пиросиквенса

TTTCTGAGTAGAGAAATGAT (15080–15061).

Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 0,4–0,6 мкг митохондриальной ДНК; 16,6 мкМ (NH₄)₂SO₄; 0,3 пикомоль каждого праймера, 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 67 мМ трис/НСl (рН 8,8), 1,5 мМ MgCl₂ и 3 ед. Taq-полимеразы.

Режим ПЦР: денатурация ДНК при 94 °С в течение трех минут, затем: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин, всего – 35 циклов, с заключительным синтезом при 72 °С в течение 7 мин.

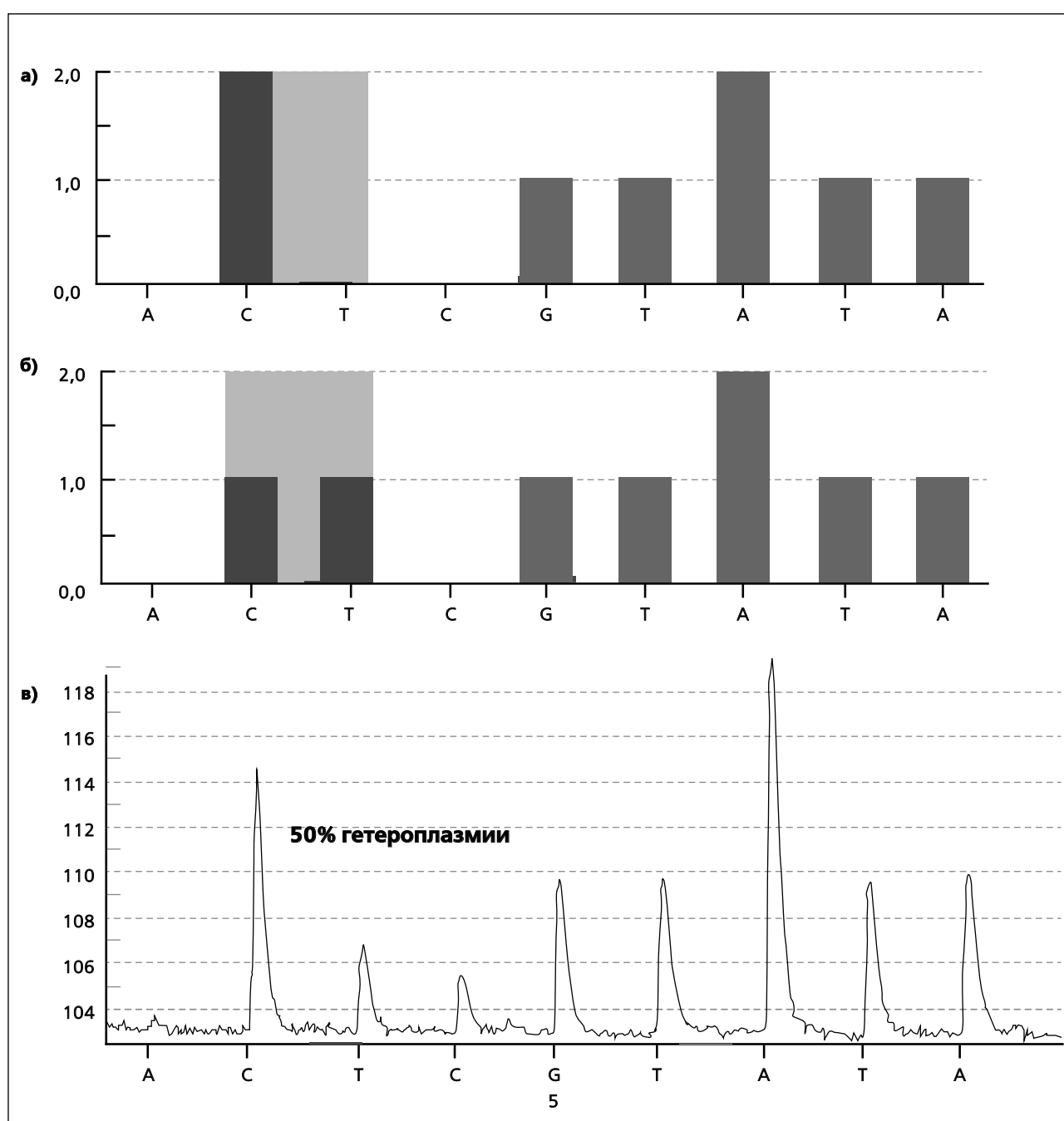
Размер ПЦР-фрагмента составлял 450 п. н.

