

М.А. Сазонова^{1,2,3}, С.Д. Нурбаев³, М.М. Чичёва^{1,3},
К.Ю. Митрофанов^{1,3}, А.Н. Орехов^{1,3}, А.Ю. Постнов², И.А. Собенин^{1,2,3}

Детекция митохондриальных мутаций генов цитохромов В и С в липофиброзных бляшках интимы аорты человека (сообщение 1)

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс»

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

³ Научно-исследовательский институт атеросклероза, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д. 100

В настоящей работе проведена пилотная детекция уровня гетероплазмии десяти мутаций митохондриальных генов, кодирующих цитохромы В и С, в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорты человека. Установлено, что соматические мутации митохондриального генома G14846A и G15059A, локализованные в гене, кодирующем цитохром В, одном из ключевых ферментов дыхательной цепи, ассоциированы с липофиброзными бляшками интимы аорты человека. Это позволяет предположить, что генетический дефект цитохрома В может вызывать окислительный стресс в интиме аорты, приводящий к локальному возникновению атеросклеротических поражений.

Ключевые слова: митохондриальная мутация, гетероплазмия, атеросклероз, интима, липофиброзная бляшка, ген цитохрома В

М.А. Sazonova^{1,2,3}, S.D. Nurbaev³, M.M. Chicheva^{1,3}, K.Yu. Mitrofanov^{1,3},
A.N. Orekhov^{1,3}, A.Yu. Postnov², I.A. Sobenin^{1,2,3}

Detection of mitochondrial mutations in genes of cytochromes B and C in lipofibrous plaques in intima of human aortas

¹ Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² Russian Cardiology Research and Production Complex, 15a, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

³ Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, Moscow, Russian Federation, 100, Novaya str., Moscow, 143025, Russia

In the present study a pilot detection of heteroplasmy level of ten mutations in mitochondrial genes, coding cytochrome B and C in lipofibrous plaques and normal intimas of human aortas was held. It is revealed, that somatic mutations of mitochondrial genome G14846A and G15059A localized in a gene coding cytochrome B, one of the key enzymes of respiratory chain, are associated with the presence of atherosclerotic plaques in intima of human aorta. It can be suggested that genetic defects of cytochrome B may cause oxidative stress in intima aorta resulting in development of local atherosclerotic lesions.

Key words: mitochondrial mutation, heteroplasmy, atherosclerosis, intima, lipofibrous plaque, gene of cytochrome B

В основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний, преобладающих среди причин смерти людей в XXI веке, лежат атеросклеротические поражения интимы сосудов. 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. Их пенетран-

тность и экспрессивность зависит от уровня гетероплазмии. Поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями человека необходима количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома [2—5, 7—10, 12—15, 23, 26, 28].

В настоящей работе проведена пилотная детекция уровня гетероплазмии десяти мутаций митохондриальных генов, кодирующих цитохромы В и С, в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорты человека.

Как известно из литературных источников, данные мутации ассоциированы с митохондриальными миопатиями, парциальными эпилептическими припадками, молочнокислым ацидозом, замедленным ростом и некоторыми другими патологиями человека [18, 21, 30].

Для корреспонденции: Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГУ «РКНПЦ» Минздравсоцразвития РФ, НИИ атеросклероза. E-mail: daisy29@mail.ru

Методика

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

Митохондриальную ДНК выделяли из образцов с помощью набора AQUAPURE GENOMIC TISSUE KIT фирмы BioRad, следуя соответствующим протоколам.

Аmplификацию фрагментов, содержащих область мутаций, осуществляли со праймерами, приведенными в табл. 1.

Режим ПЦР и размер амплификатов указаны в табл. 2.

Пиросеквенирование амплификатов проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQTMHS96MA [16, 17, 19, 25, 29, 31].

Праймеры для ПЦР и пиросиквенса подбирались с помощью программы Primer3 [22].

Визуализация результатов осуществлялась на основе программы, прилагающейся при установке пиросеквенатора, с помощью нового оригинального метода, разработанного авторами [6, 11, 27].

