

На правах рукописи

Патрушев Максим Владимирович

**ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ  
ДЕЙСТВИИ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ**

*03.00.03. – молекулярная биология*

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

ПУЩИНО – 2006

Работа выполнена в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Ушакова Т.Е.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Матвиенко Н.И.

доктор химических наук, профессор

Брусков В.И.

Ведущая организация:

Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится в на заседании диссертационного совета Д.002.038.01 при Институте биофизики клетки РАН по адресу:  
142290, Московская область, г.Пушкино, ул. Институтская, 3, ИБК РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной библиотеке ИЦБИ РАН по адресу:  
142290, Московская область, г.Пушкино, ул. Институтская, 3, ИБК РАН.

Автореферат разослан

2006г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

кандидат биологических наук



Смолихина Т.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

За последние 20-30 лет сложились основные представления о структуре мтДНК, процессах ее репликации и транскрипции (Fernandez-Silva et al., 2003). В настоящее время установлено, что подавляющее большинство митохондриальных белков кодируется в ядре, синтезируется в цитоплазме в виде предшественников и импортируется в митохондрии (Ivofa et al., 2004). Собственно митохондриальный геном кодирует лишь небольшое число пептидов-компонентов системы окислительного фосфорилирования, в процессе которого синтезируется АТФ (Attardi and Shatz, 1988). Митохондриальный геном заметно отличается от ядерного: мтДНК имеет кольцевую форму, несколько отличный генетический код, наследуемость по материнской линии, полиплоидность, и транскрибируется единым полицистронным блоком.

Несмотря на относительную автономность и изолированность этой макромолекулы, ядерный геном многих видов растений и животных содержит участки с полной гомологией к фрагментам мтДНК. Например, у человека найдено несколько тысяч митохондриальных псевдогенов, равномерно распределенных по всем хромосомам (Woischnik et al., 2002). Считается, что это следствие эволюционного процесса, в ходе которого шел перенос мтДНК в ядро. Более того, в настоящее время появились свидетельства того, что спонтанные вставки фрагментов мтДНК в ядерный геном могут привести к дисфункции генов (Turner et al., 2003).

К началу настоящего исследования в литературе практически не обсуждался факт выхода фрагментов мтДНК из митохондрий. Существовало лишь единственное предположение о возможности такого процесса, выдвинутое Д.Б. Зоровым [Zorov et al., 1997]. Тем не менее, было известно, что мтДНК, находясь в непосредственной близости от электрон-транспортной цепи, постоянно подвергается атакам свободных радикалов, приводящих к различного рода повреждениям митохондриального генома. Такие повреждения выражаются, как правило, модификациями оснований, одно- или двуниевыми разрывами. Неэффективность систем репарации, постоянные атаки свободных радикалов приводят к тому, что в митохондриях возникают разные по размерам молекулы мтДНК, способные замыкаться в кольцо - явление гетероплазмы. Если такое кольцо содержит область регуляции транскрипции/репликации, то данная молекула, хотя и потеряла часть генома, способна к репликации и транскрипции. Образование делеций мтДНК показано огромным количеством авторов, однако до настоящего времени не изучен механизм их образования и, главное, не ясно, что происходит с фрагментами мтДНК, неспособными к функционированию.

Процессы репликации, транскрипции, степень фрагментации мтДНК в условиях окислительного стресса также все еще остаются недостаточно изученными, несмотря на то, что роль митохондрий широко обсуждается в процессах программируемой клеточной гибели, клеточных патологий, в канцерогенезе. В связи с этим исследование функционирования мтДНК при действии генотоксических агентов – индукторов окислительного стресса (рентгеновское,  $\gamma$ -облучение) является не только оправданным, но и чрезвычайно актуальным.

#### **Цель исследования.**

Целью настоящей работы является исследование функционирования митохондриальной ДНК клеток головного мозга и селезенки при действии генотоксических агентов.

#### **Основные задачи исследования.**

1. Исследование процессов репликации и транскрипции мтДНК клеток головного мозга и селезенки мышей в условиях окислительного стресса, вызванного рентгеновским и гамма – облучением, а также действием цитостатического антибиотика блеомицина.
2. Исследование процессов фрагментации мтДНК в клетках головного мозга при облучении мышей.
3. Выявление роли эндонуклеазы G при фрагментации мтДНК в условиях окислительного стресса.
4. Тестирование цитозольной фракции клеток головного мозга мышей и среды инкубации митохондрий в модельных системах на наличие фрагментов мтДНК.
5. Исследование процессов выхода фрагментов мтДНК из органеллы, сохраняющей свои нативные физиологические характеристики.

#### **Научная новизна работы.**

Настоящее исследование существенно расширяет современные представления о процессах репликации, транскрипции и повреждении мтДНК в условиях окислительного стресса. В данной работе приведены количественные оценки изменений указанных процессов в разных по радиочувствительности тканях (головной мозг и селезенка) мышей при рентгеновском и гамма-облучении, а также при действии цитостатического антибиотика блеомицина. Обнаружено, что вне зависимости от радиочувствительности ткани, изменения транскрипции мтДНК в условиях окислительного стресса носят универсальный характер. На фоне активации процессов репликации и транскрипции мтДНК в данных тканях происходит резкое снижение «дозы гена», в частности гена *nd4*, в результате процессов фрагментации мтДНК и появления крупных делеций. Исследована

роль митохондриальной неспецифической эндонуклеазы G в процессах фрагментации мтДНК.

Впервые зарегистрирован факт выхода фрагментов мтДНК из митохондрий, сохраняющих все функциональные характеристики, при участии РТР, что само по себе играет исключительно важную роль, поскольку расширяет современные представления о процессах, происходящих в митохондриях.

#### **Научно-практическая ценность.**

Фрагментация мтДНК, снижение «дозы определенного гена», появление фрагментов мтДНК в цитозоле клеток может быть в перспективе использовано при оценке генотоксического груза при радиационных авариях, проведении курса радио- химиотерапии онкологических больных, изучении нейродегенеративных болезней человека.

Способ количественной оценки экспрессии митохондриальных генов, с применением 2-х факторов нормализации: мРНК ядерных генов и собственно митохондриальных генов может использоваться при исследовании самых разнообразных научных проблем.

#### **Апробация диссертации.**

Материалы диссертации были представлены на 8-ой и 10-ой Пушкинских школах-конференциях молодых ученых (Пушино, 2004, 2006 гг.); на V съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2006 г.); на 35-ой конференции Европейского общества радиационных исследований (ERRS) (Киев, 2006 г.).

#### **Публикации.**

Основные результаты диссертации опубликованы в 10 печатных работах, из них 4 статьи в реферируемых журналах.

#### **Структура и объем диссертации.**

Диссертационная работа изложена на \_\_\_\_\_ страницах с использованием 31 рисунок и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, собственные экспериментальные данные и их обсуждение, заключение и выводы. Список литературы содержит 270 ссылок.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Все экспериментальные данные, описанные в работе, получены на мышах линий BALB/c и C57bl, содержащихся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН.

**Облучение** в дозах 3, 5, 8, 10 Гр проводили на установке ГУБЕ (Co), мощность облучения - 1.8 Гр/мин, и на установке РУТ 250-15-1, мощность облучения 2 Гр/мин. Через определенные сроки после облучения (10 минут, 1час, 5часов, 24 часа, 48 часов, 72

часа, 1 неделя, 3 недели) мышей декапитировали, извлеченные ткани (печень, мозг, селезенка) промывали холодным физ. раствором и использовали в экспериментах.

