



На правах рукописи

Губина Нина Евгеньевна

**Исследование процессов транскрипции и репликации
митохондриальной ДНК в разных тканях
при рентгеновском облучении мышей.**

03.01.03 – молекулярная биология

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

Пушино 2011 г.

1 0 MAR 2011

Работа выполнена в лаборатории радиационной молекулярной биологии
Учреждения Российской академии наук Института теоретической и
экспериментальной биофизики РАН

Научные руководители: кандидат биологических наук
Ушакова Татьяна Евгеньевна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор
Озолин Ольга Николаевна
Кандидат биологических наук
Азаршвили Тамара Сергеевна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова

Защита диссертации состоится «24» марта 2011 г. в 14-00 на заседании
совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.038.01 при
Учреждении Российской академии наук Институте биофизики клетки РАН по
адресу: 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке НЦБИ РАН г.
Пущино по адресу: 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3,

Автореферат разослан «22» февраля 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук



Смолихина Т.И.

Актуальность проблемы

В последние годы в молекулярной биологии значительное внимание уделяется изучению роли негеномной ДНК в функционировании отдельных клеток и многоклеточных организмов (Su, Pisetsky, 2009; Rowan BA, Bendich AJ., 2010). Особое значение приобретают исследования митохондриальной ДНК, поскольку нарушения функционирования генетического аппарата митохондрий являются причиной целого ряда наследственных и приобретенных в течение жизни заболеваний человека: болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, различных миопатий и наследуемой по материнской линии глухоты (Taylor, Turnbull, 2005; Wallace, 2005), сахарного диабета 2 типа (Suzuki S. 2005), атеросклероза (Schleicher E, Friess U., 2007) и хронической обструктивной болезни легких (Rahman I., 2005).

Генетический аппарат митохондрий млекопитающих представлен ковалентно замкнутой двуцепочечной молекулой ДНК (мтДНК), кодирующей 13 ключевых белков электронно-транспортной цепи, а также две рибосомальные и двадцать две транспортные РНК (Attardi et al, 1981). Митохондриальные гены расположены на обеих комплементарных цепях мтДНК и транскрибируются всего с двух промоторов, с образованием полицистронных РНК-предшественников, охватывающих все кольцо мтДНК (Montoya et al., 1983). Процессы транскрипции мтДНК и синтеза митохондриальных белков осуществляются в матрице митохондрий, под контролем ядерных факторов (Scarpulla, 2006). Репликация мтДНК также протекает в матрице митохондрий (Bogenhagen, Clayton, 1977), причем этот процесс в большей степени связан не с клеточным циклом и синтезом ядерной ДНК, а с поддержанием целостности митохондриального генетического аппарата (Schon, Gilkerson, 2010).

Считается, что митохондриальная ДНК и ассоциированные с ней факторы транскрипции, трансляции и репликации располагаются рядом с внутренней мембраной митохондрий, что облегчает координацию процессов экспрессии белковых субъединиц, сборки комплексов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и встраивания их в мембрану (Bogenhagen, 2009). Однако подобное расположение представляет собой потенциальную угрозу для функционирования генетического аппарата, поскольку известно, что деятельность ЭТЦ на внутренней мембране митохондрий сопряжена с образованием активных форм кислорода (АФК) и свободных радикалов. В условиях физиологической нормы образующиеся АФК элиминируются антиоксидантными системами клетки (Скулачев, 1996). В условиях окислительного стресса может возникать ситуация, в которой эти системы будут не способны утилизировать весь пул АФК, что, несомненно, может приводить к

повреждению митохондриальной ДНК и, как следствие, к развитию вышеперечисленных заболеваний человека.

В настоящее время в научной литературе отсутствуют четкие представления о том, в какой степени повреждения молекул мтДНК сказываются на процессах транскрипции митохондриальных генов и репликации мтДНК. Кроме того, неизвестно, сохраняется ли регуляция этих процессов ядерными факторами, роль которых установлена в условиях нормы (Scarpulla, 2006).

Одним из факторов, вызывающих сходные с окислительным стрессом нарушения структуры ДНК, является облучение, поскольку 80% его повреждающего действия проявляется в индукции активных форм кислорода и свободных радикалов (Wei, 1998). В связи с этим исследования процессов транскрипции и репликации мтДНК при рентгеновском облучении мышей существенно расширяют представления о функционировании генетического аппарата митохондрий в условиях окислительного стресса.

Исследование трех радиорезистентных тканей, отличающихся по метаболической активности – головного мозга, печени и скелетной мышцы – позволит установить, существуют ли общие для разных тканей закономерности в функционировании генетического аппарата митохондрий и его регуляции в условиях окислительного стресса.

Цели и задачи работы

Целью работы является исследование процессов транскрипции и репликации митохондриальной ДНК в разных тканях при рентгеновском облучении мышей в дозе 10 Гр.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Определить уровень транскрипции митохондриальных генов (ND2, ND4, CytB, АТР6), расположенных в разных участках мтДНК, в клетках головного мозга, печени и скелетной мышцы контрольных мышей.
2. Исследовать изменение транскрипции митохондриальных генов в клетках головного мозга, печени и скелетной мышцы в разные сроки после рентгеновского облучения мышей в дозе 10 Гр.
3. Определить копийность мтДНК в клетках головного мозга, печени и скелетной мышцы контрольных и облученных мышей.
4. Исследовать изменение количества транскриптов ядерных генов, участвующих в транскрипции мтДНК (PolRmt, TFAM, TFB2M) и в регуляции этого процесса (NRF2, PGC1-alpha, RIP140), в разные сроки после облучения мышей в дозе 10 Гр.

5. Выявить роль ядерных факторов PolRmt, TFAM, TFB2M NRF2, PGC1-alpha, RIP140 в регуляции митохондриальной транскрипции в условиях пострадиационного окислительного стресса.
6. Выявить роль ядерных факторов PolRmt, TFAM, TFB2M NRF2, PGC1-alpha, RIP140 в регуляции репликации мтДНК в условиях пострадиационного окислительного стресса.

Научная новизна работы

Настоящее исследование существенно расширяет современные представления о процессах репликации и транскрипции мтДНК в клетках головного мозга, печени и скелетной мышцы. Механизм транскрипции мтДНК представляется более сложным, чем можно было бы предположить, поскольку количество транскриптов разных митохондриальных генов оказалось неэквивалентным, несмотря на то, что инициация транскрипции этих генов осуществляется с общего промотора. Более того, во всех исследованных тканях соотношение митохондриальных транскриптов пропорционально количественному распределению соответствующих белковых комплексов ЭТЦ.

Неэквивалентное соотношение транскриптов разных митохондриальных генов доказывает наличие механизма посттранскрипционной регуляции митохондриальной транскрипции.

При рентгеновском облучении мышей во всех исследованных тканях обнаружено ингибирование процессов транскрипции мтДНК. Причиной снижения транскрипционной активности не является недостаток матрицы мтДНК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что после рентгеновского облучения мышей во всех исследованных тканях сохраняется регуляция процессов транскрипции мтДНК ядерными регуляторными факторами.

Во всех исследованных тканях обнаружена инициация репликации мтДНК под контролем ядерных факторов.

