Детекция уровня гетероплазмии мутации митохондриального генома G14459A в гомогенатах иммтимы аорты человека

Сазонова М. А.[1,2],. Баринова В. А[2], Синёв В. В.[2], Чичёва М. М. [2], Митрофанов К. Ю.[2], Желанкин А. В.[2], Хасанова З. Б.[1], Егорова Л. А.[1], Собенин И. А. [1,2], Постнов А. Ю. [1]

[1]ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ

[2]ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН»

Абстракт

Цель исследования: *Целью настоящего исследования был пилотный анализ уровня гетероплазмии мутации митохондриального генома человека G14459A.*

Материалы и методы: *Образцы ДНК были выделены из общих гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорты индивидов методом фенол-хлороформной экстракции. После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмии.*

Результаты и обсуждение: *Проанализирована однонуклеотидная замена G14459A Мутация локализована в кодирующей области митохондриального генома, в частности, в гене субъединицы 6 NADH дегидрогеназы. Она вызывает дефект данной белковой субъединицы фермента дыхательной цепи митохондрий, ведущий к дисфункции NADH дегидрогеназы и, возможно, к окислительному стрессу в организме человека.*

Обнаружено, что уровень гетероплазмии по данной мутации значительно выше в общих гомогенатах пораженной атеросклерозом интимы по сравнению с гомогенатами нормальной интимы.

Заключение: *Согласно полученным данным, мутация G14459A ассоциирована с атеросклеротическим поражением интимы аорты человека.*

Ключевые слова: *мутация, интима, аорта, гетероплазмия, NADH дегидрогеназа, атеросклероз.*

Mutations' level detection of mitochondrial genome G14459A in homogenates of the human aortic intima

Egorova L. A, Sobenin I. A, Postnov A. Yu. Sazonova M. A, Barinova V. A, Sinjov V. V, Chichewa M. M, Mitrofanov K. Yu., Zhelankin A. V, Hasanova Z. B, Egorova L. A, Sobenin I. A, Postnov A. Yu.

Russian Cardiology Research Complex, Institute of General Pathology and Pathophysiology

Abstract

Objective: *The aim of this study was the pilot analysis of the heteroplasmy level for mutation G14459A of human mitochondrial genome.*

Materials and Methods: *The DNA samples were isolated from total homogenates of normal and affected by atherosclerosis aortic intima of individuals by a method of the phenol-chloroform extraction. After PCR the amplificates were pyrosequenced to identify the percent of heteroplasmy.*

Results and discussion: *A single nucleotide substitution G14459A was analyzed. The mutation is localized in the coding region of the mitochondrial genome, in particular, in the gene NADH dehydrogenase subunit 6. It causes a defect of the protein subunit of mitochondrial respiratory chain enzyme, leading to dysfunction of the NADH dehydrogenase and possibly to oxidative stress in the body.*

It was found that the level of heteroplasmy for this mutation is significantly higher in total homogenates of affected by atherosclerosis intima compared to homogenates of normal intima.

Conclusion: *According to the data resulting from the study, G14459A mutation is associated with atherosclerotic lesions of human aortic intima.*

Keywords: *, intima, aorta, heteroplasmy, NADH dehydrogenase, atherosclerosis.*

Введение

Наиболее актуальной проблемой современной медицины является выяснение молекулярно-генетических причин развития атеросклероза, который лежит в основе большинства сердечно-сосудистых заболеваний. Данные заболевания «лидируют» среди причин смерти людей на нашей планете, обуславливая общепопуляционное снижение продолжительности жизни [1].

У большинства пациентов отмечается отягощенная наследственность, являющаяся фактором риска развития атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, поэтому большое значение имеет ранняя диагностика и своевременная профилактика атеросклероза [2].

В патологии человека показана ассоциация различных заболеваний с мутациями митохондриального генома. Митохондриальные мутации ассоциируются с различными заболеваниями, часто встречающимися в сочетании с атеросклеротическими поражениями, такими как стеноз коронарных сосудов, некоторые формы диабета и глухоты, инфаркт миокарда, кардиомиопатия [3-7].