**Митохондрии** выделяли из головного мозга и селезенки мышей, согласно описанному методу [Brustovetsky and Dubinsky 1999], в среде выделения [CB], содержащей: магний- 225 мМ, сахароза- 75 мМ, ЭГТА-1 мМ, бычий сывороточный альбумин (BSA)- 0.1%, HEPES- 10 мМ, pH-7.4.

**Измерения  $\Delta\psi$ -m** проводили с использованием флуоресцентного зонда Rhodamine 123 [Emaus et al 1986]. Длина волны возбуждения флуоресценции зонда составляет 488 нм, длина волны регистрации флуоресценции составляет 525 нм. Концентрация зонда - 1мкМ. При соотношении концентрации зонда 1 мкМ/1мг митохондриального белка/1мл наблюдается линейная зависимость изменений интенсивности флуоресценции зонда от изменений  $\Delta\psi$ -m на участке от 200 до 50 мВ и в таких концентрациях Rhodamine 123 абсолютно не влияет на параметры ОФ.

**Выделение нуклеиновых кислот.** Выделение ДНК производили фенол-хлороформной экстракцией с последующим спиртовым осаждением. Выделение РНК осуществляли по методу, описанному Хомчинским и Сачи (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Для точной количественной оценки содержания фрагментов нуклеиновых кислот использовали **ПЦР-РВ** (для оценки количества ДНК) и **ОТПЦР-РВ** (для оценки количества мРНК). ПЦР-РВ и ОТПЦР-РВ проводили с использованием систем для детекции ПЦР – продуктов в реальном времени- IQ5 (Bio-Rad). Система ПЦР-РВ и ОТПЦР-РВ включала технологию TaqMan, основанную на 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы. Зонды были помечены флуорофором на 5' конце и тушителем на 3' конце. Все реакции ПЦР-РВ проводились в буфере, содержащем 10мМ Tris-HCl pH 8.3, 50 мМ KCl, 0,25 мМ dNTPs, 2,5 мМ Mg<sup>2+</sup>, 300 нМ каждого праймера (Таблица 1) и 150 нМ каждого зонда, 1,5 ед. Taq-полимеразы.

Таблица 1. . Праймеры и зонды для ПЦР-РВ и ОТПЦР-РВ

| Название        | Последовательность<br>5'-3'                   |
|-----------------|-----------------------------------------------|
| ND4 FOR 10558   | ATTATTATTACCCGATGAGGGAACC                     |
| ND4 REV 10667   | ATTAAGATGAGGGCAATTAGCAGT                      |
| ND4 PROBE 10590 | ROX-ACGCCTAAACGCAGGGATTATTTCCTA-QUENCHER      |
| COX2 FOR 7309   | CATAGGGCACCAATGATACTGAA                       |
| COX2 REV 7408   | TTCACCAGGTTTATAGGTCGTTT                       |
| COX2 PROBE 7342 | Cy5-TACTGACTATGAAGACCTATGCTTTGAT-QUENCHER     |
| ND6 FOR         | CCCAGCTACTACCATCATICAAGT                      |
| ND6 REV         | GATGGTTTGGGAGATTGGTTGATGT                     |
| ND6 PROBE       | R6G-GTTCGCCGCTACCCCAATCCCTCCTCCAACA- QUENCHER |
| GAPDH For       | GTGAGGGAGATGCTCAGTGT                          |
| GAPDH Rev       | CTGGCATTGCTCTCAATGAC                          |
| GAPDH Probe     | FAM-TAAGAAACCCCTGGACCACCCACCCC- QUENCHER      |
| BETA-ACTIN FOR  | AGCCATGTACGTAGCCATCCA                         |
| BETA-ACTIN REV  | TCTCCGGAGTCCATCACAATG                         |

|                  |                                                |
|------------------|------------------------------------------------|
| BETA-ACTIN PROBE | TexasRed-TGTCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC- QUENCHER |
| Endo 1 - Rev     | AATGTGAGTCAGCCCATCTC                           |
| Endo 1 - For     | ATCAGTAGCGTCCTTGTCTT                           |
| Endo 1 Probe     | ROX-CAACCAGAATGCCTGGAACAACCTT-BHQ2             |

Для относительной количественной оценки мРНК использовался метод, предложенный M.W.Pfaffl. (M.W. Pfaffl, 2001):  $R = E^{-\Delta\Delta Ct}$  где R – относительная экспрессия гена,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{опыт}} - \Delta Ct_{\text{контроль}}$ ,  $\Delta Ct = Ct_{\text{мит кДНК}} - Ct_{\text{я кДНК}}$ .

**Определение нуклеазной активности митохондриального матрикса клосток головного мозга и селезенки мышей.** Митохондрии, выделенные из контрольных и облученных животных, лизировали в буфере (10 mM Tris HCl, pH 7.4). После осаждения нерастворившихся частиц при 10000 g в течение 10 мин, 10 мкл лизата инкубировали с 5 мкг высокомолекулярной ДНК тимуса теленка в течение 12 час при 37°C в буфере, содержащем 10мМ Tris-HCl pH 7.4, 50 мМ KCl, 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ CaCl<sub>2</sub>. В присутствии 3 мМ ЭДТА нуклеазная активность митохондриального матрикса не проявлялась. Визуализация проводилась при помощи электрофоретического разделения в агарозном геле.

Активность цитратсинтазы определяли методом Среге [Srere, 1969].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Количество копий мтДНК в клетках головного мозга и селезенки контрольных мышей

На рис.1 приведены результаты исследования количества копий мтДНК в тканях контрольных мышей. Видно, что в клетках селезенки показатели разницы критических циклов  $\Delta Ct$  лежат в пределах 8,5 - 10,15, что составляет превышение мтДНК над яДНК в  $10^{3,2} - 10^{3,4}$  копий, т.е., на 1 копию гена яДНК приходится, в среднем  $10^{3,3}$ , что соответствует 1995 копиям мтДНК. В клетках головного мозга, как можно видеть на этом же рисунке, количество мтДНК заметно ниже. Значения  $\Delta Ct$ , лежащие в диапазоне 2,5 - 4,5, соответствуют превышению генов мтДНК над генами яДНК на  $10^{1,35} - 10^{2,2}$  молекул, соответственно, в среднем  $10^{1,77}$ , иными словами, на 1 однокопейный ген яДНК приходится приблизительно 60 копий мтДНК. Учитывая тот факт, что все структурные гены мтДНК являются однокопийными, можно заключить следующее: в одной клетке селезенки содержится, в среднем, 2000 копий мтДНК, в одной клетке головного мозга – 60 копий. Однако, учитывая гетерогенную популяцию клеток головного мозга, данное усреднение носит приближенный характер.

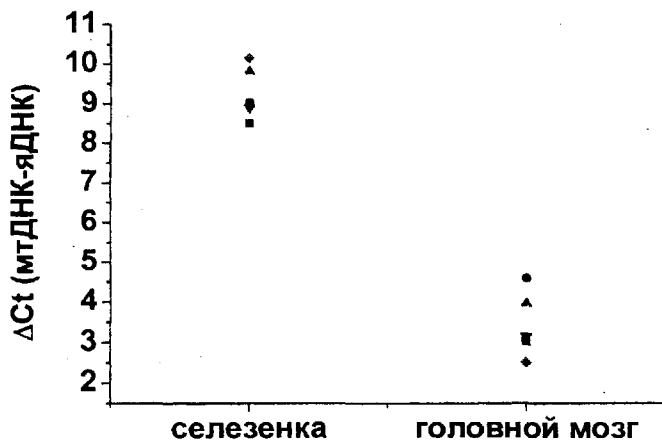


Рис.1 Уровень мтДНК в клетках головного мозга и селезенки контрольных мышей. Амплификация фрагмента гена *nd6*, нормализация по *gapdh*.