Научно-практическое значение

Исследование функционирования генетического аппарата митохондрий в условиях окислительного стресса, помимо расширения фундаментальных представлений в области молекулярной биологии клетки, необходимо для комплексного изучения нейромышечных и дегенеративных заболеваний, а также преждевременного старения, поскольку считается, что во многих случаях именно окислительный стресс предшествует развитию указанных патологий (Wallace, 2005).

Апробация диссертации

Результаты диссертационной работы доложены на конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика'10» (2010 г); на 12 и 14 Пушинских школах-конференциях

молодых ученых (2008 и 2010 гг); на V съезде по радиационным исследованиям «Радиобиология, радиэкология, радиационная безопасность» (Москва, 2006); на 35-ой конференции Европейского общества радиационных исследований (ERRS) (Киев, 2006); на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск 2008).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, основных выводов работы, списка литературы. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, содержит 44 рисунка и 1 таблицу. Список литературы включает 243 наименования.

Используемые сокращения

мтДНК – митохондриальная ДНК, мтРНК – митохондриальная РНК, яДНК – ядерная ДНК, мРНК – матричная РНК, АФК – активные формы кислорода, ЭТЦ – электрон-транспортная цепь. ND2 – NADH-dehydrogenase subunit 2 (вторая субъединица комплекса NADH-дегидрогеназы), ND4 – NADH-dehydrogenase subunit 4 (четвертая субъединица комплекса NADH-дегидрогеназы); Cytb – cytochrome b (цитохром б); ATP6 – ATP-synthetase subunit 6 (шестая субъединица комплекса АТФ-синтазы). PolRmt – митохондриальная ДНК-зависимая РНК-полимераза, TFAM, TFB2M – факторы инициации транскрипции мтДНК, NRF2 – (nuclear respiratory factor 2) ядерный респираторный фактор 2. PGC1-alpha – Peroxisome-proliferation-activated-receptor-gamma coactivator-alpha, коактиватор экспрессии факторов биогенеза митохондрий. RIP140 – receptor interacting protein 140kDa, корепрессор экспрессии факторов биогенеза митохондрий.

Материалы и методы

Исследование проводили на самцах мышей линии BALB/c, содержащихся в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Использовали по десять животных на каждую экспериментальную точку.

Рентгеновское облучение мышей в дозе 10 Гр проводили на установке РУТ 250-15-1, мощность облучения 2 Гр/мин. Через определенные сроки после облучения (1 час, 5 часов, 24 часа, 72 часа) мышей умерщвляли методом смещения шейного позвонка. Извлеченные ткани (головной мозг, печень, скелетная мышца) промывали холодным физиологическим раствором и использовали для выделения РНК и ДНК.

Выделение РНК. Тотальную РНК из клеток головного мозга, печени и скелетной мышцы мышей выделяли методом фенольно-хлороформного разделения в присутствии гуанидинтиоцианата, с последующим осаждением этиловым спиртом (Chomczhinsky and Sacchi, 1987).

Обработка РНК ДНКазой. Очистку препаратов РНК от ДНК проводили при 37°C в течение 30 минут с использованием набора ДНаза (без РНазной активности) (Силекс) в соответствии с инструкцией производителя.

Синтез первой цепи кДНК. Синтез первой цепи кДНК осуществляли с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) в соответствии с инструкцией производителя.

Выделение митохондрий. Митохондрии из печени необлученных мышей выделяли методом дифференциального центрифугирования.

Выделение тотальной и митохондриальной ДНК. Выделение ДНК из тканей и суспензии митохондрий осуществляли классическим методом фенольно-хлороформного разделения с последующим осаждением этиловым спиртом.

ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторах Applied Biosystems 7500 Real-Time System и Applied Biosystems 7300 Real-Time System (Applied Biosystems, USA). Система ПЦР-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 Mg²⁺, 250 нМ каждого праймера и зонда, 1,5 ед. Taq-полимеразы. Праймеры и зонды для количественного определения фрагментов митохондриальных и ядерных нуклеиновых кислот подбирали с помощью программы Primer Express 2.0. (Табл. 1.)

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для ПЦР в реальном времени.

Название праймера	Последовательность	Длина ампликона
ATP6 For (8265-8287)	AAT TAC AGG CTT CCG ACA CAA AC	79
ATP6 Rev (8342-8319)	TGG AAT TAG TGA AAT TGG AGT TCC T	
ATP6 Probe (8290-8316)	Cy5-AAA AGC TCA CTT GCC CAC TTC CTT CCA-BHQ2	
CYTB For (14662-14680)	GCC ACC TTG ACC CGA TTC T	64
CYTB Rev (14725-14707)	TTC CTA GGG CCG CGA TAA T	
CYTB Probe (14682-14705)	ROX-CGC TTT CCA CTT CAT CTT ACC ATT BHQ2	
ND2 For (4062-4082)	CAC GAT CAA CTG AAG CAG CAA	76
ND2 Rev (4137-4117)	ACG ATG GCC AGG AGG ATA ATT	
ND2 Probe (4085-4112)	FAM-AAA TAC TTC GTC ACA CAA GCA ACA GCC T-BHQ1	
ND4 For (10558-10582)	ATT ATT ATT ACC CGA TGA GGG AAC C	110
ND4 Rev (10567-10644)	ATT AAG ATG AGG GCA ATT AGC AGT	
ND4 Probe (10590-10617)	ROX-ACG CCT AAA CGC AGG GAT TTA TTT CCT A-BHQ2	
Beta-actin For	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA	81
Beta-actin Rev	TCT CCG GAG TCC ATC ACA ATG	
Beta-actin Probe	FAM-TGT CCC TGT ATG CCT CTG GTC GTA CCA C-BHQ1	
GAPDH For	GTG AGG GAG ATG CTC AGT GT	200
GAPDH Rev	CTG GCA TTG CTC TCA ATG AC	
GAPDH probe	R6G -TA AGA AAC CCT GGA CCA CCC ACC CC - BHQ2	
PolRmt For	TGC TAC AGG AAG GGC CTG AT	66
PolRmt Rev	GGA TGT CAG CGG CAT GTG T	
PolRmt Probe	FAM -TT CGT CTC CGT GCA CGA CTG CTT C-BHQ1	
NRF2 For	GCC GGT CGT TGA GAG TGA GT	76
NRF2 Rev	CTT GCA AGC TGC TCC AAG AAC	
NRF2 Probe	R6G-CT CAC AGC TGG TTT TAC TGG CGA CCA TG-BHQ1	
TFAM For	GGA TGC CCG GAC CTC TAA GA	98
TFAM Rev	CCA TTC CCT TCC CAG ACT GA	
TFAM Probe	ROX - TC CAG GCA CCC TGC AGA GTG TTC A - BHQ2	
TFB2M For	GCC GTT GCC TGA TTC TGA TTT	61
TFB2M Rev	GCT CCG ATC GAT TCC TGG AT	
TFB2M Probe	TAMRA - AG GAG TCG TCC CCG TGG A BHQ2	
PGC1 For	GTGTACCTTCTTCGTTGGGAAA	73
PGC1 Rev	TCA GAG GCC ATG CTA GTG AAA G	
PGC1 Probe	FAM - TCAGCTCTCGCAGAAGCAGTGTCCA-BHQ1	
RIP140 For	CAGTACTCCCCTTCCAAGCT	66
RIP140 Rev	TTG CCT TTC GTG AGG TCC AT	
RIP140 Probe	FAM - ACGAACACCCGCGCTAGCCACC - BHQ1	

Амплификацию фрагментов всех генов проводили при 45 циклах по программе: 95° - 15 сек, 62° - 1 мин. Перед амплификацией пробы прогревали в течение 10 минут при температуре 95°C.