Для подсчета процента гетероплазии мутаций по данным пирограммы используется ранее разработанная авторами формула [11]:

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

где:

P — процент гетероплазии;

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.

Таблица 1

Праймеры для ПЦР и пиросиквенса [2—5, 7—10, 12—15, 23, 26, 28]

Ген	Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР	Сиквенс-праймер
Ген субъединицы 1 цитохром-С-оксидазы	C6489A	GGGCCATCAATTTTCAT CACAACAA (6382—6405)	bio-CAGCAGCTAGGACT GGGAGAGATAGGA (6516—6490)	AATCAGCAGCTCCTACT (6470—6487)
Ген субъединицы 3 цитохром-С-оксидазы	G9379A	bio-CACTAACCATATA CCAATGA (9358—9377)	CTCCTGATGCGAGTAA TACGGATGT (9630—9605)	TCTCGTGTACATCGC (9397—9382)
	9480del15			TGGTAAAAGGCTCAGAA (9514—9498)
	9537delC			CCAGTGCCCTCCTAAT (9554—9539)
Ген цитохрома В	G14846A	bio-CATTATTCGCA CGGACT (14671—14689)	GCTATAGTTGCAAGCAGGAG (15120—15100)	GCGCCAAGGAGTGA (14861—14848)
	G15059A			TTTCTGAGTAGAGAAATGAT (15080—15061)
	G15084A			GGATAATGCCGATGTT (15101—15086)
	C15452A	bio-ACCTTCCACCC TТАCTACA (15401—15419)	TGTAGGCGAATAGGAAATATC (15581—15561)	ATGTCATTAAGGAGAGAA (15470—15453)
	del 15498 to 15521			GTGTTTAAGGGGTTGG (15537—15522)
	G15762A	GCCCGAATGATATTTTCCTAT (15553—15572)	Bio-GCTTTGGGTGC TAATGGTGG (15996—15977)	TCATTCTAACCTGAATCG (15744—15761)

Таблица 2

Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl ₂ в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
G9379A, 9480del15, 9537delC	273 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
G14846A, G15059A, G15084A	450 п.н.	1,5 мМ			
C15452A, del 15498 to 15521	181 п.н.	2,5 мМ			
G15762A	444 п.н.	1,5 мМ	94°	50°	72°
C6489A	135 п.н.	1,5 мМ			

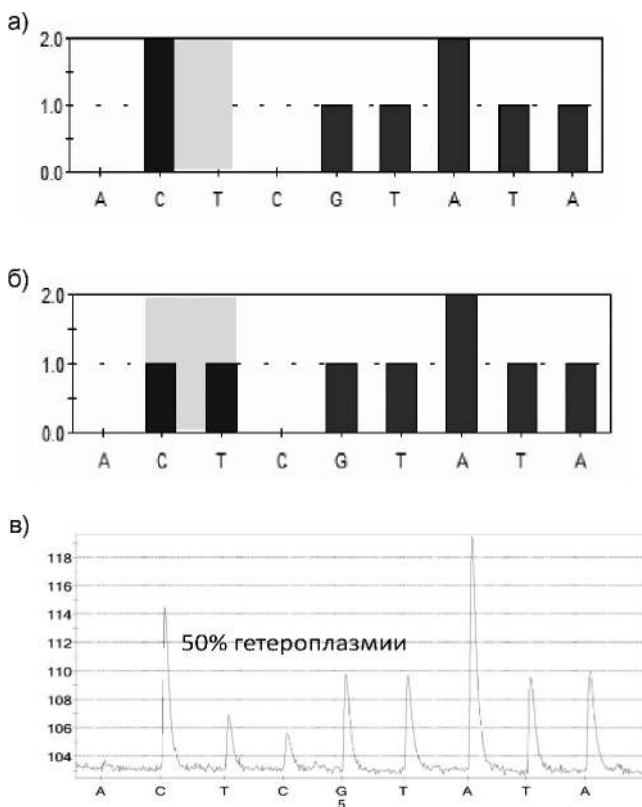


Рис. 1. Детекция уровня гетероплазии мутации G15059A (С→Т при использовании обратного праймера для сиквенса): 1 — 100% гомоплазии по нормальному аллелю С; 2 — 100% гомоплазии по мутантному аллелю Т; 3 — 50% гетероплазии по мутантному аллелю Т

Например, согласно данной формуле, процент гетероплазии по мутации G15059A (С→Т при использовании обратного праймера для сиквенса) 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 артерии человека [1, 20, 24].