Рисунок 1. Детекция уровня гетероплазии мутации m.G15059A (C > T при использовании обратного праймера для пиросиквенса)

а) 100%-я гомоплазия по нормальному аллелю С

б) 100%-я гомоплазия по мутантному аллелю Т

в) 50%-я гетероплазия по мутантному аллелю Т



Пиросеквенирование амплификатов проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQTMHS96MA [15–18].

Праймеры для ПЦР и пиросиквенса подбирались с помощью программы Primer3 [19].

Визуализация результатов осуществлялась на основе программы, прилагающейся при установке пиросеквенатора, с помощью нового оригинального метода, разработанного авторами [12–14].

Для подсчета процента гетероплазмии мутаций по данным пирограммы используется ранее разработанная авторами формула [12–14]:

$$P = \frac{|h - M|}{|M - N|} \times 100 \%$$

где P – процент гетероплазмии;

h – высота пика исследуемого нуклеотида;

N – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100 % нормальных аллелей;

M – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100 % мутантных аллелей.

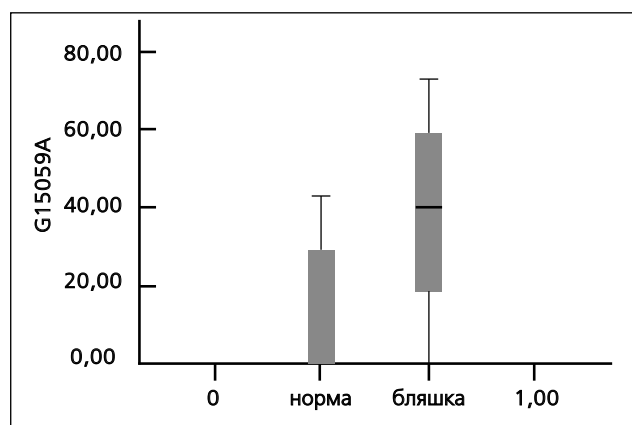
Например, согласно данной формуле, процент гетероплазмии по мутации m.G15059A в образце ДНК 50-летнего пациента составил 50 % (рис. 1).

В работе был использован бутстрэп-анализ для выявления статистически достоверных ассоциаций исследуемых мутаций с липофиброзными бляшками аорты человека [20, 21].

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам, уровень гетероплазмии мутации митохондриального генома m.G15059A оказался значительно выше в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью в 43 % аорт. Достоверность отличий по данному параметру отображена на блочной диаграмме (рис. 2).

Рисунок 2. Блочная диаграмма, демонстрирующая значимые отличия между уровнями гетероплазмии замены гуанилового нуклеотида на адениловый в позиции m.15059 митохондриального генома в липофиброзных бляшках и участках нормальной интимы аорт человека



Корреляционный анализ, проведенный методом бутстрэп, показал, что мутация m.G15059A ассоциирована с липофиброзной бляшкой аорты на уровне значимости $p \leq 0,026$.

В связи с тем, что m.G15059A является нонсенс-мутацией, вызывающей образование стоп-кодона, в результате которого происходит потеря 244 аминокислотных остатков цитохрома B, можно предположить, что данный генетический дефект фермента дыхательной цепи может вызвать окислительный стресс в интима аорты, ведущий к локальному возникновению атеросклеротических поражений у человека.

Заключение

В настоящем исследовании обнаружено, что соматическая мутация митохондриального генома m.G15059A, локализованная в гене, кодирующем цитохром B, одним из ключевых ферментов дыхательной цепи, достоверно ассоциирована с липофиброзными бляшками интимы аорты человека.

Данная информация может быть полезна ученым, специализирующимся в области исследования атерогенеза.

Конфликт интересов

Данное исследование не имеет конфликта интересов.

Благодарность

Работа поддержана Российским научным фондом, грантом № 14-14-01038.