Репликация мтДНК в клетках головного мозга и селезенки при гамма – облучении мышей.

Известна чрезвычайно высокая степень повреждения мтДНК при действии ионизирующих излучений. В данной работе исследовались процессы репликации мтДНК в клетках головного мозга и селезенки мышей в условиях повреждения матрицы.

На рис.2 приведены результаты исследования процессов репликации мтДНК клеток головного мозга и селезенки при гамма- облучении мышей в дозе 5 Гр.

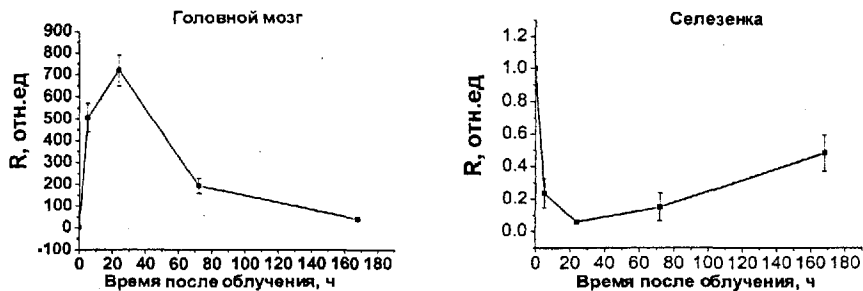


Рис. 2 Уровень репликации мтДНК в клетках головного мозга и селезенки мышей при облучении *in vivo* в дозе 5 Гр. R=1 - уровень репликации контрольных мышей.

Количество копий мтДНК в клетках головного мозга мышей после действия ИР в дозе 5 Гр резко возрастает: через 5 часов после облучения мы регистрируем уровень мтДНК в 500 раз, через 24 часа - более чем в 700 раз превышающий контрольный, к 72 часам уровень мтДНК снижается, но все еще в 200 раз выше контрольного, а через 168 часов приближается к норме (Рис.2).

После облучения большое количество копий мтДНК переходит в состояние так называемых миницирклей, т.е. после делеции фрагментов оставшаяся часть молекулы замыкается в кольцо. Можно предположить, что увеличение репликации мтДНК после облучения представляет собой компенсаторную реакцию на повреждение части копий митохондриального генома. Процесс репликации происходит эффективно еще и потому, что минициркули реплицируются намного быстрее, чем крупные молекулы мтДНК [Diaz et al. 2002]. Наблюдаемый нами эффект увеличения репликации мтДНК клеток головного мозга после воздействия генотоксических агентов коррелирует с представлениями о том, что в условиях повышенного содержания АФК индуцируется биогенез митохондрий [Gutsaeva et al. 2006].

В клетках селезенки наблюдается обратный процесс: через 5 часов после облучения уровень мтДНК снижен в 5 раз по сравнению с контролем, к 24 часам сниженные количества копий мтДНК достигает порядковой величины, к 72 часам наблюдается небольшое восстановление числа копий, которое продолжается до 168 часов и к этому времени составляет 50% от контрольного уровня. В данном случае необходимо отметить, что при облучении млекопитающих в летальных дозах спленоциты очень быстро вступают в апоптоз: значительная часть клеток погибает уже через 3 часа, а максимальная гибель (80%) наблюдается через сутки после облучения. Таким образом, падение числа копий мтДНК в спленоцитах в течение первых суток после облучения связано с развитием программируемой клеточной гибели. В сохранившейся части клеточной популяции селезенки на 2-е – 3-е сутки после облучения начинается процесс восстановления количества копий мтДНК.

#### Транскрипция мтДНК в клетках головного мозга и селезенки при гамма – облучении мышей

Мы исследовали транскрипцию трех митохондриальных генов: *nd4*, *coll* и *nd6* в клетках головного мозга и селезенки облученных в дозе 10 Гр мышей. Следует отметить, что первые два гена, входят в состав тяжелой цепи (h-strand) мтДНК, а *nd6* - структурный ген, кодирующийся легкой цепью.

Транскрипция мтДНК оценивалась по числу молекул митохондриальной мРНК через 5, 24, 48 и 72 часов после облучения мышей. Для нормализации количества внесенной матрицы использовались два housekeeping гена, кодирующихся ядерной ДНК: *gapdh* и *beta – actin*.

На Рис. 2 представлены результаты исследования экспрессии митохондриального гена *nd6*.

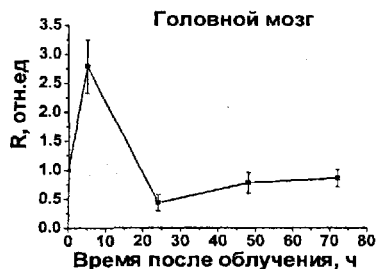


Рис. 3 Относительная экспрессия гена *ndb* в клетках головного мозга и селезенки облученных в дозе 10 Гр мышей. Для нормализации использовали амплификацию фрагмента гена *gaphd*. R=1 - уровень транскрипции *ndb* контрольных мышей.



Рис. 4 Относительная экспрессия гена *coII* в клетках головного мозга и селезенки облученных в дозе 10 Гр мышей. Для нормализации использовали амплификацию фрагмента гена *beta-actin*. R=1 - уровень транскрипции *coII* контрольных мышей.

Можно видеть, что как в селезенке, так и в клетках головного мозга облученных мышей количество транскриптов гена *ndb* мтДНК изменяется уже в первые часы после облучения. В селезенке в первые 5 часов после облучения количество транскриптов возрастает не более чем в два раза, однако, что удивительно, уже к 24 часам мРНК гена *ndb* превышает контрольный уровень более чем в 1000 раз. Через 48 часов количество транскриптов данного гена резко падает до контрольного уровня и в более поздние времена практически не меняется.

Сходная картина наблюдается в клетках головного мозга облученных мышей. Через 5 часов, так же как и в спленоцитах, после облучения уровень мРНК *ndb* возрастает в 2-3 раза, однако, по сравнению с селезенкой, дальнейшего увеличения числа транскриптов не происходит. Через сутки после облучения количество транскриптов снижается в 2 раза, дальнейшие изменения транскрипции направлены на восстановление до контрольного уровня

мРНК *nd6* в головном мозге, который достигается к 48 часам и далее остается постоянным в течение суток.

Результаты изменения транскрипции митохондриального гена *coll* (Рис. 4) обнаруживают поразительное сходство с результатами, полученными для гена *nd6*. Так же, как и в случае *nd6*, в селезенке количество мРНК гена *coll*, незначительно изменяется к 5 часам после облучения, а уже к 24 часам превышает контрольный уровень более чем в 1350 раз. В дальнейшем происходит резкое падение и через 72 часа уровень мРНК возвращается к контрольному.

Изменение транскрипции *coll* в клетках головного мозга также повторяет динамику изменения количества транскриптов *nd6*. Так, через 5 часов, уровень мРНК *coll* в этой ткани в 2.5 раза превышает контрольный, спустя сутки снижается до уровня в 2 раза меньше контрольного и этот уровень практически сохраняется в течение следующих двух суток.