В каждой митохондрии содержится несколько копий ее генома. Митохондриальный геном наследуется по материнскому типу и отличается выраженной нестабильностью, в нем часто возникают мутации. Пенетрантность и экспрессивность таких мутаций варьируют в широких пределах от семьи к семье и между родственниками (по материнской линии) одной семьи и зависят, в основном, от генотипа и уровня гетероплазмии (смесь мутантных и нормальных молекул ДНК). Следовательно, при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями людей необходима не только качественная (наличие/отсутствие мутации), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (процент гетероплазмии).

В настоящей работе проведен молекулярный анализ мутации митохондриального генома человека G14459A в образцах ДНК, выделенных из общих гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорты человека. Мутация локализована в кодирующей области митохондриального генома, в частности, в гене субъединицы 6 NADH дегидрогеназы.

Материалы и методы

В качестве материала исследования были использованы образцы ткани интимы аорты лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Все пораженные атеросклерозом участки интимы аорты гомогенизировали, тщательно перемешивали и брали 10 мкг ткани для выделения ДНК. Таким же способом получали гомогенаты интимы нормальных участков аорты. Всего для исследования было взято 10 аорт.

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани проводилось с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмии по мутации G14459A. Анализ последовательности ДНК, для определения доли мутантного аллеля митохондриальной ДНК в гетероплазмической смеси, осуществляли с использованием технологии пиросеквенирования в режиме реального времени. Исследования проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQ96MA.

Праймеры для ПЦР и пиросеквенирования были подобранны с помощью он-лайн программы Primer3:

1) Прямой праймер CAGCTTCCTACACTATTAAAGT, позиция с 14303 по 14334;
2) Обратный праймер bio-GTTTTTTTAATTTATTTAGGGGG, позиция с 14511 по 14489;
3) Сиквенс-праймер GATACTCCTCAATAGCCA, позиция с 14439 по 14456.

Для проведения ПЦР реакции были подобранны следующие условия:

1) Концентрация MgCl2 в буфере – 1,5 мМ;
2) Денатурация проводилась при температуре 94°C;
3) Отжиг праймеров при температуре 50°C;
4) Синтез комплементарной цепи при температуре 72°C.

Проведение реакции пиросеквенирования включает в себя пять этапов (http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96id.aspx):

Этап 1

Сиквенс-праймер гибридизируется с одноцепочечным ПЦР-ампликоном, который используется в качестве матрицы. Полученный фрагмент инкубируется с ферментами: ДНК-полимеразой, АТФ-сульфурилазой, люциферазой и апиразой; а также с субстратом: аденозин-5-фосфосульфатом и люциферин (см. рисунок 1.).

Этап 2

В реакционную смесь добавляется первый нуклеотид. ДНК-полимераза достраивает его к цепи ДНК в соответствии с принципом комплементарности. При этом реакция сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквимолярном сумме включенных нуклеотидов (см. рисунок 1).

Этап 3

АТФ-сульфурилаза преобразует PPi в АТФ в присутствии аденозин-5-фосфосульфата. При этом происходит преобразование люциферина в оксилюциферин, который генерирует видимый свет пропорционально количеству молекул АТФ. Пиросеквенатор детектирует этот свет и преобразует его в соответствующий пик на пирограмме. Высота каждого пика (световой сигнал) пропорционально количеству встроенных нуклеотидов в цепь ДНК (см. рисунок 2.).

Этап 4

Апираза, нуклеотид-разрушающий фермент, постоянно убирает оставшиеся не присоединенными нуклеотиды и АТФ. Затем в реакционную смесь добавляется следующий нуклеотид (см. рисунок 2.).

Рисунок 1. Первый и второй этапы пиросеквенирования.