Результаты и обсуждение

Процессы транскрипции и репликации мтДНК осуществляются в митохондриях при участии белков, экспрессируемых в ядре. В настоящей работе определено количество транскриптов четырех митохондриальных генов – ND2, ND4, CytB, ATP6, кодирующих белковые субъединицы электрон-транспортной цепи, и шести ядерных генов – PolRmt, TFAM, TFB2M, NRF2, PGC1- α , RIP140, участвующих в регуляции процессов транскрипции и репликации мтДНК. Гены ND2 и ND4 кодируют субъединицы I комплекса дыхательной цепи, CytB – белок цитохром B III комплекса дыхательной цепи; ген ATP6 кодирует мембранную субъединицу *a* АТФазы. Ядерные факторы TFAM, TFB2M и PolRmt участвуют в процессе транскрипции мтДНК, а продукты экспрессии генов NRF2, PGC1- α , RIP140 осуществляют регуляцию генетического аппарата митохондрий при действии физиологических сигналов.

Для достоверной оценки уровня транскрипции исследуемых генов необходимо было выбрать подходящий референсный ген для нормализации результатов. Используя метод попарного сравнения, описанный Vandesompele с соавторами (2009), мы сравнивали динамику пострадиационного изменения количества транскриптов двух ядерных референсных генов Beta-actin (компонент цитоскелета клетки) и GAPDH (глицеральдегидфосфат дегидрогеназа, фермент гликолиза). Оказалось, что после рентгеновского облучения мышей в дозе 10 Гр соотношение количества транскриптов этих генов практически не меняется во всех тканях, что, согласно указанному методу валидации, позволяет использовать любой из них для нормализации процессов митохондриальной транскрипции. Все данные по транскрипции митохондриальных и ядерных регуляторных генов представлены в виде количества мРНК исследуемого гена в пересчете на транскрипт гена Beta-actin.

Исследование соотношения митохондриальных транскриптов в тканях контрольных мышей.

Митохондриальная ДНК млекопитающих отличается компактной организацией: в ней отсутствуют интроны, а генетическая информация располагается на обеих цепях. Транскрипция всех митохондриальных генов осуществляется всего с двух промоторов – HSP на тяжелой цепи и LSP на легкой; при этом образуются два полицистронных предшественника, охватывающих все кольцо мтДНК. Этот процесс симметричен и происходит одинаково для обеих цепей мтДНК, несмотря на то, что легкая цепь кодирует всего одну мРНК и 8 тРНК, а тяжелая, соответственно, 12 мРНК, 2 рРНК и 14 тРНК. После синтеза первичного транскрипта происходит процессинг, т.е. вырезание мРНК и полиаденилирование образовавшихся молекул. Поскольку все исследуемые нами митохондриальные гены – ND2, ND4, CytB, ATP6 – расположены на тяжелой цепи и

экспрессируются с одного промотора, следовало бы ожидать, что в условиях нормы количество их транскриптов после процессинга окажется примерно одинаковым.

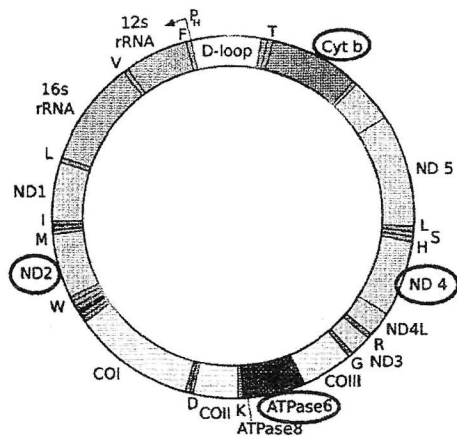


Рис 1. Схема расположения исследуемых генов на тяжелой цепи мтДНК. Исследуемые гены обведены линией. P_H – промотор тяжелой цепи мтДНК

Однако, вопреки ожиданиям, было обнаружено, что во всех исследованных тканях необлученных мышей количества митохондриальных транскриптов достоверно отличаются друг от друга (рис. 2).

Во всех исследованных тканях наименьший уровень транскрипции характерен для генов ND2 и ND4, наибольший – для гена ATP6, а ген CytB занимает промежуточное положение по количеству транскриптов. Можно было бы предположить, что наблюдаемое различие в количестве митохондриальных транскриптов объясняется разной эффективностью реакции обратной транскрипции. Однако в настоящем исследовании все постановки ПЦР-РВ для митохондриальных генов и бета-актина проводились на одном препарате кДНК. Это различие не может быть и следствием разных условий амплификации и разной эффективности работы праймеров, поскольку при тех же самых условиях производилась оценка количества фрагментов соответствующих генов мтДНК, и достоверных различий в количестве фрагментов ДНК не было обнаружено. Все вышесказанное позволило считать количества транскриптов митохондриальных генов не следствием артефакта, а истинными значениями. Кроме того, оказалось, что если принять количество мРНК ND2 и ND4, как наименьшую величину, за единицу, можно получить следующие соотношения транскриптов:

$$\text{ND2/ND4} : \text{CytB} : \text{ATP6} = 1 : 4 : 7 \text{ (головной мозг)}$$

$$\text{ND2/ND4} : \text{CytB} : \text{ATP6} = 1 : 2 : 10 \text{ (печень)}$$

$$\text{ND2/ND4} : \text{CytB} : \text{ATP6} = 1 : 4 : 20 \text{ (скелетная мышца)}$$

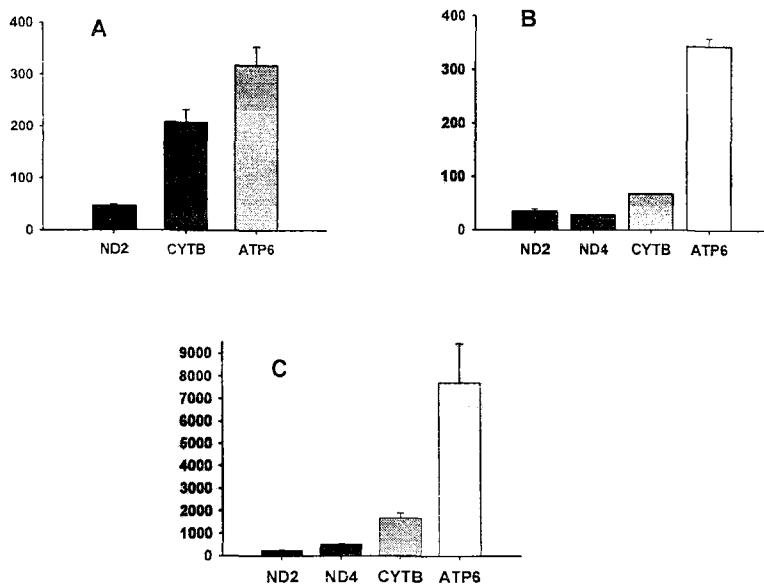


Рис. 2. Количество транскриптов митохондриальных генов в клетках головного мозга (А), печени (В) и скелетной мышцы (С) контрольных мышей. n=10. Ось абсцисс – исследуемые гены. Ось ординат – количество мРНК исследуемых генов в пересчете на одну мРНК ядерного референсного гена Beta-actin.