Основная регуляция уровня транскрипции/репликации в митохондриях осуществляется несколькими транскрипционными факторами. В настоящее время в литературе обсуждается роль mtTFA в регуляции биогенеза мтДНК. Существует представление, что гиперэкспрессия mtTFA приводит к индукции репликации мтДНК [Ekstrand et al. 2004], с другой стороны аналогичные исследования показали, что роль mtTFA не существенна при репликации мтДНК [Maniura-Weber et al. 2004]. Но ни у кого не вызывает сомнения тот факт, что гиперэкспрессия mtTFA приводит к увеличению транскрипции мтДНК. Гиперэкспрессия mtTFA подконтрольна факторам NRF-1 и NRF-2 [Gleyzer et al. 2005], которые, в свою очередь, активируются повышенным уровнем свободных радикалов. Таким образом, увеличение общего количества транскриптов мтДНК может объясняться процессом активации экспрессии транскрипционных факторов.

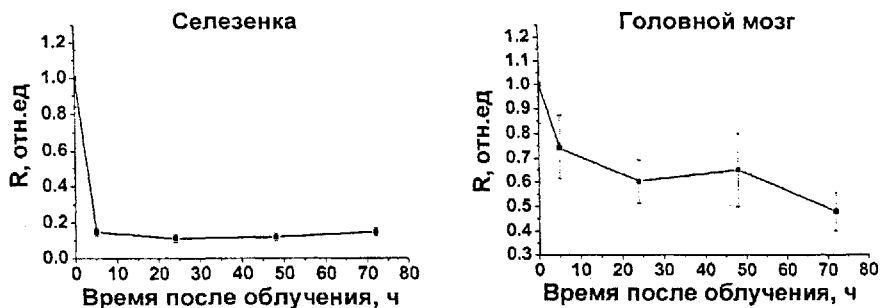


Рис. 5 Относительная экспрессия гена *nd4* в головном мозге и селезенки облученных в дозе 10 Гр мышей. R=1 уровень транскрипции *nd4* контрольных мышей.

При исследовании уровня транскрипции гена *nd4* (Рис. 5) были получены следующие результаты: уровень мРНК гена *nd4* в селезенке облученных мышей через 5 часов после облучения снижается более чем в 5 раз, в дальнейшем каких-либо значимых отклонений в количестве мРНК данного гена не происходит. В головном мозге изменения количества транскриптов носят также отрицательный характер, однако кинетика снижения количества копий мРНК *nd4* в данной ткани несколько иная: в течение трех суток происходит постепенное снижение и через 72 часа после облучения уровень транскриптов мРНК гена *nd4* в клетках головного мозга мышей в 2 раза ниже контрольного уровня.

На основании анализа результатов, полученных при исследовании экспрессии трех митохондриальных генов, можно предположить, что в условиях окислительного стресса возникает крупная делеция мтДНК, включающая область гена *nd4* (Рис. 6)

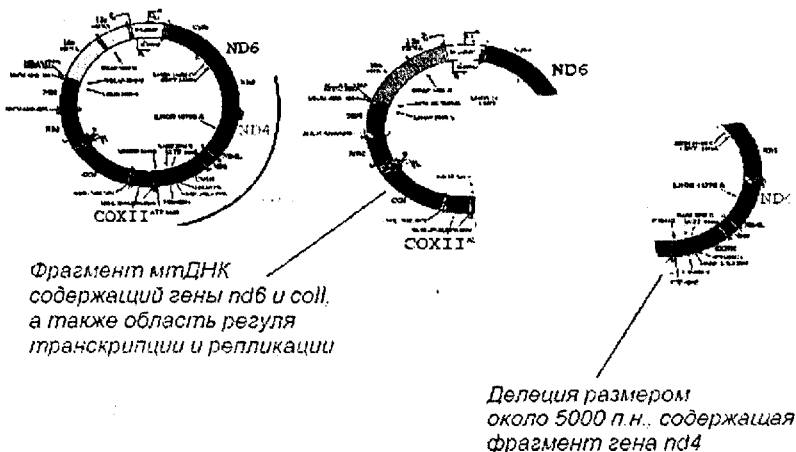


Рис.6 Делеция мтДНК [4977 ± 3 п.н.].

Известно, что в случае удаления D-петли из целостной структуры мтДНК как репликация, так и транскрипция невозможны [Fernandez-Silva et al. 2003]. Таким образом, ген *nd4* не участвует в процессах репликации и транскрипции мтДНК, именно этим и объясняется снижение экспрессии данного гена на фоне увеличенной транскрипции других митохондриальных генов при облучении мышей. Более того, анализ транскрипции трех исследуемых генов позволяет считать, что и у контрольных мышей происходит потеря гена *nd4* (в меньшей степени), по-видимому, из-за близости к электрон-транспортной цепи (Рис.7).

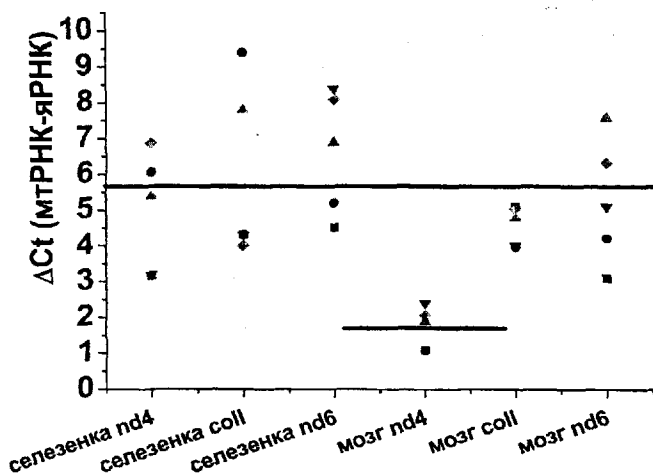


Рис. 7 Уровень экспрессии трех митохондриальных генов (*nd4*, *colI*, *nd6*) в клетках селезенки и головного мозга контрольных мышей, нормализация по генам *gapdh* и *beta-actin*.

#### Транскрипция митохондриальной ДНК при действии блеомицина.

Результаты исследования транскрипции трех митохондриальных генов: *nd4*, *colI* и *nd6* в клетках головного мозга и селезенки мышей после инъекции блеомицина [1,5 мг/мышь] совпадают с результатами, полученными при действии облучения (Рис. 8). Известно, что принцип действия блеомицина основан на способности вызывать многочисленные одно- и двуниевые разрывы в структуре ДНК, подобно действию свободных радикалов, образующихся при облучении.

Нам представлялось интересным выяснить, что происходит с нефункциональными фрагментами мтДНК, образующимися при действии генотоксических агентов. Возможны 2 процесса, позволяющие утилизировать большие фрагмент мтДНК:

- 1 – фрагменты могут быть выведены за пределы органеллы и,
- 2 – фрагменты могут быть расщеплены эндонуклазой G, локализованной в митохондриях. Не исключено, что оба этих процесса дополняют друг друга и являются частями целого механизма.

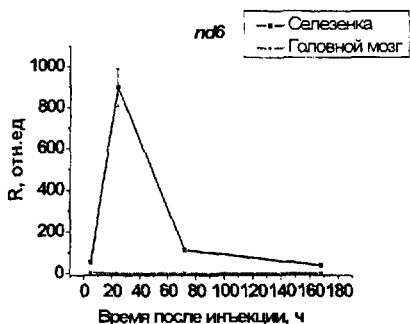
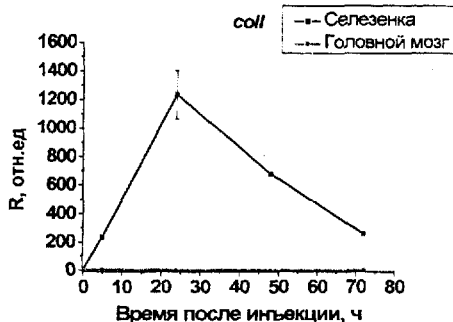
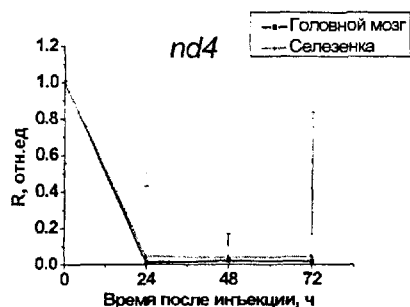


Рис. 8 Изменение транскрипции генов *nd4*, *coll* *nd6*, мтДНК после введения блеомицина (1,4 мг/мышь). R=1 уровень транскрипции контрольных мышей.