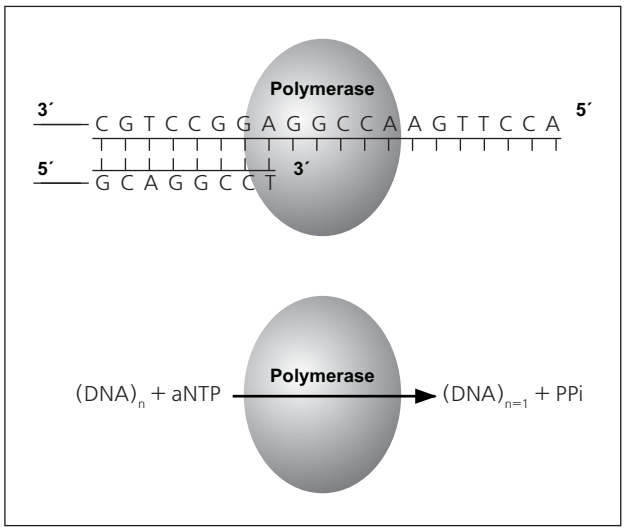


Рисунок 2. Третий и четвертый этапы пиросеквенирования.

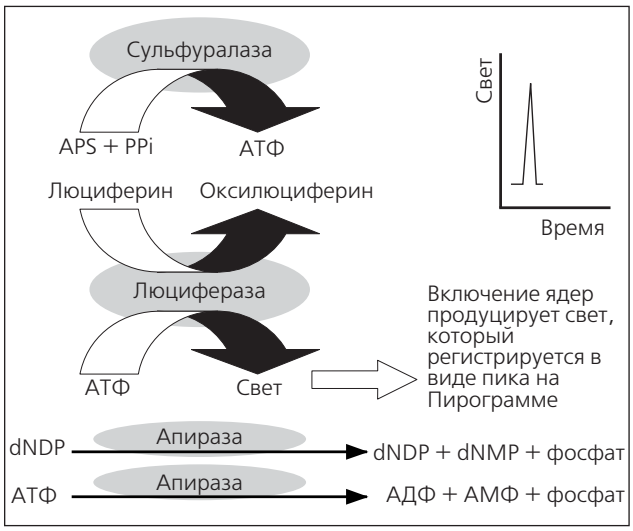


Рисунок 3. Пирограмма.

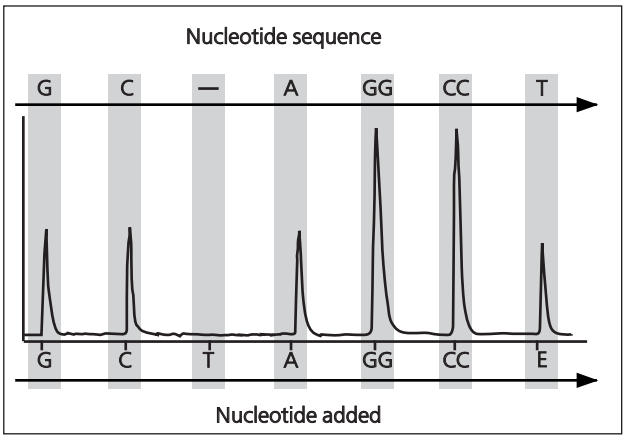
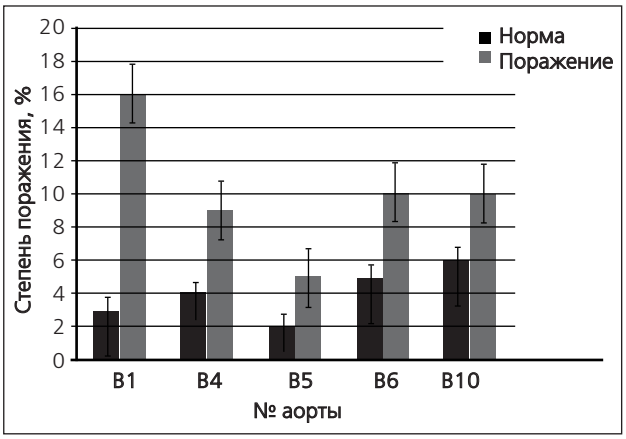


Рисунок 4. Частота мутации G14459A в гомогенатах интимы аорт.



Вышеизложенная процедура повторяется до тех пор, пока полностью не достроится анализируемая цепь ДНК. В конечном итоге пирограмма выглядит так, как представлено на рисунке 3.