Можно видеть, что во всех тканях наблюдается общая закономерность в распределении транскриптов: их количество увеличивается вдоль пути следования электронов, от I комплекса ЭТЦ к V. Более того, полученные нами соотношения митохондриальных транскриптов согласуются с количественным распределением белковых комплексов дыхательной цепи на внутренней мембране митохондрий (Schägger and Pfeiffer, 2001). Наиболее вероятным объяснением наблюдаемой разницы в количестве транскриптов представляется участие посттранскрипционных механизмов, возможно, связанных с различным временем жизни отдельных мРНК (Picchota et al., 2006), однако чем определяется стабильность митохондриальных транскриптов, к настоящему времени неизвестно.

Таким образом, несмотря на различия в активности метаболизма, во всех тканях в условиях нормы существует общий механизм, ответственный за поддержание постоянного соотношения митохондриальных транскриптов.

Исследование процессов транскрипции мтДНК в тканях облученных мышей

Функционирование электрон-транспортной цепи митохондрий всегда сопровождается образованием побочных продуктов – активных форм кислорода и его производных. Генетический аппарат митохондрий располагается в непосредственной близости от внутренней митохондриальной мембраны и даже в условиях нормы подвергается постоянным атакам со стороны свободных радикалов и АФК. Облучение мышей в дозе 10 Гр резко увеличивает количество АФК и позволяет выявить реакцию генетического аппарата митохондрий на изменение свободнорадикального окружения. В настоящей главе представлены результаты исследования процесса транскрипции митохондриальных генов в разные сроки после облучения мышей в дозе 10 Гр.

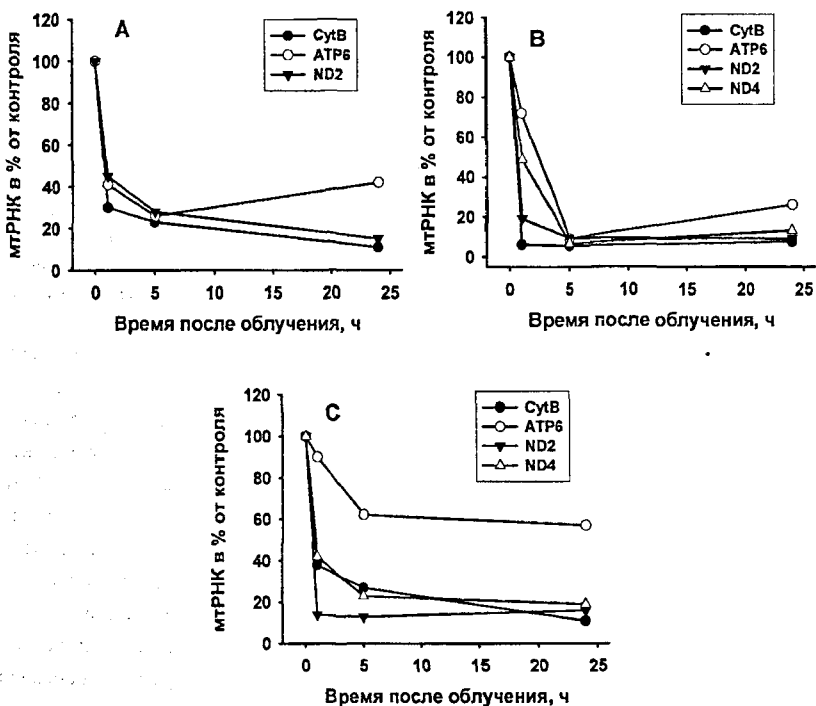


Рис. 3. Пострадиационное изменение количества митохондриальных транскриптов в клетках головного мозга (А), скелетной мышцы (В) и печени (С) мышей. $n=10$. Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов митохондриальных генов в пересчете на одну мРНК гена Beta-actin. Количество митохондриальных транскриптов необлученных мышей принято за 100%.

После облучения мышей количество транскриптов всех исследованных митохондриальных генов во всех исследованных тканях падает и не возвращается к контрольному значению в течение суток (рис. 3). Поскольку гены ND2, ND4, CytB, АТР6 расположены в разных участках мтДНК (рис. 1), единообразное снижение количества их транскриптов позволяет говорить о снижении транскрипции мтДНК в целом.

До недавнего времени считалось, что мтДНК особенно уязвима к действию генотоксических агентов (Kanki et al., 2004), поэтому общее снижение количества митохондриальных транскриптов можно было бы объяснить тотальным повреждением митохондриальной ДНК как матрицы для транскрипции. Однако, как следует из полученных нами результатов, количество копий мтДНК не только не снижается, но даже увеличивается по сравнению с контрольным уровнем в разные сроки после облучения в зависимости от типа ткани (Рис. 4)



Рис. 4. Пострадиационное изменение количества копий мтДНК в клетках головного мозга (А), печени (В) и скелетной мышцы (С) в разные сроки после облучения мышей в дозе 10 Гр. n=10. Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество тысяч копий мтДНК в пересчете на гаплоидный набор клетки.

Снижение количества митохондриальных транскриптов можно было бы объяснить разрушением одноцепочечных молекул РНК в условиях облучения. Однако, как показывают полученные нами данные, уровень транскрипции ядерного гена RIP140 (данные приведены ниже, рис. 6) возрастает уже через час после облучения. То, что транскрипция отдельных генов после облучения возрастает, свидетельствует о том, что аппарат транскрипции клетки в целом не нарушен.

Таким образом, рентгеновское облучение мышей в дозе 10 Гр ингибирует процесс транскрипции митохондриальной ДНК во всех исследованных тканях – в печени, скелетной мышце и головном мозге мышей. Снижение транскрипции мтДНК не является ни следствием деградации мтДНК как матрицы для транскрипции, ни результатом разрушения структуры самих РНК в условиях агрессивного окружения свободных радикалов.

Изменение количества транскриптов ядерных генов в клетках головного мозга в разные сроки после облучения мышей в дозе 10 Гр

Установлено, что при реализации ряда физиологических программ процесс транскрипции мтДНК управляется сложной системой ядерных факторов (Lin, 2009). Ключевые элементы этой системы представлены коактиваторами (PGC1-alpha, PGC1-beta, PRC) и корепрессорами транскрипции (RIP140, SIN3A), которые являются посредниками, сенсорами в передаче физиологических сигналов к ядерному аппарату экспрессии и главными регуляторами биогенеза митохондрий. На следующей ступени находятся ядерные респираторные факторы (NRF1 и NRF2), которые связываются с белками семейства PGC и активируют экспрессию белков, участвующих в биогенезе мтДНК, в частности, митохондриальной РНК-полимеразы и факторов транскрипции mtTFA (TFAM), TFB1M и TFB2M (Gleyzer, 2005). Мы попытались выяснить, в какой степени перечисленные факторы участвуют в регуляции митохондриальной транскрипции разных тканей мышей в условиях окислительного стресса.

