



Изучение гетероплазмии мутации митохондриального генома A1555G в гомогенатах пораженной атеросклерозом интимы аорты

В.В. Синёв³, М.А. Сазонова^{1,2,3}, М.М. Чичёва^{2,3}, К.Ю. Митрофанов^{2,3}, А.В. Желанкин^{2,3}, И.А. Собенин^{1,2,3}, А.Ю. Постнов¹

¹ ФГБУ РКНПК, Москва,

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН», Москва

³ Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Московская обл., Сколково

Абстракт

Цель исследования. Данная работа является пилотным исследованием, и целью её было изучение ассоциации атеросклероза с соматической мутацией A1555G.

Материалы и методы. В качестве материала исследования были использованы тотальные ткани интимы аорты лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Пораженные атеросклерозом и нормальные участки интимы аорты гомогенизировали, тщательно перемешивали и брали 10 мкг ткани для выделения ДНК. Для исследования было взято 10 аорт.

После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмии.

Результаты и обсуждение. В настоящей работе исследована гетероплазмия митохондриального гена 12S рРНК в образцах ДНК, выделенных из тотальных гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорты. Установлено, что уровень гетероплазмии мутантного аллеля A1555G в исследуемых образцах с атеросклеротическим поражением значительно выше по сравнению с гомогенатами из нормальной интимы.

Заключение. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что соматическая митохондриальная мутация A1555G (ген 12S рРНК) ассоциирована с атеросклерозом.

Ключевые слова: мутация, митохондриальный, геном, гомогенат, гетероплазмия, атеросклероз.

Heteroplasmy A1555G mutations of the mitochondrial genome in homogenates of the atherosclerotic aortic intima

V.V. Sinev³, M.A. Sazonova^{1,2,3}, M.M. Chichewa^{2,3}, K.Yu. Mitrofanov^{2,3}, A.V. Zhelankin^{2,3}, I.A. Sobenin^{1,2,3}, A.Yu. Postnov¹

¹ "Russian Cardiology Research Complex," Moscow,

² "Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology", Moscow

³ Research Institute of atherosclerosis, the Innovation Centre Skolkovo, Moscow Region., Skolkovo

Abstract

Objective: This research is a pilot study and its purpose was to study the association of atherosclerosis and somatic mutation A1555G.

Materials and methods. As a material for the study total aortic intima tissues of people, who died as a result of an accident or a sudden death were used. Normal and atherosclerotic aortic intima sections were homogenized, well mixed and 10 µg of the tissue were taken for DNA extraction. 10 aortas were taken for the investigation.

After PCR the amplicates were pyrosequenced to identify the percent of heteroplasmy

Results and discussion: In the present paper the heteroplasmy of mitochondrial gene 12S rRNA in DNA samples isolated from total homogenates of normal and atherosclerotic aortic intima was studied. It was found out that the heteroplasmy level of A1555G mutant allele in the samples with atherosclerotic lesions is significantly higher compared to homogenates of normal intima.

Conclusion. On the basis of the received data, it can be concluded that somatic mitochondrial mutation A1555G (12S rRNA gene) is associated with atherosclerosis.

Keywords: imutation, mitochondrial, genome, homogenate, heteroplasmy, atherosclerosis.

Введение.

Первичная артериальная гипертензия, острые и хронические заболевания сосудов сердца и мозга, поражение артерий нижних конечностей, расслаивающаяся аневризма аорты, сахарный диабет 2 типа – это далеко не полный перечень заболеваний, развитие которых неразрывно связано с атеросклеротическим процессом в стенках сосудов [1]. Вследствие этого большое значение имеет ранняя, досимптоматическая диагностика атеросклероза, в том числе, молекулярно-генетическими методами. Одной из возможных причин атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [2-4].

Данная работа является пилотным исследованием и целью её было изучение ассоциации атеросклероза с соматической мутацией A1555G, локализованной в гене малой субъединицы рибосомы митохондрии человека. По литературным данным, данная мутация ассоциирована со слуховыми расстройствами [5].

Материалы и методы.

В качестве материала исследования были использованы тотальные 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 гомогенат интимы нормальных участков аорты. 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 для выявления процента гетероплазмы по интересующим нас мутациям. Для определения доли мутантного аллеля митохондриальной ДНК в гетероплазмической смеси использовали технологию пиросеквенирования в режиме реального времени. Исследования проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQ96MA.

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

- 1) Прямой праймер
TAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAA,
позиция с 1326 по 1355;
- 2) Обратный праймер
bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTGGG,
позиция с 1704 по 1684;
- 3) Сиквенс-праймер
ACGCATTTATATAGAGGA,
позиция с 1537 по 1554.

Для проведения ПЦР реакции были подобраны следующие условия:

- 1) Концентрация $MgCl_2$ в буфере – 2,5 мМ
- 2) Денатурация проводилась при температуре 94°C
- 3) Отжиг праймеров – при температуре 50°C
- 4) Синтез комплементарной цепи – при температуре 72°C

Количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома проводилась с помощью оригинального метода, разработанного в нашей лаборатории на базе метода SNP – анализа [6-12]. Он основан на анализе высоты пиков пирограммы в исследуемой области одноцепочечного ПЦР-фрагмента. Пирограмма для митохондриальных генов отличается от таковой для ядерных, так как для последних существует четкое разделение на гомо- и гетерозиготы, что делает высоту пиков на пирограмме фиксированной (0 % – индивид гомозиготен, оба аллеля не несут мутацию, 50 % – гетерозигота, и 100 % – пациент гомозиготен, оба аллеля мутантны). Для мутаций же митохондриального генома, проанализировав отличия в последовательности и размере пиков для гомозигот, имеющих 100 % нормальных и 100 % мутантных аллелей, можно определить процент гетероплазмы в образце ДНК для каждой конкретной мутации. Общая формула для подсчета процента гетероплазмы выглядит следующим образом:

