

Анализ гетероплазмии митохондриальной мутации G12315A гена в гомогенатах пораженной интимы аорты, полученных при аутопсии

М.А. Сазонова^{1,2}, С.А. Косогорова², В.В. Синёв¹, В.А. Баринова¹, З.Б. Хасанова¹, Ю.В. Бобрышев², И.А. Собенин^{1,2}

¹ ФГБУ РКНПК МЗ РФ, Москва

² ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Абстракт

Цель. Проведение оценки уровня гетероплазмии мутантного аллеля G12315A в образцах ДНК, полученных из общих гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили общие гомогенаты пораженных и нормальных участков интимы аорты. После амплификации ДНК по мутации G12315A образцы были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмии мутантного аллеля.

Результаты. Полученные данные по мутации G12315A показывают, что уровень гетероплазмии в гомогенатах атеросклеротического поражения достоверно выше по сравнению с гомогенатами из нормальной сосудистой ткани.

Заключение. Результаты позволяют предположить, что однонуклеотидная замена гуанина на аденин в позиции 12315 митохондриального генома приводит к дефекту транспортной РНК-лейцин и неспособности выполнять свою функцию мутантными тРНК. Следствием критического уровня гетероплазмии по данной мутации является снижение количества ферментов дыхательной цепи в митохондриях, ведущее к падению уровня выработки энергии в клетке.

Ключевые слова: Мутация, митохондриальный геном, гомогенат, интима, аорта, атеросклероз.

Analysis of mitochondrial gene G12315A heteroplasmy mutations in homogenates of lesions of the human aortic intima

M.A. Sazonova^{1,2}, S.A. Kosogorov², V.V. Sinev¹, V.A. Barinova¹, Z.B. Khasanova¹, Yu.V. Bobryshev², I.A. Sobenin^{1,2}

¹ Russian Cardiology Research Complex, Moscow

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

Abstract

Aim. To assess the level of heteroplasmy in the mutant allele G12315A in DNA samples obtained from total homogenates of normal and atherosclerotic intimal 10 aortas.

Materials and methods. Homogenization affected and normal sections of aortic intima. Conducting amplification study mutations and then holding pyrosequencing to identify percent heteroplasmy for a curious mutation.

Results. The data for the mutation G12315A shows that level of heteroplasmy in homogenates of atherosclerotic statistically significant higher compared with homogenates of normal vascular tissue.

Conclusion. The results suggest that a single nucleotide change of guanine to adenine at position 12315 of the mitochondrial genome leads to defect tRNA-Leu and the inability to perform its function of mutant tRNAs. A consequence of the critical level of heteroplasmy for the mutation is reduction of enzymes in the mitochondrial respiratory chain, leading to decrease of cell energy level.

Keywords: mitochondrial mutations, total intimal homogenates, atherosclerosis, heteroplasmy, mutation.

Соматические мутации митохондриального генома человека могут быть причинами развития атеросклероза [1-3]. Митохондриальная ДНК человека – кольцевая двухцепочечная молекула, состоящая приблизительно из 16500 пар нуклеотидов, которая содержит 37 генов: 22 гена транспортных РНК, 2 гена рибосомальных РНК и 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи: цитохрома b, АТФазы, цитохром-С-оксидазы, NADH-дегидрогеназы [4].

В настоящей работе была проведена оценка уровня гетероплазмии мутантного аллеля G12315A в образцах ДНК, полученных из гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт.

Материал и методы.

Материалом для исследования послужили общие гомогенаты ткани интимы 10 аорт. Эпителий

сосудистой ткани был взят у лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Затем проводили гомогенизирование пораженных участков интимы аорты. Масса забираемого участка аорты составляла около 10 мкг. Образцы с нормальными участками интимы аорт также подвергались гомогенизированию.

Выделение тотальной ДНК из исследуемых образцов ткани проводили с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Затем образцы амплифицировали на MJ Research, PTC-200, USA. После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмы по мутации G12315A.

ПЦР фрагментов, содержащую область мутации, проводили со следующим праймерами: прямой bio-CTCATGCCCCCATGTCTAA (12230-12249), обратный bio-AAGTCCTAGGAAAGTGACAGCGAGG (13825-13806). Праймеры для ПЦР и пиросеквенирования были подобраны с помощью онлайн программы Primer3.