Список литературы

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; Jan 21;129(3):e28-e292. doi: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80. Epub 2013 Dec 18.
2. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. European Heart Network and European Society of Cardiology. 2012;127 p.
3. Orekhov AN. Atherosclerosis. Molecular-cellular mechanisms of human atherogenesis; antiatherosclerotic therapy. *Palmarium Academic Publishing*, 2013:536 p. ISBN: 978-3-659-98213-2. Russian (Орехов АН. Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия. *Palmarium Academic Publishing*, 2013:536 с. ISBN: 978-3-659-98213-2).
4. Ivanova MM, Sazonova MA, Orekhov AN, Sobenin IA. Some human mitochondrial genome mutations associated with cytopathies. *Biomeditsinskiy journal Medline.ru*. 2012; 13, Art.26:309-330. Russian (Иванова М.М., Сазонова М.А., Орехов АН., Собенин И.А. Некоторые мутации митохондриального генома человека, ассоциированные с цитопатиями. *Биомедицинский журнал Medline.ru*. 2012, 13, ст. 26:309-30).
5. Mitrofanov KIu, Zhelankin AV, Sazonova MA, et al. Association of mitochondrial genome mutations with myocardial infarction development. *Atherosclerosis and dyslipidemii*. 2013; 2:56-61. Russian (Митрофанов КЮ, Желанкин АВ, Сазонова МА с соавт. Ассоциация мутаций митохондриального генома с развитием инфаркта миокарда. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2013; 2:56-61).
6. Mitrofanov KIu, Sazonova MA. Association of point mutations in human nuclear and mitochondrial genome with coronary artery disease. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; 2:51-6. Review. Russian (Митрофанов КЮ, Сазонова МА. Ассоциация точковых мутаций ядерного и митохондриального геномов человека с ишемической болезнью сердца. *Пат. физиол. и эксп. тер.*, 2012; 2:51-6).
7. Mitrofanov KIu, Zhelankin AV, Sazonova MA, et al. Chronic diseases of noninflammatory genesis and human mitochondrial genome mutations. *Cardiologicheskii vestnik*. 2012. 7 (19), 1:57-61. Russian (Митрофанов КЮ, Желанкин АВ, Сазонова МА с соавт. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека. *Кардиологический вестник*, 2012, 7 (19), 1:57-61).
8. Sazonova M, Orekhov A, Sobenin I. Mitochondrial genome defects and atherosclerosis. Role of mitochondrial genome pathologies in atherosclerotic lesions formation of an arterial wall. *Palmarium Academic Publishing*, 2014:354 p. ISBN: 978-3-639-88097-7. Russian (Сазонова М, Орехов А, Собенин И. Дефекты митохондриального генома и атеросклероз. Роль патологии митохондриального генома в формировании атеросклеротических поражений артериальной стенки. *Palmarium Academic Publishing*, 2014:354 с. ISBN: 978-3-639-88097-7).
9. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1999; Sep 30;341(14):1037-44.
10. Andreu AL, Bruno C, Dunne TC, et al. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol*. 1999; Jan; 45(1):127-30.
11. Andreu AL, Bruno C, Shanske S, et al. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology*. 1998; 51(5):1444-7.
12. Sazonova MA, Postnov AIu, Orekhov AN, Sobenin IA. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; 4:81-4. Russian (Сазонова МА, Постнов АЮ, Орехов АН, Собенин ИА. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2011;4:81-84).
13. Sazonova M, Andrianova I, Khasanova Z, et al. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26-29, 2008. *Atherosclerosis Suppl*. 2008; 9(1):113.
14. Sazonova MA, Budnikov YY, Khasanova ZB, et al. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta. 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10-13, 2007. *Atherosclerosis Suppl*. 2007; 8(1):45-46.
15. Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res*. 2000; Aug;10(8):1249-58.
16. Chen DC, Saarela J, Nuotio I, et al. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping. *J Mol Diagn*. 2003; Nov;5(4):243-9.
17. Sinclair A, Arnold C, Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; Nov;47(11):3620-2.
18. Adelson ME, Feola M, Trama J, et al. Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol*. 2005; May;33(1):25-34.
19. <http://simgene.com/Primer3> Accessed 27. 03.2014.
20. Weir BS. Genetic Data Analysis. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996:377 p.
21. <http://spss.ru/joydownload.com/?c=20?gclid=COTnxtbesLwCFaHbcgodiiMatQ>. Accessed 17.09.2014.