Тканевые особенности полиморфизмов митохондриальной ДНК

Н.А. Литвинова, А.С. Воронкова, Е.А. Николаева, В.С. Сухоруков

ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии» ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва

Tissue-specific features of mitochondrial DNA polymorphisms

N.A. Litvinova, A.S. Voronkova, E.A. Nikolaeva, V.S. Sukhorukov

Research Clinical Institute of Pediatrics, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Митохондриальная ДНК (мтДНК) имеет полиплоидную природу, т.е. содержится в тысячах копий внутри каждой клетки. Однако копии мтДНК различаются между собой (гетероплазмия) – в силу наследственности или по причине соматических мутаций. При этом гетероплазмия может наблюдаться как на внутриклеточном, так и на межклеточном или межтканевом уровне. Распределение вариантов мтДНК в тканях неоднородно. В статье описаны результаты секвенирования первичной последовательности митохондриального генома, которое проводилось в связи с подозрением на митохондриальную энцефаломиопатию. Необходимо дальнейшее изучение патогенетической значимости вариантов мтДНК. В связи с тем что образцы крови и буккального эпителия каждого пациента различаются между собой по обнаруженным вариантам мтДНК, крайне важно направлять на секвенирование несколько образцов из различных тканей.

Ключевые слова: дети, митохондрии, митохондриальная ДНК, секвенирование, гетероплазмия.

Mitochondrial DNA (mtDNA) has a polyploid structure, i.e. every cell contains thousands of mtDNA copies. However, in view of heredity or somatic mutations, mtDNA copies vary from one another (heteroplasmy). Moreover, heteroplasmy may occur at both the intracellular, intercellular, or even intertissue level. The tissue distribution of mtDNA variants is heterogeneous. The paper describes the results of mitochondrial genome primary sequencing carried out because of suspected mitochondrial encephalomyopathy. There is a need for further investigation of the pathogenetic value of mtDNA variants. Due to the fact that blood and buccal epithelial samples from each patient vary in the found mtDNA variants, it is very important to send a few samples from different tissues for sequencing.

Key words: children, mitochondria, mitochondrial DNA, sequencing, heteroplasmy.

Митохондрия – высокоспециализированная органелла, присутствующая практически во всех эукариотических клетках и продуцирующая клеточную энергию путем окислительного фосфорилирования. Кроме того, митохондрия является ключевым компонентом кальциевой сигнализации, регуляции клеточного метаболизма, синтеза гема и стероидов, апоптоза [1].

Митохондрии обладают собственным полуавтономным геномом. Он содержит 37 генов, кодирующих субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования, транспортные и рибосомальные РНК-органеллы. Дефекты митохондриальных генов могут приводить к широкому спектру мультиорганных заболеваний, таких как наследственная атрофия зрительных нервов Лебера (LHON), синдромы NARP, MERRF, MELAS, Кернса–Сейра, Пирсона и др. [2].

Как известно, каждая клетка содержит тысячи копий митохондриальной кольцевой ДНК (мтДНК). При этом митохондриальный генотип клетки неоднороден: различные варианты последовательности

мтДНК сосуществуют в разных пропорциях внутри одной клетки (гетероплазмия) [2].

Гетероплазмия является основой многих фенотипических индивидуальных особенностей организма. Согласно последним исследованиям каждый четвертый человек наследует от матери несколько вариантов митохондриального генома [3]. Другой причиной митохондриальной гетероплазмии являются соматические мутации, уровень которых в митохондриях гораздо выше, чем в ядре [4]. При клеточном делении различные варианты мтДНК случайным образом распределяются между новыми клетками. Таким образом, различия в мтДНК могут присутствовать на нескольких уровнях: между копиями ДНК внутри одной митохондрии; между ДНК, находящимися в разных митохондриях внутри одной клетки; а также между митохондриями в разных клетках и тканях одного организма.

Как соматическая, так и наследственная гетероплазмия в силу различных причин неравномерно и непредсказуемо распределяется в тканях. С течением жизни уровень гетероплазмии может меняться. При определенных условиях, например, при достижении патогенным вариантом мтДНК некоторого количественного порога, возможна манифестация клинической симптоматики, обусловленной недостаточностью митохондриального биоэнергетического обмена [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение межтканевого распределения различных вариантов митохондриальной ДНК у пациентов с энцефаломиопатией предположительно митохондриального генеза.