Расчет величины процента гетероплазмии по мутации проводился на основе пиков, соответствующих интенсивности люминисценции при последовательном встраивании различных нуклеотидов в цепь анализируемого фрагмента. Этот оригинальный количественный метод оценки мутантного аллеля был разработан в нашей лаборатории на базе метода пиросеквенирования [8-12].

Результаты и обсуждение

Проанализирована однонуклеотидная замена G14459A в митохондриальном гене шестой субъединицы NADH дегидрогеназы, выявленной ранее при наследственной оптической нейропатии Лебера и генерализованной дистонии [13, 14].

Обнаружено, что уровень гетероплазмии по данной мутации значительно выше в гомогенатах пораженной интимы по сравнению с гомогенатами нормальной интимы в 50% случаев (5 из 10 аорт) (рис.4). Согласно гистограмме, по мутации G14459A в гомогенатах данных аорт различия между пораженной атеросклерозом и нормальной интимой достоверны значимы. На основании полученных данных можно сделать вывод, что, мутация G14459A (ген субъединицы 6 NADH дегидрогеназы) ассоциирована с атеросклерозом.

Следует отметить, что G14459A вызывает дефект шестой белковой субъединицы фермента дыхательной цепи митохондрий, ведущий к дисфункции NADH дегидрогеназы. Ассоциация данной мутации с атеросклеротическими поражениями, возможно, связана с тем, что уменьшение количества нормально функционирующих ферментов в митохондриях приводит к окислительному стрессу клеток интимы сосудов человека.

Данная статья может быть полезна медицинским генетикам и врачам в области изучения проблем атеросклероза.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Государственный контракт 11.519.11.2044 от 12.03.2012).

Список литературы.

1. *P.M. Consigny. Pathogenesis of atherosclerosis. A.J.R. Am. J. Roentgenol. 1995; 164(3): 553-558.*
2. *E. Incalcaterra, E. Hoffmann, M. Averna, et al. Genetic risk factors in myocardial infarction at young age. Minerva Cardioangiol. 2004; 52(4): 287-312.*
3. *М.М. Иванова, М.А. Сазонова, Е.Н. Бородачёв. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012; (3): 115-122.*
4. *I.A. Sobenin, M.A. Sazonova, A.Y. Postnov, et al. Mitochondrial Mutations are Associated with Atherosclerotic Lesions in the Human Aorta. Clinical and Developmental Immunology, vol. 2012, Article ID 832464, 5 pages, 2012. doi:10.1155/2012/832464.*
5. *А.В. Желанкин, М.А. Сазонова. Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертонией и различными видами кардиомиопатии. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012; (3): 124-129.*
6. *К.Ю. Митрофанов, М.А. Сазонова. Ассоциация точковых мутаций ядерного и митохондриального геномов человека с ишемической болезнью сердца. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012; (2): 51-56.*
7. *К.Ю. Митрофанов, А.В. Желанкин, М.А. Сазонова с соавт. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека. Кардиологический вестник. 2012; 7(19): 1, 57-61.*
8. *М.А. Сазонова, М.М. Иванова, А.В. Желанкин с соавт. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома. Фундаментальные науки и практика. 2010; 1(2): 19-21.*
9. *М.А. Сазонова, А.Ю. Постнов, И.А. Собенин с соавт. Патентная заявка «Способ количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома в лейкоцитах крови человека». Входящий № 065647, регистрационный № 2009146012, от 14.12.2009.*
10. *М.А. Сазонова, А.Ю. Постнов, А.Н. Орехов с соавт. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2011; (4): 82-85.*
11. *И.А. Собенин, М.А. Сазонова, А.Ю. Постнов с соавт. Патентная заявка от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу», регистрационный № 2010133468.*
12. *M.A. Sazonova , E.Y. Budnikov, Z.B. Khasanova, et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. Atherosclerosis. 2009; 204(1): 184-90.*
13. *A. Solano, M. Roig, C. Vives-Bauza, et al. Bilateral Striatal Necrosis Associated with a Novel Mutation in the Mitochondrial ND6 Gene. Ann. Neurol. 2003; 54: 527–530.*
14. *A. Gropman, T.-J Chen, Ch.-L. Perng, et al. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. American Journal of Medical Genetics. 2004; 124A: 377–382.*