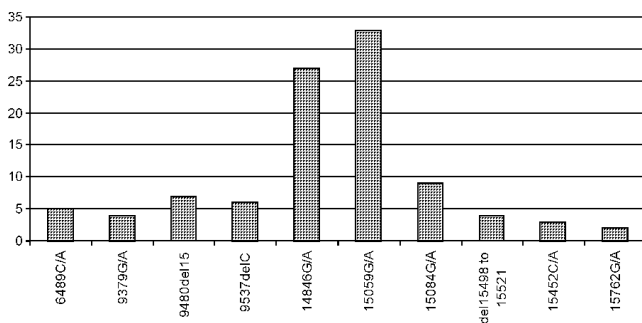


Рис. 2. Результаты бутстрэп-анализа по 10 мутациям гена цитохрома В (пояснение в тексте).

Результаты и обсуждение

В результате бутстрэп анализа методом повторных выборок выявлены ассоциации двух из десяти исследуемых мутаций, с порогом встречаемости более 25% на 1000 бутстрэп-выборках, для остальных мутаций порог встречаемости оказался менее 8% (рис. 2). В дальнейшем были проанализированы уровни гетероплазии. Согласно полученным данным, уровень гетероплазии мутаций G14846A и G15059A был значительно выше в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью в 43% аорт. По остальным восьми митохондриальным мутациям достоверных различий между нормой и патологией не обнаружено.

Обе мутации были ранее выявлены у пациентов с митохондриальными миопатиями. Каждая вызывает определенную аминокислотную замену в цитохроме В. Мутация G14846A снижает активность фермента, в то время мутация G15059A является нонсенс-мутацией, вызывающей образование стоп-кодона, в результате которого происходит потеря 244 аминокислотных остатков цитохрома В.

Заключение

Соматические мутации митохондриального генома G14846A и G15059A, локализованные в гене, кодирующем цитохром В, одном из ключевых ферментов дыхательной цепи, ассоциированы с липофиброзными бляшками интимы артерии человека. Это позволяет предположить, что генетический дефект цитохрома В может вызывать окислительный стресс в интиме артерии, приводящий к локальному возникновению атеросклеротических поражений.

Данная информация может быть полезна для выявления группы риска, проведения ранней и своевременной диагностики и медико-генетическое консультирование отягощенных атеросклерозом семей практикующими врачами и медицинскими генетиками.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.

Список литературы

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Пер. с англ. — М.: Мир, 1995. — 400 с., ил.
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. — Т. 3, №1. — С. 85—87.