© Коллектив авторов, 2015

Ros Vestn Perinatol Pediat 2015; 5:76–78

Адрес для корреспонденции: Литвинова Наталья Александровна – н.с. научно-исследовательской лаборатории общей патологии Научно-исследовательского клинического института педиатрии

Воронкова Анастасия Сергеевна – н.с. той же лаборатории

Сухоруков Владимир Сергеевич – д.м.н., проф., зав. той же лаборатории
Николаева Екатерина Александровна – д.м.н., гл.н.с. отдела психоневрологии и наследственных заболеваний с нарушением психики того же учреждения

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

Материал и методы

Обследованы 20 пациентов с предварительным диагнозом: митохондриальная энцефаломиопатия. В качестве материала для исследования использовалась венозная кровь, нанесенная на специальные фильтровальные диски («сухие пятна»), а также соскоб буккального эпителия.

У выделенной из биоматериала мтДНК определялась полная первичная последовательность секвенированием по методу Сэнгера с детекцией капиллярным электрофорезом. Полученную последовательность сравнивали с референсной ROI rCRS GB NC_012920 и проводили несколько этапов биоинформатической обработки данных, согласно концепции исследования. В частности, мы анализировали распределение вариантов мтДНК в разных тканях, а также распределение митохондриальных гаплогрупп среди пациентов. Анализ генетических вариантов проводился с использованием базы данных MITOMAP [6].

Валидация результатов выполнялась с помощью поэтапной системы контролей:

- положительный и отрицательный контроль реакции амплификации;
- электрофорез в агарозном геле амплифицированных фрагментов с использованием маркера молекулярного веса;
- секвенирование стандартной плазмиды с известной последовательностью нуклеотидов;
- контроль контаминации тотальной ДНК человека (лабораторных помещений, рабочих материалов, мебели, инструментов, реагентов, используемых в лаборатории);
- контроль контаминации мтДНК человека.

Качественную и количественную оценку прочтения каждого нуклеотида получали при обработке полученных данных профессиональным программным обеспечением LifeTechnologies (США).

Результаты и обсуждение

Первый этап биоинформатической обработки данных заключался в поиске описанных в литературе мутаций, связь которых с митохондриальными заболеваниями подтверждена. Согласно базе данных MITOMAP, мутации G583A, C1494T, A1555G, G1606A, A3243G, C3256T, A3260G, T3271C, T3291C, A3302G, C3303T, G4298A, A4300G, G4308A, G4332A, A5537AT, G5650A, G5703A, A7445G, C7471CC, G7497A, T7511C, A8344G, T8356C, G8363A, T10010C, G12147A, G12315A, T14674C, T14709C, G3460A, G3635A, G3697A, G3700A, G3733A, G3890A, C4171A, A7445G, T8993C, T8993G, T9176C, T9176G, T9185C, T10158C, T10191C, G10197A, T10663C, C11777A, G11778A, T12706C, G13513A, A13514G, G14459A, C14482A, C14482G, T14484C, T14487C, A14495G, C14568T выявлены не были.

На следующем этапе были проанализированы гаплотип-характерные полиморфизмы. Данные варианты описаны в литературе как относящиеся к гаплотипам либо имеют тенденцию к более частому выявлению их у людей, проживающих на территории Российской Федерации. Распространено мнение, что гаплотип-характерные полиморфизмы могут оказывать некоторое влияние на развитие и течение различных заболеваний. Однако достоверных данных, подтверждающих это предположение, на сегодняшний день не существует [7]. У каждого пациента такие полиморфизмы были идентичны в крови и в буккальном эпителии.

Далее мы исследовали распределение в разных тканях генных вариантов мтДНК, не являющихся маркерами гаплогрупп и связь с заболеваниями которых на данный момент не установлена. На этом этапе были установлены значительные межтканевые различия. В среднем у каждого пациента менее половины выявленных вариантов мтДНК встречались в обоих исследованных тканях.

Например, исключительно в образцах крови пациентов были обнаружены варианты G1719A, C4577T, A5427G, T6221C, C6371T, T6896C, C7028T, A7570G, C8393T, A9632G, T9701C, G11914A, G13798A, A14696G, G15927A, T16126C, G16145A, T16189C, T16231C, C16261T, T16519C. При этом в буккальном эпителии тех же пациентов были выявлены варианты 315insC, 523del2(AC), A2757G, G3010A, C4883T, C5178A, C8414T, A8701G, T9540C, C10192T, G11696A, G12630A, C12705T, C13788T, C14668T, T14783C, G15043A, G15301A, C15452A, C16223T, C16242T, T16362C, C16465T.

