

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ И АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИ ПОРАЖЕННЫХ СОСУДАХ

А.А. Зарубин, А.В. Марков

Научный руководитель: к.б.н. М.В. Голубенко

Научно-исследовательский институт медицинской генетики Федерального государственного
бюджетного научного учреждения "Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук",

Россия, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10, 634050

E-mail: a.a.zarubin@gmail.com

COMPARATIVE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA HETEROPLASMY IN LEUCOCYTES AND ATHEROSCLEROTIC LESIONS

A.A. Zarubin, A.V. Markov

Scientific Supervisor: M.V. Golubenko

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy
of Sciences, Russia, Tomsk, Nab. Ushaiki, 10, 634050

E-mail: a.a.zarubin@gmail.com

Abstract. Mitochondrial DNA (mtDNA) is exposed to reactive oxygen species in mitochondria, and oxidative stress is important factor in atherosclerosis development. Oxidative damage leads to somatic mtDNA mutations which can persist in cell in heteroplasmic state. The aim of the study was to analyze mtDNA heteroplasmy in carotid atherosclerotic lesions and leucocytes of patients with atherosclerosis ($n = 22$) and healthy individuals ($n = 14$). Heteroplasmy was estimated using massive parallel sequencing technology (MiSeq, Illumina). The results of the study show that mtDNA heteroplasmy is abundant phenomenon in both patients and controls (altogether 143 heteroplasmic positions at level $>1.5\%$). However, mean level of mutant molecules was low ($<10\%$). The highest frequency of somatic mutations was registered in noncoding regions, and the lowest frequency was in protein-coding genes. In some positions, recurrent mutations have been found. Among them, heteroplasmy in 16390 position was found only in atherosclerotic plaques, so it can be tissue-specific. In addition, we found heteroplasmy in position 166 in most samples, with mean level in patients higher than in controls.

Введение. Атеросклероз сосудов участвует в развитии большинства сердечно сосудистых заболеваний, которые вносят наибольший вклад в мировую смертность [1]. В патогенезе атеросклероза участвует множество факторов, но исследователи придают всё большее значение свободным радикалам и перекисному окислению липидов [2]. В свою очередь митохондрии, будучи “энергетической станцией клетки” и участвуя в окислительных процессах, являются источником свободных радикалов. При этом геном митохондрий (мтДНК) восприимчив к повреждающему воздействию, что приводит к появлению соматических мутаций. Возникающие мутации, в свою очередь, могут нарушать функции митохондрии (окислительное фосфорилирование, окисление жирных кислот), что может усугублять повреждающее

воздействие. В большинстве случаев соматические мутации мтДНК существуют в клетке в состоянии гетероплазии.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе гетероплазии мтДНК у больных атеросклерозом сонных артерий и здоровых индивидов.

Материалы и методы. Для исследования были использованы парные образцы ДНК, полученные из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) и бляшек сонных артерий (САБ) у пациентов с атеросклерозом (n = 22), а также контрольные образцы (n = 14), полученные из лейкоцитов индивидов без признаков каротидного атеросклероза. Оценку гетероплазии проводили путем массового параллельного секвенирования на приборе MiSeq (Illumina): митохондриальный геном амплифицировали в двух перекрывающихся фрагментах, ДНК-библиотеки готовили с помощью набора Nextera XT (Illumina). Полученные fastq файлы обрабатывали при помощи веб сервиса mtDNA-Server [3], после этого выходные данные дополнительно обрабатывали в статистической среде R. Образцы с низким покрытием были исключены из анализа. Значимым уровнем гетероплазии считали уровень выше 1,5% и рассматривали только позиции, имеющие больше 1000 прочтений.

Результаты. Проведенный анализ выявил гетероплазию в 143 позициях, расположенных в регионах мтДНК с различной функцией (табл. 1).

Таблица 1

Гетероплазмичные позиции, выявленные в исследованных образцах

Образец	Количество гетероплазмичных позиций в различных регионах					Среднее покрытие (число прочтений)
	Общее	Некодирующие участки	рРНК	тРНК	Белки	
САБ (n = 19)	51	33 (64,7%)	3 (5,9%)	1 (2%)	14 (27,5%)	5448
ЛПК, пациенты (n = 16)	40	26 (65%)	4 (10%)	0	10 (25%)	5064
ЛПК, контроль (n = 12)	52	27 (51,9%)	11 (21,2%)	1 (2%)	13 (25%)	6030

Из выявленных гетероплазмичных позиций, 20 были зарегистрированы только в атеросклеротических бляшках, 16 – только в крови пациентов и 30 – только у здоровых лиц. Также было обнаружено 6 гетероплазий, которые встречались в парных образцах кровь-бляшка; значимых различий в уровне гетероплазии между кровью и бляшкой по этим позициям не было выявлено (сравнение с использованием парного критерия Вилкоксона, $p = 0,7422$).