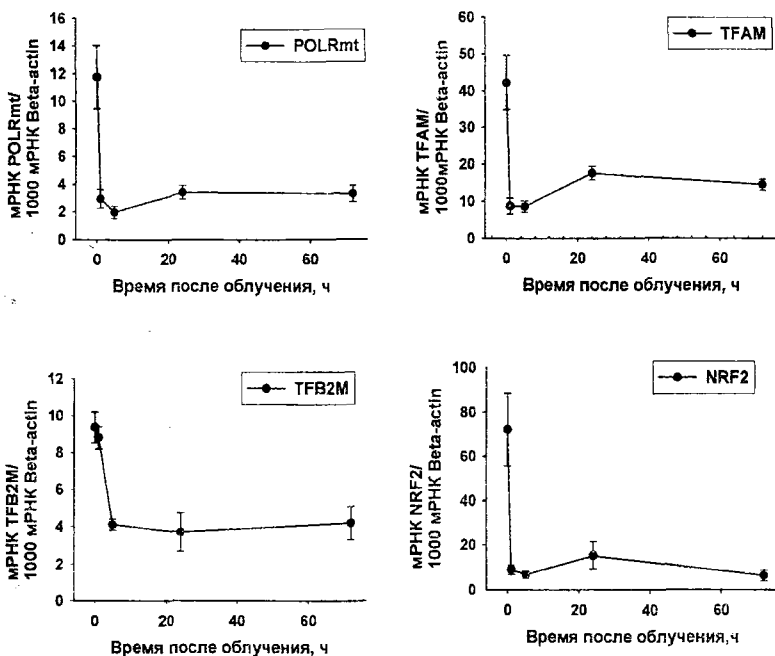


Рис. 5. Пострадиационное изменение транскрипции генов PolRmt, TFAM, TFB2M и NRF2 в клетках головного мозга мышей. n=10. Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов исследуемых генов в пересчете на 1000 копий мРНК гена Beta-actin.

Обнаружено, что в клетках головного мозга уже в первые часы после облучения мышей происходит снижение количества транскриптов как самих факторов транскрипции (PolRmt, TFAM, TFB2M, рис. 5), так и факторов, активирующих биогенез митохондриальной ДНК (NRF2, рис. 5; PGC1-alpha, рис. 6). Уровень транскрипции всех пяти генов остается сниженным в течение трех суток, и это совпадает с динамикой изменения транскрипции митохондриальной ДНК (рис.3 А). В первые же часы после облучения происходит индукция транскрипции гена RIP140 (рис. 6), уровень транскрипции которого к пяти часам повышается на порядок и не снижается в течение трех суток. В условиях нормы фактор RIP140 является антагонистом фактора PGC1-alpha: он играет роль главного ингибитора биогенеза митохондрий и подавляет экспрессию генов, участвующих в процессах экспрессии и репликации мтДНК и окислительного фосфорилирования (Cavaillès et al., 1995). В настоящее время механизм взаимодействия коактиватора PGC1-alpha и корепрессора RIP140 практически не изучен, однако предполагается, что регуляция активации/репрессии биогенеза митохондрий осуществляется за счет изменения стехиометрии количества факторов PGC1-alpha и RIP140 (Lin J., 2009).

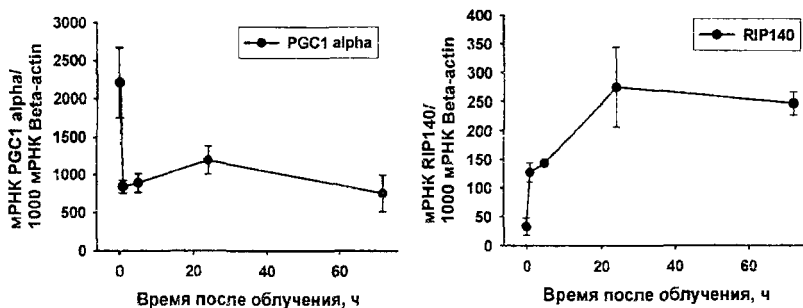


Рис. 6. Пострадиационное изменение транскрипции генов PGC1-alpha и RIP140 в клетках головного мозга мышей. n=10. Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов исследуемых генов в пересчете на 1000 копий мРНК гена Beta-actin.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что в клетках головного мозга снижение митохондриальной транскрипции в первые часы после облучения объясняется не столько процессами деградации матрицы и транскриптов, сколько регуляторным ингибированием при участии ядерных факторов. При этом регуляция митохондриальной транскрипции сохраняется даже на третьи сутки после облучения (рис.

7): несмотря на снижение общего уровня транскрипции факторов PolRmt, TFAM и TFB2M, их соотношение в клетках головного мозга остается близким к контрольному.

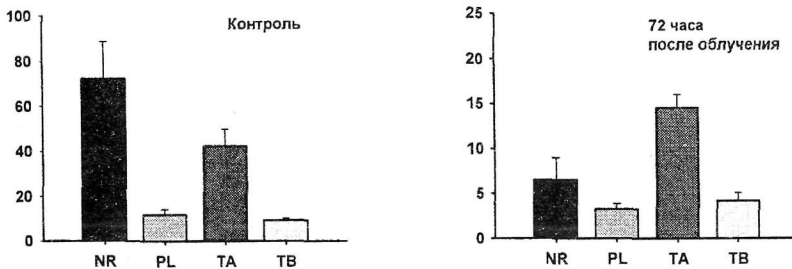


Рис. 7. Количество мРНК ядерных регуляторных генов в клетках головного мозга мышей в контроле и через 72 часа после облучения. n=10. Ось абсцисс – исследуемые гены: NR – NRF2, PL – PolRmt, TA – TFAM, TB – TFB2M. Ось ординат – количество копий мРНК исследуемых генов в пересчете на тысячу копий мРНК Beta-actin.

Изменение количества транскриптов ядерных генов в клетках печени в разные сроки после облучения мышей в дозе 10 Гр.

В клетках печени, так же как и в клетках головного мозга, количество транскриптов всех митохондриальных генов снижается после облучения и не возвращается к контрольному уровню (рис. 3B). Однако ядерная регуляция транскрипции мтДНК в клетках печени выглядит несколько иначе, чем в клетках головного мозга. Как можно видеть из рис. 8, уровень транскрипции генов NRF2 (рис. 8A) и TFAM (рис. 8B) через час после облучения снижается, но через сутки практически достигает контрольных значений. Через сутки после облучения происходит также подъем уровня транскрипции гена PGC1-alpha (рис. 8C). Интересно, что в те же сроки на фоне повышения уровня транскрипции генов TFAM, NRF2 и PGC1-alpha резко падает количество транскриптов гена RIP140 (рис. 8D). Если обратиться к рис. 4 (B), можно видеть, что в клетках печени через сутки после облучения мышей наблюдается пик копияности мтДНК. На основании этих данных можно предположить, что в клетках печени активация транскрипции факторов TFAM, NRF2 и PGC1-alpha необходима для инициации репликации мтДНК. Следует заметить, что в клетках головного мозга увеличения транскрипции этих факторов не наблюдается, возможно, потому, что репликация мтДНК в этой ткани прошла в течение первого часа после облучения за счет имеющихся к этому времени белковых факторов.