Часть выявленных вариантов в некоторых научных работах ассоциирована с различными заболеваниями. Так, генный вариант G3010A ассоциирован с синдромом циклической рвоты [8], T4216C – с LHON [9] и инсулинорезистентностью [10], A12308G – с СРЕО (хроническая прогрессирующая наружная офтальмоплегия) [11], инсультом [12], кардиомиопатией [13]. Ряд вариантов прежде не был описан в литературе как потенциально патогенные. Таким образом, данные литературы указывают на то, что некоторые выявленные нами генные варианты могут иметь значение при патологических процессах, связанных с энергетическим дисбалансом клеток и тканей. Изменения митохондриального генома при этом могут быть связаны с патологией первично или вторично. Межтканевые различия выявленных генных вариантов, возможно, связаны с тканевыми особенностями проявления энергетического дисбаланса.

Заключение

В большинстве случаев в результате исследования митохондриального генома у больных с подозрением на митохондриальную энцефаломиопатию известные патогенные мутации не выявляются. При этом

у пациента может присутствовать ряд вариантов, точное значение которых не установлено. Некоторые из обнаруженных вариантов обозначены в научных работах как потенциально патогенные. Данные исследования указывают на то, что эти нуклеотидные замены в последовательности мтДНК, возможно, изменяют состав митохондриального протеома и, как следствие, влияют на клинический фенотип. Однако для установления патогенетической значимости вариантов мтДНК необходимо их дальнейшее

изучение у больных с подозрением на заболевания митохондриального происхождения.

Согласно результатам нашего исследования распределение вариантов мтДНК в крови и буккальном эпителии значительно различается. Многие варианты могут быть обнаружены только в одной из тканей. В связи с этим крайне важно направлять на исследование митохондриального генома несколько видов биоматериала: кровь, буккальный эпителий, биоптат мышечной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Van der Giezen M., Tovar J.* Degenerate mitochondria. *EMBO Rep* 2005; 6: 6: 525–530.
2. *Chinnery P.F., Hudson G.* Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 2013; 106: 1: 135–159.
3. *Payne B., Wilson I., Yu-Wai-Man P. et al.* Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Human Molecular Genetics* 2013; 22: 2: 384–390.
4. *He Y., Jian Wu J., Iacobuzio-Donahue C. et al.* Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumor cells. *Nature* 2010; 464: 7288: 610–614.
5. *Сухоруков В.С.* Очерки митохондриальной патологии. М: ИД Медпрактика-М 2011; 288. (Suchorukov V.S. *Mitochondrial pathology outlines*. Moscow: Medpraktika 2011; 288.)
6. www.mitomap.org
7. *Сухоруков В.С., Воронкова А.С., Литвинова Н.А.* Клиническое значение индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК. *Рос вестн перинатол и педиат* 2015; 3: 10–20. (Suchorukov V.S., Voronkova A.S., Litvinova N.A. *Clinical relevance of individual mitochondrial DNA characteristics*. *Ros Vestn Perinatol Pediat* 2015; 3: 10–20.)
8. *Venkatesan T., Zaki E., Kumar N. et al.* Quantitative pedigree analysis and mitochondrial DNA sequence variants in adults with cyclic vomiting syndrome. *BMC Gastroenterology* 2014; 14: 181.
9. *Bosley T., Abu-Amero K.* Assessing mitochondrial DNA nucleotide changes in spontaneous optic neuropathies. *Ophthalmic Genetics* 2010; 31: 4: 163–172.
10. *Crispim D., Canani L., Gross J. et al.* The European-specific mitochondrial cluster J/T could confer an increased risk of insulin-resistance and type 2 diabetes: an analysis of the m.4216T > C and m.4917A > G variants. *Ann Hum Genet* 2006; 70: 4: 488–495.
11. *Van den Ouweland J., Bruining G., Lindhout D. et al.* Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4: 679–682.
12. *Pulkes T., Sweeney M., Hanna M. et al.* Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet* 2000; 356: 9247: 2068–2069.
13. *Zifa E., Theotokis P., Kaminari A. et al.* A novel G3337A mitochondrial ND1 mutation related to cardiomyopathy cosegregates with tRNA^{Leu}(CUN) A12308G and tRNA^{Thr} C15946T mutations. *Mitochondrion* 2008; 8: 3: 229–236.

Поступила 16.07.15

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-08416.