### Выход ДНК из митохондрий in vitro

Нами был поставлен модельный эксперимент, в котором митохондрии помещали в кювету микрофлуориметра и измеряли функциональную активность митохондрий по изменениям  $\Delta\Psi$ -m. Открытие РТР индуцировали добавлением ионов кальция в концентрации 50 мкМ. После индукции РТР, наблюдаемой по спаду  $\Delta\Psi$ -m, добавляли ингибитор РТР – циклоспорин А, который способствовал закрытию РТР и восстановлению  $\Delta\Psi$ -m до исходного уровня. В контрольном эксперименте до внесения кальция был добавлен циклоспорин А, что предотвращало индукцию РТР. После этого суспензия отбиралась, помещалась в центрифужную пробирку, митохондрии осаждали при 12000 об/мин [Eppendorf 5415] и из супернатанта выделяли ДНК.

На рис.9 приведена схема эксперимента по открытию РТР и анализ фрагментов мтДНК, обнаруженных в среде после осаждения митохондрий до и после открытия РТР. Как видно из рисунка, при индукции РТР в среде инкубации митохондрий обнаруживаются

фрагменты ДНК, размером 10090 п.н., так же как и при ингибировании РТР циклоспорином А. Однако отчетливо видно, что при осуществлении предельных порядковых разведении ДНК, вносимой в реакцию, титр крупного фрагмента мтДНК, как минимум, на 1 порядок выше при индуцированной РТР, чем при ингибированной. Это свидетельствует о том, что при индукции РТР крупные фрагменты мтДНК выходят из митохондрий. Для того, чтобы снять все сомнения относительно разрушения митохондрий во время проведения эксперимента, параллельно измерению относительного количества фрагментов мтДНК в инкубационной среде, нами был измерен уровень внутриматричного фермента митохондрий – цитратсинтазы, уровень которой в модельной системе свидетельствовал о целостности митохондрий (Рис.10).

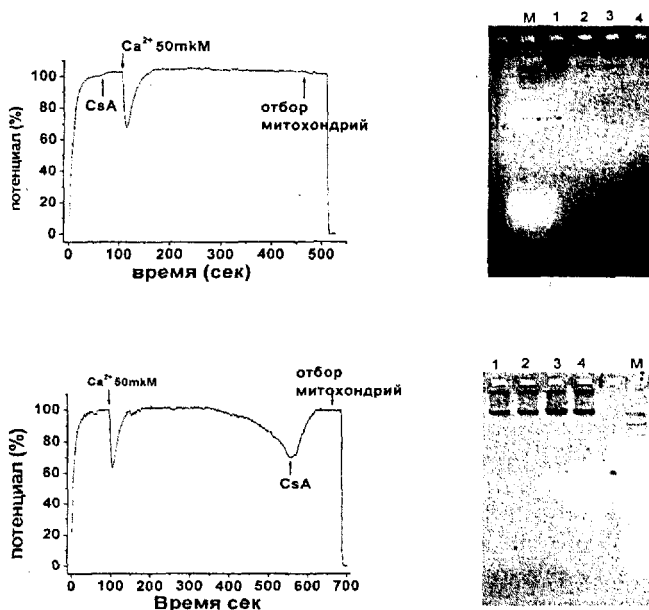
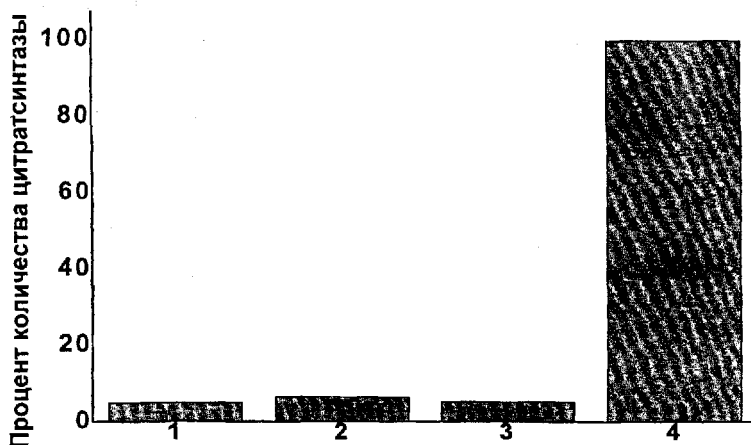


Рис.9 Модельный эксперимент на изолированных митохондриях. Сверху слева – график измерения потенциала в присутствии циклоспорино А и 50 мкМ кальция. Снизу слева - график измерения потенциала в присутствии Циклоспорино А, который добавляли после индукции РТР. Сверху справа – электрофорез амплифицированных фрагментов мтДНК при закрытой РТР. Снизу справа – электрофорез амплифицированных фрагментов мтДНК при индукции РТР. М-маркер для фрагментов ДНК; 1, 2, 3, 4 – соответственно, порядковые разведения количества ДНК в супернатанте после осаждения митохондрий.



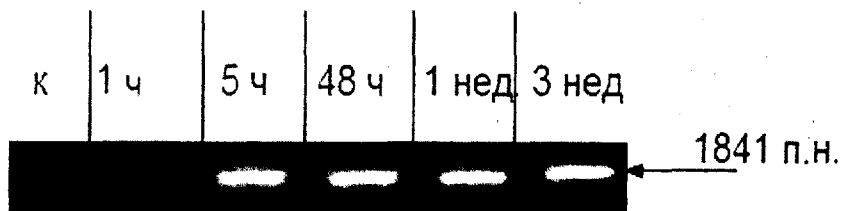
**Рис.10** Определения количества внутриматриксного фермента – цитратсинтазы. 1 – среда выделения после последней отмывки митохондрий. 2 – среда инкубации после осаждения митохондрий [добавление циклоспорина-А перед  $\text{Ca}^{2+}$ ]. 3 – среда инкубации после осаждения митохондрий [добавление циклоспорина-А после  $\text{Ca}^{2+}$ ]. 4 – разрушенные митохондрии в среде инкубации.

На рис.10 видно, что при индукции РТР в данных модельных экспериментах не происходит разрушения митохондрий, из этого следует, что увеличивающийся титр фрагментов мтДНК в среде инкубации митохондрий является прямым следствием индукции РТР. Следовательно, можно заключить, что индукции РТР является своеобразным триггером, обеспечивающим выход фрагментов мтДНК из митохондрий.

#### **Выход фрагментов мтДНК из митохондрий при облучении мышей *in vivo*.**

Митохондриальная РТР индуцируется многими продуктами окислительно-восстановительных реакций и продуктами реакций, в которых образуются радикалы, как например, при облучении. [Constantini P, et al., 1995, Kowaltowski et al., 1995, Petrolini et al., 1994] Кроме того, облучение вызывает одно- и двунивные разрывы ДНК и, таким образом, является наилучшей моделью для исследования процессов выхода мтДНК из митохондрий.

На рис. 11 представлено электрофоретическое разделение митохондриального фрагмента размером 1841 п.н. (область D-петли), обнаруженного в цитозоле клеток головного мозга.