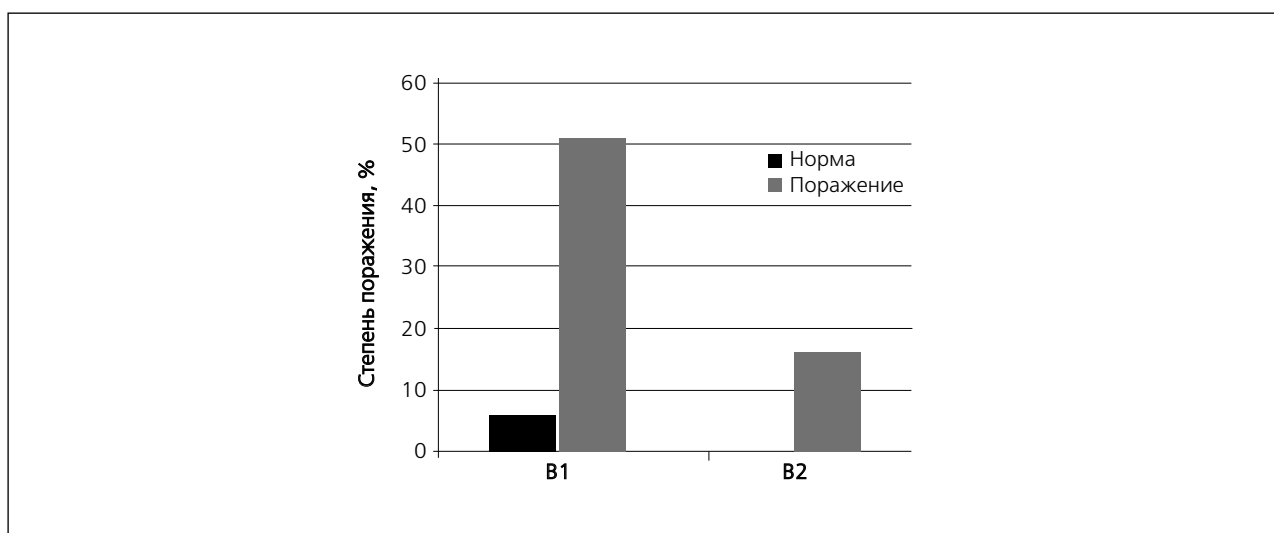
$P = \frac{h}{N} \cdot 100$, где P – процент гетероплазмы; h – высота пика исследуемого нуклеотида; N – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100 % нормальных аллелей; M – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100 % мутантных аллелей [12].

Результаты и обсуждение.

В настоящей работе проведено исследование уровня гетероплазмы мутации A1555G в общих гомогенатах нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт. Экспериментальные данные представлены в таблице 1.

Обнаружено, что процент гетероплазмы по данной мутации значительно выше в гомогенатах пораженной интимы по сравнению с гомогенатами нормальной интимы в 20 % исследуемых аорт. Данные представлены на гистограмме 1.

Как видно из таблицы №1 и гистограммы №1, статистически достоверная разница между нормой и поражением отмечается в аортах B1 (8,5-кратная) и B10 (16-кратная). Для остальных аорт подобные отличия носят вероятностный характер, что говорит о необходимости дальнейшего расширения выборки.

Гистограмма 1. Уровень гетероплазмы A1555G в гомогенатах интимы аорт.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что соматическая митохондриальная мутация A1555G в гене 12S rРНК ассоциирована с атеросклерозом. Возможно, это связано с тем, что данная мутация приводит к дис-

функции митохондриальной рибосомы человека, в связи с чем нарушается синтез ферментов дыхательной цепи. Это может привести к окислительному стрессу и возникновению атеросклеротических поражений в интимае аорты человека.

Таблица 1. Сравнение процента митохондриальной мутации A1555G в гомогенатах пораженной атеросклерозом и нормальной интимы аорт.

	№ аорты									
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Норма	6	0	38	28	26	29	43	16	16	11
Поражение	51	16	38	28	22	33	40	12	15	13

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, государственный контракт №14.512.11.0027.

Список литературы.

1. С.А. Шальнова, А.Д. Деев. Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение (по данным клинико-эпидемиологических исследований). *Терапевтический архив*. 2011; 83(1): 1.
2. М.М. Иванова, М.А. Сазонова, А.В. Желанкин с соавт. Мутации митохондриального генома в патологии человека. *Фундаментальные науки и практика*. 2010; 1(4): 164-167.
3. А.В. Желанкин, М.А. Сазонова. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии и различных видов кардиомиопатии. *Проблемы и перспективы современной науки* 2011; 3(1): 85-87.
4. К.Ю. Митрофанов, М.А. Сазонова. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца. *Проблемы и перспективы современной науки* 2011; 3(1): 92-96.
5. H. Chen, J. Zheng, L. Xue, et al. The 12S rRNA A1555G mutation in the mitochondrial haplogroup D5a is responsible for maternally inherited hypertension and hearing loss in two Chinese pedigrees. *Eur J Hum Genet*. 2012; 20(6): 607-12.
6. 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.

7. И.А. Собенин, М.А. Сазонова, А.Ю. Постнов с соавт. Патентная заявка от 9.10.2010 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный № 2010141594.
 8. 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.
 9. 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.
 10. M.A. Sazonova, Y.Y. Budnikov, Z.B. Khazanova, et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1): 184–190.
 11. M.A. Sazonova, Y.Y. Budnikov, Z.B. Khazanova, 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.
 12. 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.
-