Подсчет процента гетероплазмы проводился согласно оригинальному методу, разработанному в нашей лаборатории на основе технологии пиросеквенирования. Расчет величины гетероплазмы проводился на основе полученных пиков пирогаммы [5-7].

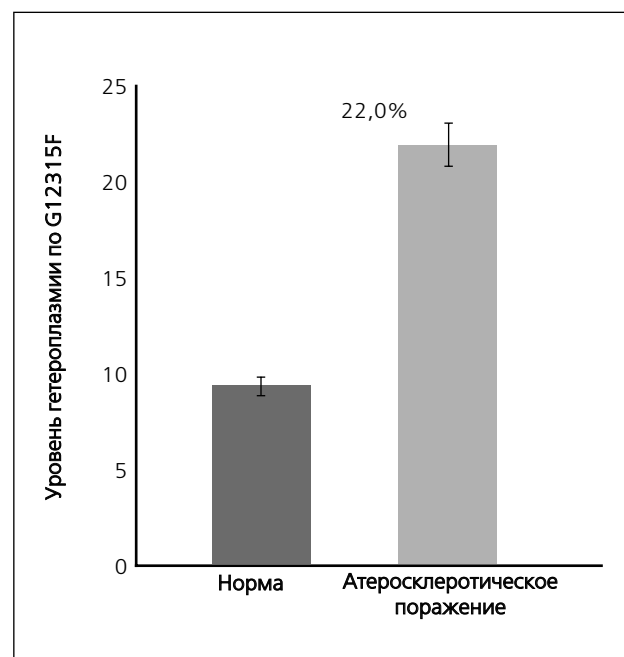
Статистическая обработка данных проводилась методом бутстрэп-анализа.

Результаты и обсуждение.

В настоящей работе был проанализирован процент гетероплазмы мутации в G12315A в общих гомогенатах нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт человека. Полученные данные показали, что уровень гетероплазмы по данной мутации в общих гомогенатах атеросклеротического поражения выше, чем в гомогенатах нормальной сосудистой ткани на уровне значимости $p \leq 0,004$ (рис.1).

Следует отметить, что при мутации G12315A изменяется нуклеотид 52 транспортной РНК-лейцин, входящий в состав стебелька Т-петли [8]. Общие принципы складывания цепей тРНК в компактную третичную структуру (L-форму) универсальны. При этом D- и Т-петли оказываются сближенными и скрепляются между собой путем образования дополнительных связей между основаниями (трехнуклеотидная структура). В образовании этих связей, как правило, принимают участие консервативные или полуконсервативные остатки. Одним из них для тРНК-лейцин и является нуклеотид 52 (гуанин, функциональная группа, присоединенная к пуриновому кольцу =O). При замене гуанина на аденин (функциональная группа, присоединенная в том же месте к пуриновому кольцу – NH2) третичная структура тРНК нарушается, что ведёт к её нефункциональности. Итогом такого развития событий является меньшая интенсивность формирования

Рисунок 1. Сравнительный анализ уровня гетероплазмы общих гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт по мутации G12315A



Примечание: * – различие G12315A с гомогенатами атеросклеротического поражения ($p \leq 0,004$).

комплексов тРНК-лейцин и, как следствие, понижение вероятности корректного включения данной аминокислоты в полипептидные цепи. Следствием критического уровня гетероплазмы по мутации G12315A, по всей видимости, является снижение количества ферментов дыхательной цепи в митохондриях, ведущее к падению уровня выработки энергии в клетке

Финансирование.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, госконтракт 14.512.11.0027

Список литературы.

1. Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В., с соавт. Мутации митохондриального генома в патологии человека. *Фундаментальные науки и практика*. 2010;1(4):164-7.
 2. Желанкин А.В., Сазонова М.А. 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):85-7.
 3. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца. *Проблемы и перспективы современной науки*. 2011;3(1):92-6.
 4. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. April 1981. *Nature*. 290;(5806):457-65.
 5. Sazonova M, Budnikov E, Khasanova Z, 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.
 6. 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):45-6.
 7. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2011;4:81-4.
 8. Yamagata K, Muro K, Usui J, et al. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(7):1816-23.
-