**Рис.11 Амплификация фрагмента митохондриальной ДНК размером 1841 п.н. из цитозольной фракции клеток головного мозга контрольных и облученных в дозе 5 Гр мышей.**

Результаты амплификации фрагмента митохондриальной ДНК размером 1841 п.н. показывают, что при заданных параметрах амплификации в цитозоле клеток головного мозга контрольных животных визуализация амплифицированных фрагментов ДНК отсутствует. Однако, уже через 1 час после облучения в дозе 5 Гр в цитозоле клеток мозга наблюдаются фрагменты митохондриальной ДНК. Максимум количества фрагментов митохондриальной ДНК в цитозольной фракции клеток мозга достигается к 5 часам после облучения в дозе 5 Гр и сохраняется в течение 3 недель.

В описанных выше экспериментах уровень митохондриальной ДНК в цитозольной фракции клеток головного мозга после облучения мышей оценивался по амплификации одного митохондриального фрагмента размером 1841 п.н. В дальнейших экспериментах мы провели амплификацию различных по топологии и размеру участков митохондриальной ДНК от 316 п.н. до 10090 п.н. (рис. 12). Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что фрагменты митохондриальной ДНК, обнаруженные в цитозольной фракции клеток головного мозга облученных мышей, представляют собой практически всю структуру мтДНК.

Поразительно то, что в цитозоле клеток головного мозга облученных в дозе 5 Гр мышей присутствуют такие большие фрагменты как 10090 п.н.

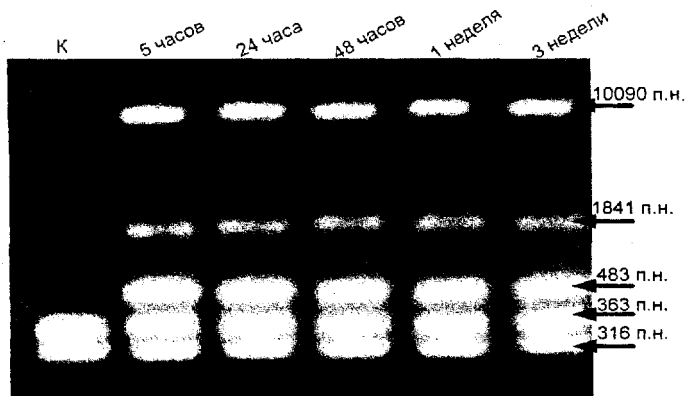


Рис.12 Сводная схема электрофоретического разделения различных по топологии и размеру фрагментов митохондриальной ДНК в цитозоле мозга мышей, облученных в дозе 5 Гр.

При облучении мышей в дозах 3 Гр и 8 Гр в цитозоле клеток головного мозга также были обнаружены фрагменты мтДНК (рис. 13). Динамика появления мтДНК в цитозоле совпадала после облучения мышей в дозе 5 Гр и 8 Гр. При действии облучения в этих двух дозах амплификация фрагмента 10090 п.н. наблюдается через 5 часов. Амплификация того же фрагмента при облучении мышей в дозе 3 Гр происходит через 24 часа после облучения. При облучении во всех дозах фрагменты мтДНК находятся в цитозоле в крайней мере в течение 3-х недель наблюдения.

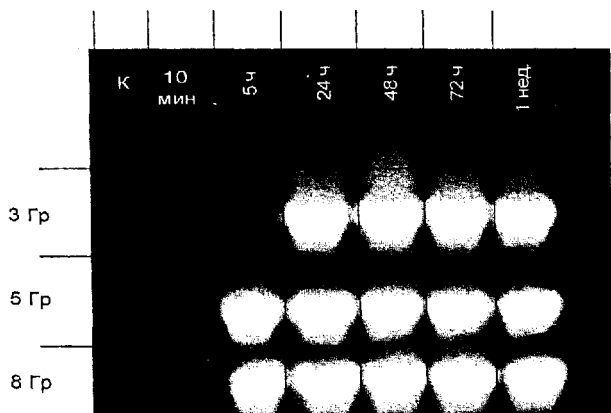


Рис. 13 Схема электрофоретического разделения фрагмента митохондриальной ДНК размером 10090 п.н., выделенной из цитозольной фракции клеток головного мозга контрольных и облученных мышей.

Эксперименты на модельной системе, связанные с открытием РТР и выходом мтДНК из органеллы, позволяют провести некую аналогию с процессом появления мтДНК в цитозоле клеток головного мозга мышей после радиационного воздействия.

Предполагается, что в условиях *in vivo* быстрые кальциевые токи могут возникать только при кратковременной индукции РТР и пора в этом случае проявляет себя как индуцибельный кальциевый канал [Akerman K.E., 1977, Bernardi P., 1992, 1998, 1996]. Нами был поставлен эксперимент, в котором митохондрии тестировались на способность аккумулировать ионы кальция и сохранять при этом мембранный потенциал (рис.14). В течение первых семи суток после облучения в летальных дозах, когда происходит выход фрагментов мтДНК в цитозоль клеток головного мозга, мембранный потенциал не меняется. Тем не менее, физиологические параметры митохондрий облученных животных отличаются от контрольных, но в более поздние сроки (3 недели после облучения мышей в летальных дозах). Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что митохондрии, выделенные из клеток головного мозга через три недели после облучения мышей в дозе 5 Гр, сохраняют мембранный потенциал. Однако, митохондрии мозга облученных мышей по сравнению с контрольными более чувствительны к кальциевым нагрузкам. Добавка кальция в концентрации 50 мкМ приводит к практически полному сбросу  $\Delta\psi_m$ . После добавки циклоспорина А  $\Delta\psi_m$  восстанавливался до уровня, составляющего приблизительно 80% от начального. Контрольные же митохондрии были менее чувствительны к кальциевым нагрузкам, и после добавки циклоспорина А практически полностью восстанавливали  $\Delta\psi_m$ .

Таким образом, физиологическое состояние изолированных митохондрий клеток головного мозга облученных мышей отличается от контрольных. Результаты показали, что для индукции РТР в митохондриях клеток головного мозга облученных мышей необходимы гораздо более слабые воздействия, чем в митохондриях контрольной группы. Это свидетельствует о том, что при облучении выход митохондриальной ДНК из органеллы происходит с большей вероятностью