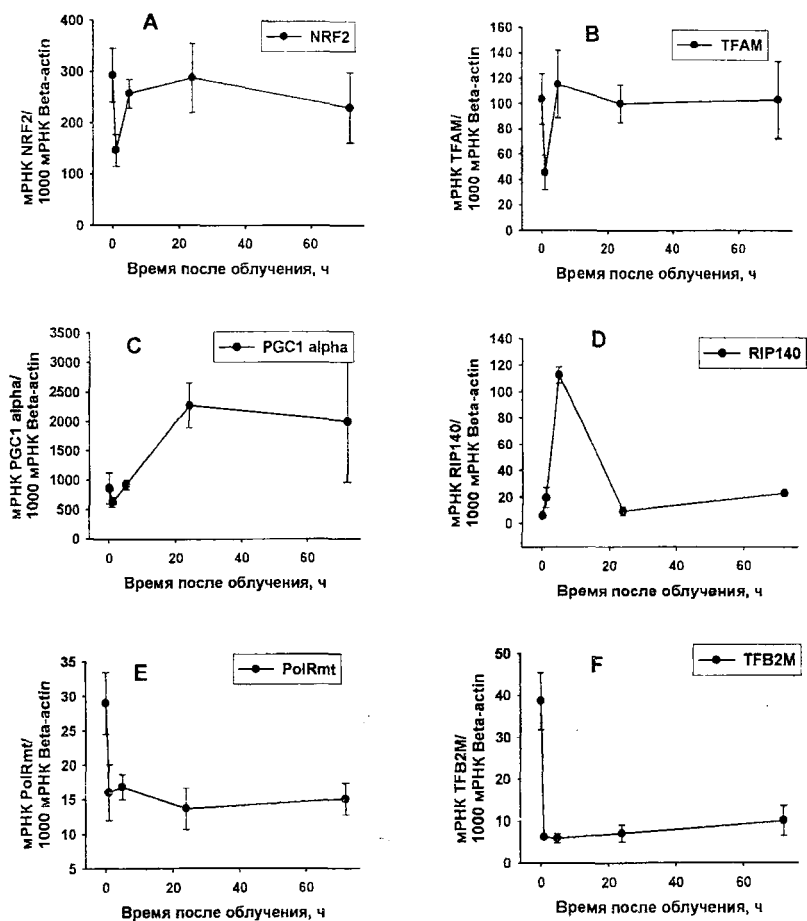


Рис. 8. Пострадиационное изменение транскрипции генов PolRmt, TFAM, TFB2M, NRF2, PGC1-alpha, RIP140 в клетках печени мышей. n=10. Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов исследуемых генов в пересчете на 1000 мРНК гена Beta-actin

В отличие от мРНК факторов TFAM, NRF2 и PGC1-alpha, мРНК факторов PolRmt (рис. 8E) и TFB2M (рис. 8F) изменяется в той же степени и кинетике, что и количество транскриптов всех исследованных митохондриальных генов, что совпадает с данными, полученными на клетках головного мозга. Фактор TFB2M необходим для узнавания митохондриальной РНК-полимеразой промоторного участка; при этом показано, что

средство комплекса, инициирующего транскрипцию, к промотору LSP, с которого фактически осуществляется синтез праймеров для репликации, выше на порядок, чем средство к промотору HSP, с которого синтезируется полицистрон Н-цепи, а значит, и все исследуемые нами транскрипты (Shutt et al., 2010). По-видимому, именно TFB2M является «узким местом» регуляции транскрипции мтДНК: при снижении его количества комплекс инициации транскрипции будет связываться преимущественно (а, возможно, и исключительно) с промотором LSP, в результате чего мы будем наблюдать снижение транскрипции и активацию репликации мтДНК. Каким образом ген TFB2M выходит из-под контроля коактиватора PGC1-alpha, к настоящему времени неизвестно, поскольку представления о регуляции митохондриальной транскрипции в условиях окислительного стресса отсутствуют.

Таким образом, в клетках печени, также как и в клетках головного мозга, наблюдается параллельное снижение транскрипции митохондриальной ДНК и ключевого ядерного фактора, участвующего в ее регуляции (TFB2M), а также PolRmt. При этом в клетках печени, как и в клетках головного мозга, соотношение транскриптов ядерных факторов PolRmt, TFAM и TFB2M через 72 часа после облучения остается близким к контрольному (рис. 9).

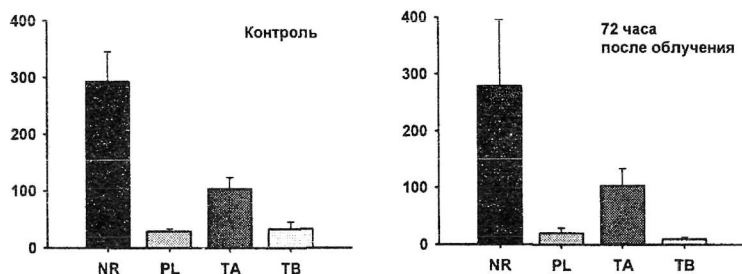


Рис. 9. Количество мРНК ядерных регуляторных генов в клетках печени мышей в контроле и через 72 часа после облучения. n=10. Ось абсцисс – исследуемые гены: NR – NRF2, PL – PolRmt, TA – TFAM, TB – TFB2M. Ось ординат – количество копий мРНК исследуемых генов в пересчете на тысячу копий мРНК Beta-actin.

Изменение количества транскриптов ядерных генов в клетках скелетной мышцы в разные сроки после облучения мышей в дозе 10 Гр

В клетках скелетной мышцы радиационно-индуцированный ответ ядерных генов также развивается специфично. Как можно видеть из рис. 10, уровень транскрипции гена NRF2 (рис. 10А) практически не меняется в ходе наблюдения. Количество транскриптов TFAM

снижается в первые пять часов после облучения, после чего наблюдается пик его транскрипции через сутки (рис. 10B). Кроме того, через сутки наблюдается резкий подъем уровня транскрипции гена PolRmt (рис. 10C).