3. **Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В.** и др. Мутации митохондриального генома в патологии человека // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, №4. — С. 164—167.
4. **Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А.** Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца // *Проблемы и перспективы современной науки*. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 92—96.
5. **Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М.** и др. Анализ мутации митохондриального генома A1555G при атеросклерозе интимы аорты человека // *Современный мир, природа и человек*. — 2011. — Т. 2, №1. — С. 67—69.
6. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, №2. — С. 19—21.
7. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Ассоциация мутации митохондриального генома 652INSG с атеросклеротическими поражениями человека // *Фундаментальные науки и практика*. — 2010. — Т. 1, №4. — С. 168—171.
8. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Детекция мутации митохондриального генома человека 652insG при атеросклеротических поражениях сосудов человека // *Молекулярная диагностика-2010: Сб. трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. — 2010. — Т. 5. — С. 109—112.
9. **Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В.** и др. Детекция митохондриальной делеции гуанина в позиции 652 при атеросклеротических поражениях человека // *Проблемы и перспективы современной науки*. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 105—107.
10. **Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н.** Патентная заявка «Способ количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома в лейкоцитах крови человека». Входящий №065647, регистрационный №2009146012, от 14.12.2009.
11. **Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.** Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома // *Пат. физиол. Экспер. тер.* — 2011. — №4. — С. 82—85.
12. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н.** Патентная заявка от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу», регистрационный №2010133468.
13. **Собенин И.А., Мясоедова В.А., Сазонова М.А.** и др. Разработка метода комплексной оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений на основе анализа генотипа и фенотипа // *Сб. тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 годы»*. — М.: 25—27 ноября 2009 г. — С. 134—135.
14. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Мясоедова В.А.** и др. Полиморфизм 3256C/T митохондриальной ДНК как маркер ишемической болезни сердца и атеросклероза // *Проблемы и перспективы современной науки*. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 108—110.
15. **Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Романенко Е.Б., Орехов А.Н.** Патентная заявка от 11.10.2010 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный №2010141594.
16. **Agaton C., Unneberg P., Sievertzon M.** et al. Gene expression analysis by signature pyrosequencing // *Gene*. — 2002. — Vol. 289. — №1—2. — P. 31—39.
17. **Alderborn A., Kristofferson A., Hammerling U.** Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing // *Genome Res.* — 2000. — №10. — P. 1249—1258.
18. **Andreu A.L., Hanna M.G., Reichmann H.** et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA // *N. Engl. J. Med.* — 1999. — Sep. — Vol. 341, №14. — P. 1037—1044.
19. **Chen D.C., Saarela J., Nuotio I.** et al. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping // *J. Mol. Diagn.* — 2003. — №5. — P. 243—249.
20. **Efron B.** The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38, SIAM, Philadelphia, 1982.
21. **Horvath R., Scharfe C., Hoeltzenbein M.** et al. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene // *J. Med. Genet.* — 2002. — Nov. — Vol. 39, №11. — P. 812—816.
22. <http://simgene.com/Primer3>
23. **Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y.** et al. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis. 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10—13, 2007. *Atherosclerosis Suppl.* — 2007. — 8(1). — P. 46.
24. **Quenouille M.** Notes on bias in estimation // *Biometrika*. — 1956. — 43. — P. 253—260.
25. **Ronaghi M.** Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing // *Genome Reseach.* — 2001. — №11. — P. 3—11.
26. **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. — Vol. 9(1). — P. 113.
27. **Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.** 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. — Vol. 8(1). — P. 45—46.
28. **Sazonova M.A., Budnikov Ye.Ye., Khazanova Z.B.** et al. Possible role of somatic mitochondrial mutations in the development of atherosclerotic lesion of human aorta // ACC 57th Annual Scientific Session, Chicago, USA, March 29 — April 1, 2008 // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2008. — Vol. 51(10). — Suppl.A. — A285.
29. **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. — Vol. 47. — P. 3620—3622.
30. **Varlamov D.A., Kudin A.P., Vielhaber S.** et al. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene // *Hum. Mol. Genet.* — 2002. — Aug. — Vol. 11, №16. — P. 1797—1805.
31. **Wasson J., Scolnick G., Love-Gregory L.** et al. Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology // *BioTechniques*. — 2002. — Vol. 32. — P. 1144—1452.

Поступила 14.08.12

Сведения об авторах:

Нурбаев Серик Долдашевич, в.н.с., Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

Чичёва Мария Михайловна, м.н.с., Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук (Москва);

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

Митрофанов Константин Юрьевич, м.н.с., Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук;

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия

Орехов Александр Николаевич, профессор, д.б.н., зав. лабораторией механизмов атерогенеза НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН;

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия, 143025, Московская обл., Одинцовский район, дер.Сколково, ул.Новая, д.100, оф. 24, 25

Постнов Антон Ювенальевич, д.м.н., зав. лабораторией медицинской генетики Института клинической кардиологии ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России

Собенин Игорь Александрович, д.м.н., в.н.с., Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;

ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России, Москва, 121552, ул. 3-я Черепковская, д.15а;

Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, Россия, 143025, Московская обл., Одинцовский район, дер.Сколково, ул. Новая, д.100, оф. 24, 25