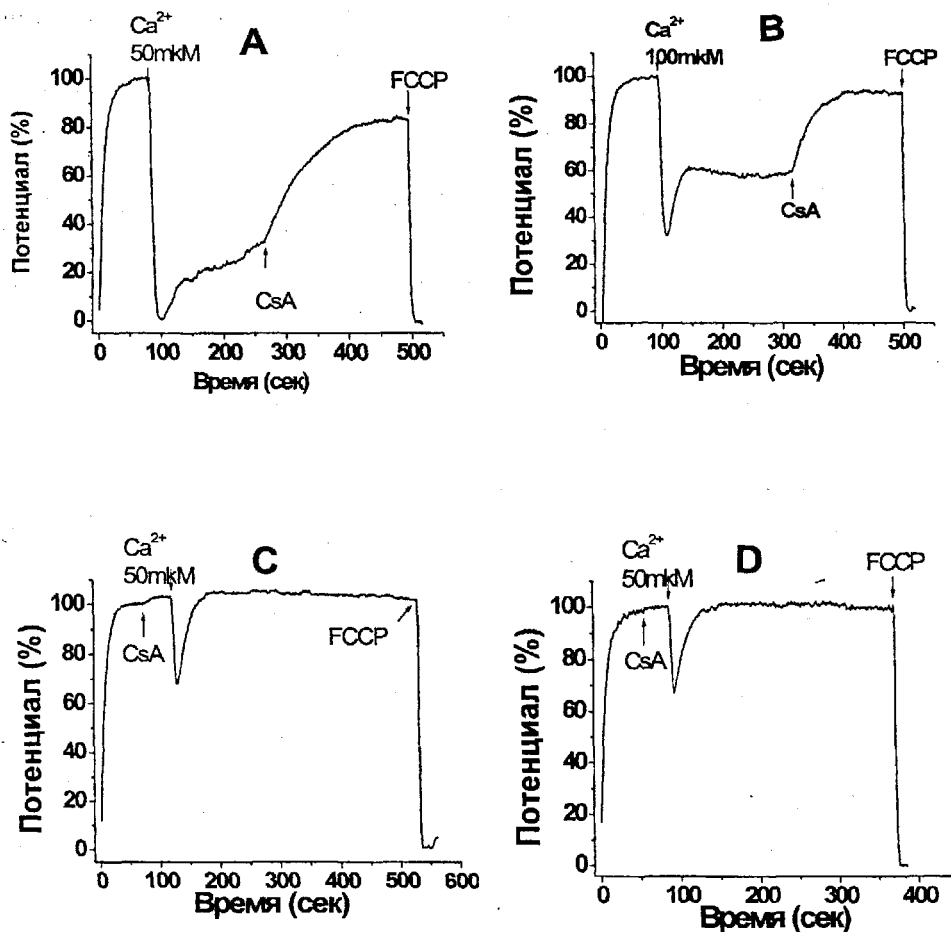


Рис.14 Измерение потенциала в контрольных и облученных мышах через 3 недели после облучения в дозе 5 Гр. Измерение потенциала проводилось при помощи зонда Rhodamine 123. Открытие РТР индуцировали добавкой кальция. РТР ингибировалась циклоспорином А. А, С – митохондрии клеток головного мозга мышей через 3 недели после облучения. В, D – митохондрии клеток головного мозга контрольных мышей.

### Нуклеазная активность митохондриального матрикса.

Нами была исследована нуклеазная активность лизатов митохондриального матрикса клеток головного мозга и селезенки контрольных и облученных в дозе 10 Гр мышей. Как следует из рис.15, ДНК при инкубации с лизатом контрольных мышей практически не подвергается деградации (дорожки 1 и 2). Лизат, полученный из митохондрий селезенки облученных мышей (дорожка 4), обладает значительно большей нуклеазной активностью по сравнению с лизатом митохондриального матрикса клеток головного мозга (дорожка 3).

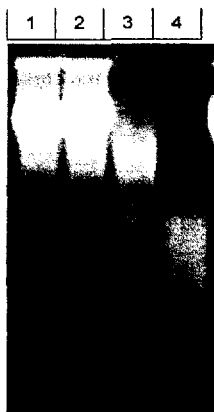
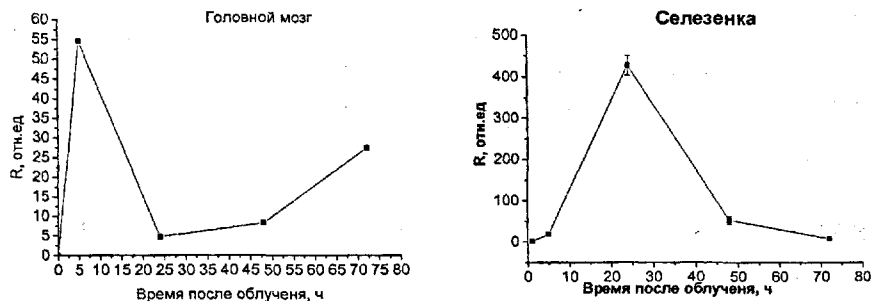


Рис.15 Электрофореграммы ДНК тимуса телянка после ее инкубации с фракциями цитозоля из клеток головного мозга и селезенки контрольных и облученных мышей. Фракции цитозоля получали из тканей животных через 24 часа после облучения в дозе 5 Гр. [1,3] – фракции матрикса митохондрий из клеток головного мозга. [1]- контроль, [3]- облучение. [2,4] – фракции матрикса митохондрий из клеток селезенки. [2]- контроль, [4]- облучение.

Таким образом, очевидно, что ИР индуцирует нуклеазную активность митохондриального матрикса, что является дополнительным фактором появления двунитевых разрывов в мтДНК, накопления в матриксе deletированных фрагментов и возрастающего, вследствие действия ИР, уровня гетероплазмы. Если учитывать тот факт, что Эндо-Г, как наиболее вероятный вследствие своей субстратной специфичности фермент, принимает активное участие во фрагментации мтДНК, то резонно возникает вопрос, - почему в нормальных физиологических условиях Эндо-Г не фрагментирует мтДНК? Самым очевидным ответом может служить факт локализации данного фермента в межмембранном пространстве митохондрий, где он не имеет прямого доступа к субстрату. Кроме того, то, что в большей степени, Эндо-Г проявляет нуклеазную активность по отношению к ДНК, содержащим модифицированные основания, индуцированные ИР, может свидетельствовать о том, что повреждения структуры ДНК и активация Эндо-Г являются взаимосвязанными процессами.

Другим объяснением увеличивающейся, вследствие действия ИР, нуклеазной активности митохондриального матрикса может являться увеличение синтеза *de novo*

Эндо-Г, тем более, известно, что ИР индуцирует транскрипцию большого числа белков. В связи с этим мы определяли уровень экспрессии ядерного гена *endog* (Рис.16).



**Рис. 16** Уровень экспрессии гена *endog* в клетках головного мозга и селезенки облученных в дозе 10 Гр мышей относительно уровня экспрессии в тканях необлученных мышей. R=1 уровень транскрипции *endog* контрольных мышей.

Из рис.16 видно, что при облучении мышей происходит увеличение транскрипции гена *endog*. В клетках головного мозга уже через 5 часов после облучения в дозе 10 Гр резко возрастает количество транскриптов данного гена. Спустя сутки уровень транскриптов возвращается к норме, а затем вновь повышается. Иную картину мы можем наблюдать в селезенке. Можно видеть, что в первые часы после облучения уровень транскриптов изменяется крайне незначительно, однако, уже к 24 часам уровень транскриптов гена *endog* заметно возрастает, а затем возвращается к норме. В настоящее время в литературе широко обсуждается роль Эндо-Г в апоптозе, а именно, ее участие в нуклеосомной деградации яДНК по каспаз-независимому механизму [van Loo et al., 2001, 2002; Davies et al., 2003]. Вместе с тем, сведения о вовлеченности этого фермента в деградацию мтДНК отсутствуют. Исходя из результатов, полученных при исследовании мтДНК клеток головного мозга, мы полагаем, что Эндо-Г является ферментом, участвующим во фрагментации мтДНК и образовании делеций, как в условиях физиологической нормы, так и в условиях окислительного стресса. По-видимому, это связано с необходимостью удаления поврежденных участков мтДНК, возникающих в результате высокого уровня радикалов в митохондриях.

#### **Экспрессия *endog* при действии блеомицина**

Сходную картину увеличения транскрипции *endog* мы наблюдали и после введения мышам блеомицина (Рис.17). Инъекция блеомицина в предельной дозе приводит к 9-порядковому увеличению количества транскриптов *endog* в клетках селезенки (приблизительно в миллиард раз). В клетках головного мозга количество транскриптов этого гена увеличивается почти в 3 млн. раз.