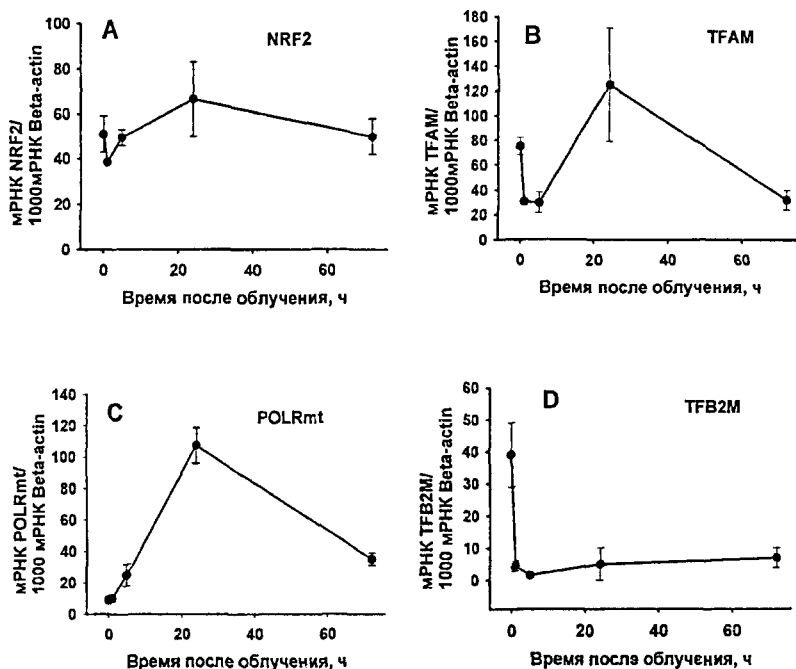


Рис.10. Изменение транскрипции генов PolRmt, TFAM, TFB2M и NRF2 в клетках скелетной мышцы при облучении мышей в дозе 10Гр. n=10. Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов исследуемых генов в пересчете на 1000 копий мРНК гена Beta-actin

Как и в клетках печени, в клетках скелетной мышцы активация ряда факторов (TFAM, PolRmt, рис. 10 B и C) предшествует инициации репликации мтДНК (рис. 4C).

При этом в клетках скелетной мышцы проявляется любопытное поведение факторов PGC1-alpha и RIP140. Уровень транскрипции гена PGC1-alpha резко повышается уже через час после облучения и возвращается к контролю на третьи сутки (рис. 11). Уровень гена RIP140 снижается и также возвращается к контролю на третьи сутки (рис. 11). Такое парадоксальное поведение этих факторов, принимая во внимание снижение, а не активацию транскрипции мтДНК, можно объяснить единственным обстоятельством. Дело в том, что эти

факторы обладают широким спектром активности, связанным не только с управлением респираторной функцией митохондрий. В частности, в клетках скелетной мышцы коактиваторы и корепрессоры участвуют в трансформации мышечных волокон – быстрых в медленные и наоборот (Lin et al., 2002; Seth et al., 2007). Известно также, что PGC1-alpha индуцируется в ответ на постоянные мышечные сокращения как у людей, так и у грызунов. (Baar et al., 2002; Goto et al., 2000; Norrbom et al., 2004). Возможно, рентгеновское облучение вызывает постоянную мышечную дрожь (которую мы наблюдали у облученных мышей) и активацию в связи с этим генов, ответственных за развитие «медленных» мышечных волокон, в том числе и PGC1-alpha. То есть, возможно, в клетках скелетной мышцы мы наблюдаем преимущественную реакцию генов PGC1-alpha и RIP140 не на окислительный стресс, а на кинетические процессы в мышечных волокнах.

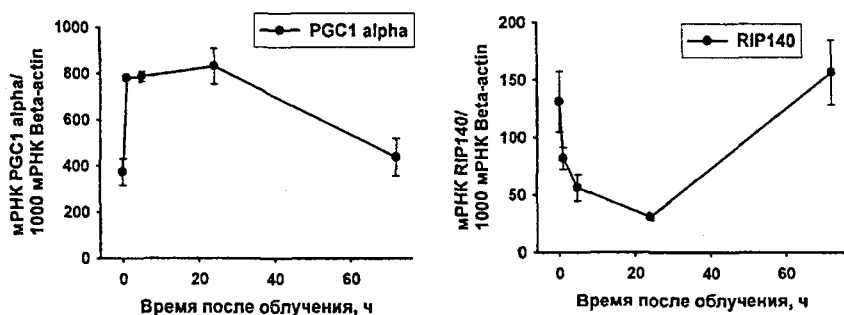


Рис.11. Изменение транскрипции генов PGC1-alpha и RIP140 в клетках скелетной мышцы при облучении мышей в дозе 10Гр. n=10. Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов исследуемых генов в пересчете на 1000 копий мРНК гена Beta-actin.

Следует заметить, что в клетках скелетной мышцы наблюдается та же динамика уровня транскрипции гена TFB2M, что и в клетках головного мозга и печени, а именно, единообразное снижение вместе с митохондриальными генами без возвращения к контрольному уровню. Как можно видеть из рис. 10 (D), к пяти часам после облучения уровень транскрипции гена TFB2M составляет всего 4% по сравнению с контрольным.

Заключение

Генетический аппарат митохондрий представлен двуцепочечной молекулой мтДНК, кодирующей 13 белков ЭТЦ и набор транспортных и рибосомальных РНК, необходимый для их трансляции (Anderson, 1981). Процессы экспрессии и репликации мтДНК осуществляются в матриксе митохондрий, но полностью зависят от ядерных факторов.

К моменту проведения настоящего исследования было известно, что транскрипция обеих цепей мтДНК осуществляется всего с двух промоторов, в результате чего образуются полицистронные предшественники, содержащие информационные, транспортные и рибосомальные РНК. Исходя из этих представлений, мы ожидали получить эквимоллярные количества мРНК всех митохондриальных генов, лежащих на тяжелой цепи мтДНК и транскрибирующихся с одного промотора. Однако во всех исследованных тканях мышей (головной мозг, печень, скелетная мышца) было обнаружено разное количество транскриптов митохондриальных генов. Более того, количество транскриптов генов, относящихся к разным комплексам ЭТЦ, увеличивается по мере продвижения от первого комплекса к пятому. Нам впервые удалось связать соотношение митохондриальных транскриптов с количественным распределением соответствующих белковых комплексов во внутренней мембране митохондрий. Результаты, представленные в данной работе, доказывают высказанное ранее предположение (Gadaleta et al., 1990; Sbisà et al., 1992) о существовании посттранскрипционного механизма регуляции экспрессии мтДНК и свидетельствуют о том, что этот механизм является общим для разных типов тканей и не зависит от их метаболической активности.

В условиях окислительного стресса, инициированного тотальным рентгеновским облучением мышей, происходит снижение количества транскриптов всех исследованных митохондриальных генов (ND2, ND4, CytB, ATP6) во всех исследованных тканях (головной мозг, скелетная мышца, печень). Тот факт, что эти гены расположены в разных участках тяжелой цепи мтДНК, позволяет нам говорить о падении транскрипции мтДНК в целом. Уровень транскрипции мтДНК не восстанавливается в течение суток после облучения мышей во всех тканях, причем это снижение не является следствием повреждения аппарата транскрипции клетки, поскольку существуют гены, экспрессия которых индуцируется после облучения, например, ген RIP140.

И транскрипция, и репликация мтДНК находятся под контролем сложной многоуровневой системы ядерных факторов, включающей активаторы и репрессоры этих процессов. Мы исследовали одну регуляторную цепь, которая состоит из факторов, участвующих в транскрипции мтДНК (PolRmt, TFAM, TFB2M), которые, в свою очередь, находятся под контролем ядерных активаторов NRF2 и PGC1- α и антагониста этих белков, корепрессора RIP140. Общим для всех исследованных тканей является то, что снижение транскрипции мтДНК в условиях окислительного стресса, так же как и в условиях физиологической нормы, находится под контролем гена TFB2M.