Четыре гетероплазмичные мутации встретились одновременно в 2 контрольных образцах, но не были зарегистрированы у пациентов. Более чем в двух образцах была обнаружена гетероплазия 16390G>A, которая встречалась только в образцах атеросклеротических бляшек (n=4) со средним уровнем 2,26%, а также гетероплазия 166С>Т, представленная в 11 парных образцах крови и бляшки и в 9 контрольных образцах. Для гетероплазии 166С>Т было выявлено статистически значимое различие в уровне гетероплазии между контрольными образцами (1,93%) и кровью пациентов (2,52%) с помощью критерия Вилкоксона, ($p = 0,02$), разницы в уровне гетероплазии в крови (2,52%) и бляшке (2,41%) у пациентов не было выявлено ($p = 0,82$). Гетероплазия 16390G>A была обнаружена другими

исследователями, главным образом в тканях тонкого кишечника, на уровне 2,3%; при этом в крови гетероплазмия в этой позиции отсутствовала (ткани сосудистой стенки в данной работе не были изучены) [4].

Более половины гетероплазмичных позиций было зарегистрировано в некодирующих участках мтДНК, занимающих всего 7% митохондриального генома, около 25% гетероплазмий было выявлено в белок-кодирующих генах (69% мтДНК). В генах транспортных и рибосомальных РНК (24% мтДНК) было найдено около 10% от общего числа гетероплазмичных позиций у больных и около 23% у здоровых (различия не значимы). Средний уровень гетероплазмии (доля мутантных молекул в общем пуле мтДНК) составил 5,3% у здоровых, 6,1% в атеросклеротических бляшках и 6,3% в крови пациентов. Только 7 (13,7%) позиций в образцах атеросклеротических бляшек, 6 (15%) – в крови пациентов и 6 (11,5%) в крови здоровых лиц имели уровень гетероплазмии более 10%. Полученные нами оценки в целом соответствуют литературным данным: например, в работе М. Li с соавторами средний уровень гетероплазмии в крови составил 7,23%, и в 17,3% случаев уровень мутантной мтДНК превышал 10% [4].

Заключение. Таким образом, в результате проведенного исследования нами было установлено, что гетероплазмия мтДНК – распространенное явление как у пациентов с атеросклерозом, так и у здоровых. Однако средний уровень мутантных молекул невысок (менее 10%) и не достигает порогового значения, необходимого для фенотипического проявления мутаций. Наибольшая частота соматических мутаций характерна для некодирующих регионов мтДНК, а наименьшая – для генов, кодирующих белки. Гетероплазмия 16390 G>A была зарегистрирована только в атеросклеротических бляшках – таким образом, гетероплазмия в этой позиции может быть тканеспецифичной. Гетероплазмия в позиции 166С>Т встречается во многих образцах – вероятно, этот сайт является «горячей точкой» мутагенеза в мтДНК. Средний уровень мутантного аллеля в позиции 166 у пациентов (2,5%) выше, чем у здоровых индивидов (1,9%).

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №14-15-00305.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирный атлас профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и борьбы с ними: политика, стратегия и меры борьбы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44701/6/9789244564370_rus.pdf?ua=1. – ВОЗ, 2013. – 163 с.
2. Singh, R., Devi, S., & Gollen, R. (2015). Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life. *Diabetes/metabolism research and reviews*, no. 2, pp. 113-126.
3. Weissensteiner, H., Forer, L., Fuchsberger, C., Schöpf, B., Kloss-Brandstätter, A., Specht, G., ... & Schönherr, S. (2016). mtDNA-Server: next-generation sequencing data analysis of human mitochondrial DNA in the cloud. *Nucleic Acids Research*, no. 44(W1), pp. W64-69.
4. Li, M., Schröder, R., Ni, S., Madea, B., & Stoneking, M. (2015). Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, no. 8, pp. 2491-2496