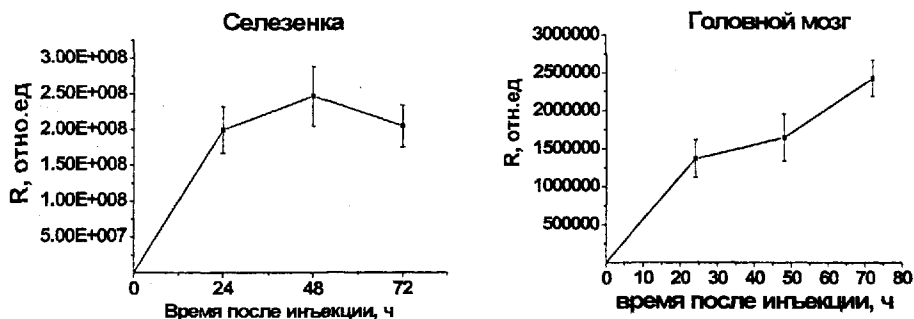


Рис. 17 Транскрипция гена *endog* в головном мозге и селезенке мышей при введении блеомicina (1,5 мг/мышь). R=1 уровень транскрипции *endog* контрольных мышей.

Известно, что блеомин, также как и облучение, индуцирует окислительный стресс. При действии блеомина и при действии ИР мы наблюдаем схожие процессы изменения репликации мтДНК, транскрипции митохондриальных генов и ядерного гена *endog*. Таким образом, ответ клеток на действие окислительного стресса является универсальным вне зависимости от природы генотоксического агента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Митохондриальная ДНК млекопитающих – кольцевая двуцепочечная молекула, кодирующая 13 полипептидов дыхательной цепи. Поскольку мтДНК не содержит некодируемые последовательности, она транскрибируется как единый полицистронный блок и любые нарушения в ней являются патогенетическими. В настоящем исследовании установлено, что в условиях окислительного стресса, вызванного либо облучением, либо действием блеомина, в мтДНК разных по радиочувствительности тканях (головной мозг и селезенка) возникает крупная делеция (около 5000 п.н.), т.е. практически треть всего митохондриального генома не участвует в процессах репликации и транскрипции. Несомненно, что подобная дисфункция мтДНК, например: многократная утрата гена *nd4*, отразится на процессах окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ.

Само накопление фрагментов мтДНК в митохондриях является деструктивным процессом и выход фрагментов мтДНК из органеллы сокращает пул поврежденных молекул мтДНК. Вполне возможно, что при функционировании митохондрий в условиях нормы единичные поврежденные молекулы мтДНК также удаляются при участии РТР. В условиях же окислительного стресса, когда количество делеций многократно возрастает, наблюдается постоянный процесс выхода фрагментов мтДНК. Дозозависимое накопление фрагментов в

цитозоле клеток головного мозга при облучении мышей и сохранении их в течение нескольких недель увеличивает риск проникновения фрагментов мтДНК в ядро.

Процесс выхода фрагментов мтДНК из митохондрий коррелирует со временем увеличения числа копий мтДНК, однако, в большей степени происходит ущербное восстановление, поскольку огромная часть копий мтДНК представляет собой урезанный геном – минициркули.

В процессе фрагментации мтДНК под действием генотоксических агентов, по-видимому, участвует неспецифическая эндонуклеаза –G, так как и при облучении и при действии блеомицина происходит увеличение активности данного фермента и резко возрастает транскрипция гена *endog*.

Таким образом, в условиях окислительного стресса, инициированного действием генотоксических агентов, изменяются процессы репликации и транскрипции митохондриальных генов, нарушается целостность мтДНК, образуются фрагменты разной величины, крупные делеции фрагментов мтДНК выходят в цитозоль клеток, что представляет собой потенциальную угрозу стабильности ядерного генома.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что увеличение числа копий мтДНК в клетках головного мозга мышей при действии генотоксических агентов является компенсаторной реакцией митохондрий на уменьшение количества генов.
2. Обнаружено, что при действии генотоксических агентов механизмы регуляции транскрипции мтДНК являются универсальными для разных по радиочувствительности тканей (селезенка и головной мозг).
3. Действие генотоксических агентов инициирует процессы фрагментации мтДНК.
4. Впервые показано, что генотоксические агенты индуцируют транскрипцию эндонуклеазы G и увеличение нуклеазной активности митохондриального матрикса.
5. Впервые продемонстрировано, что фрагменты митохондриальной ДНК выходят из митохондрий при участии РТР.
6. Впервые зарегистрирован выход мтДНК из митохондрий клеток головного мозга облученных мышей.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Patrushev M., Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev A. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. // Cell Mol Life Sci., 2004, V.61, P. 3100-3103
2. Patrushev M., Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev A.I. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. // Mitochondrion. 2006 V.6 P. 43-47
3. Патрушев М.В., Патрушева В.Е., Касымов В.А., Евдокимовский Э.В., Ушакова Т.Е., Газиев А.И. Элиминация мтДНК из митохондрий и активация ее репликации в клетках тканей облученных мышей. // Цитология, 2006, том 48, вып. 8, стр. 684-695

### Тезисы докладов

1. Патрушев М.В., Зобова В.Е., Касымов В.А., Ушакова Т.Е., Газиев А.И. Выход ДНК из митохондрий мозга гамма-облученных мышей. // Сборник тезисов VIII международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пушкино, (17-21 мая 2004), изд. ПНЦ РАН, Пушкино, стр.90
2. Касымов В.А., Патрушев М.В., Зобова В.Е., Ушакова Т.Е., Исследование механизмов выхода митохондриальной ДНК в цитозоль. // Сборник тезисов VIII международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пушкино, (17-21 мая 2004), изд. ПНЦ РАН, Пушкино, стр.90
3. E.V. Evdokimovsky, M.V. Patrushev, T.E. Ushakova, A.I. Gaziev. Change in mtDNA replication and transcription in the blood cells of mice after treatment with X-rays and bleomycin. // The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Kiev (22-25.08.2006)
4. Евдокимовский Э.В., Патрушев М.В., Ушакова Т.Е., Газиев А.И. Нестабильность мтДНК в крови мышей при действии рентгеновского облучения и цитостатических антибиотиков // Сборник тезисов X международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» Пушкино, (17-21 апреля 2006), изд. ПНЦ РАН, Пушкино, стр.
5. Патрушев М.В., Ушакова Т.Е., Губина Н.Е., Меркина О.С., Газиев А.И. Выход фрагментов мтДНК из митохондрий клеток мозга после облучения мышей. // Материалы V съезда по радиационным исследованиям «радиобиология, радиоз экология, радиационная безопасность» Москва, (10-14 апреля 2006), изд. «11-й ФОРМАТ», Москва, стр.61-64
6. Евдокимовский Э.В., Патрушев М.В., Ушакова Т.Е., Газиев А.И. Исследование повреждающего действия рентгеновского облучения и антибиотика блеомицина на

фрагментацию и репликацию митохондриальной ДНК в крови мыши // Материалы V съезда по радиационным исследованиям «радиобиология, радиозэкология, радиационная безопасность» Москва, (10-14 апреля 2006), изд. «11-й ФОРМАТ», Москва.

7. Patrushev M.V., Evdokimovsky E.V., Gubina N.E., Merskina O.S., Ushakova T.E., Gogvadze V.G., Gaziev A.I.. Alterations of mtDNA functionality in brain and spleen after irradiation. // The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Kiev (22-25.08.2006)

Принято к исполнению 18/09/2006  
Исполнено 18/09/2006

Заказ № 634  
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900  
Москва, Варшавское ш., 36  
(495) 975-78-56

[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