В отличие от однонаправленного падения транскрипции мтДНК во всех исследованных тканях облученных мышей, число копий мтДНК не только не падает, но и возрастает, что указывает на инициацию процессов репликации. Индукция пострадиационной репликации мтДНК является тканеспецифичной в том смысле, что время инициации и степень увеличения копийности варьирует в зависимости от типа ткани. Следует заметить, что в митохондриях процесс репликации мтДНК в условиях нормы тесно связан с процессом транскрипции (Lee, Clayton, 1997) и, соответственно, находится под контролем тех же самых регуляторных ядерных факторов.

Однако разнонаправленность процессов транскрипции (ингибирование) и репликации (инициация) мтДНК в тканях облученных мышей позволяет дифференцировать роль ядерных факторов в регуляции данных процессов в условиях окислительного стресса. А именно; в клетках печени и скелетной мышцы активация транскрипции факторов PGC1-alpha, NRF2, TFAM предшествует индукции репликации. А снижение транскрипции фактора TFB2M в обеих тканях полностью повторяет динамику транскрипции митохондриальных генов. Таким образом, можно предположить, что в клетках печени и скелетной мышцы в условиях окислительного стресса гены PGC1-alpha, NRF2 и TFAM в большей степени регулируют процесс репликации, а ген TFB2M – процессы транскрипции мтДНК. В клетках головного мозга все исследованные ядерные факторы регуляции (PolRmt, TFAM, TFB2M, NRF2, PGC1-alpha) меняются однонаправлено с изменением транскрипции мтДНК. Выяснить их роль в регуляции процессов репликации в условиях окислительного стресса в течение трех суток, то есть времени постановки эксперимента, не представляется возможным, поскольку репликация мтДНК, в отличие от клеток печени и скелетной мышцы, инициируется быстро (через час после облучения) и происходит за счет уже синтезированных белковых факторов.

Известно, что окислительные повреждения мтДНК могут приводить к синтезу дефектных белков ЭТЦ, что вызывает разобщение процессов окислительного фосфорилирования и усиление окислительного стресса (Wei, 1998). Кроме того, в отличие от ядерной ДНК, синтез мтДНК при нарушении ее структуры не прекращается (Gutsaeva et al. 2006). Принимая во внимание это обстоятельство, снижение транскрипции мтДНК после облучения можно рассматривать как часть механизма, направленного на предотвращение синтеза дефектных белков и возникновения дисфункции митохондрий. Возможно также, снижение митохондриальной транскрипции дает время системам репликации и элиминации очистить пул мтДНК от мутантных копий.

Выводы

- 1) Выявлены общие для всех исследованных тканей – головного мозга, скелетной мышцы и печени – особенности функционирования генетического аппарата митохондрий в условиях нормы и при действии рентгеновского облучения.
- 2) В клетках головного мозга, скелетной мышцы и печени контрольных мышей соотношения мРНК генов ND2, ND4, CytB и ATP6 не эквивалентны, несмотря на их транскрипцию с одного промотора.
- 3) Впервые показано, что во всех исследованных тканях контрольных мышей в количестве транскриптов генов ND2, ND4, CytB и ATP6 выявляется соотношение, близкое к количественному распределению соответствующих белковых комплексов на внутренней мембране митохондрий.
- 4) Рентгеновское облучение мышей в летальной дозе 10 Гр в клетках головного мозга, печени и скелетной мышцы инициирует репликацию мтДНК, которой предшествует повышение транскрипции ядерных факторов TFAM, NRF2 и PGC1- α /rho.
- 5) Во всех тканях после облучения мышей в летальной дозе 10 Гр происходит снижение количества всех исследованных митохондриальных транскриптов, что свидетельствует об угнетении митохондриальной транскрипции, которое происходит под контролем ядерного фактора TFB2M.
- 6) Выдвигается предположение о том, что наблюдаемая пострадиационная инициация репликации мтДНК способствует обновлению и репарации митохондриального генома, а ингибирование процессов транскрипции мтДНК направлено на предотвращение синтеза дефектных белков.

Список публикаций по теме диссертации

1. Н.Е. Губина, О.С. Мерекина, Т.Е. Ушакова. (2010) Исследование транскрипции митохондриальной ДНК в клетках печени, скелетной мышцы и головного мозга после рентгеновского облучения мышей в дозе 10 Гр. Биохимия. Т. 75, вып. 6, с. 878-886. (N.E. Gubina, O.S. Merekina, T.E. Ushakova. (2010) Mitochondrial DNA transcription in mouse liver, skeletal muscle and brain following lethal X-ray irradiation. *Biochemistry (Moscow)*. V. 75, №6, pp 777-783).
2. Н.Е. Губина, Э.В. Евдокимовский, Т.Е. Ушакова. (2010) Функционирование генетического аппарата митохондрий в клетках селезенки мышей в условиях индуцированного радиацией апоптоза. Молекулярная биология, т. 44, №5, с. 1-9. (N.E. Gubina, E.V. Evdokimovsky, T.E. Ushakova. Mitochondrial genetic apparatus functioning in mice spleen cells under radiation-induced apoptosis. (2010) *Molecular Biology*, v. 44, №6, pp. 915-922).
3. Губина Н.Е., Мерекина О.С., Евдокимовский Э.В., Ушакова Т.Е. Исследование репликации и транскрипции мтДНК в разных тканях облученных мышей. Сборник тезисов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. 11-15 мая 2008 г. Новосибирск. С.112.
4. Patrushev M., Evdokimovsky E., Gubina N., Merekina O., Ushakova T., Gogvadze V., Gaziev A. Alterations of mtDNA functionality in brain and spleen after irradiation. The 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society. Kyiv, Ukraine, August 22-25, 2006, p. 151.
5. Patrushev M., Ushakova T., Gubina N., Merekina O., Gaziev A. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of mice after irradiation. The V Congress on the Radiation Research. Moscow, Russia, April 10-14, 2006, p. 66.
6. Губина Н.Е., Ушакова Т.Е. Функционирование генетического аппарата митохондрий в клетках скелетной мышцы при рентгеновском облучении мышей в летальной дозе 10 Гр. Сборник тезисов 14 Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых. Пушкино, Россия, 19-23 апреля 2010 года. С. 126.
7. Губина Н.Е., Ушакова Т.Е. Функционирование генетического аппарата митохондрий в клетках головного мозга мышей при тотальном рентгеновском облучении в дозе 10 Гр. Сборник тезисов конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика'10». Учреждение Российской Академии Наук Институт Теоретической и Экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия, 19-20 октября 2010 года. С. 5.
8. Губина Н.Е., Евдокимовский Э.В., Ушакова Т.Е. Исследование процессов транскрипции митохондриальных и ядерных генов в разных тканях мышей в условиях окислительного стресса. Сборник тезисов 12-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» Пушкино, 10-14 ноября 2008 г. С. 22.

Подписано в печать: 17.02.2011

Заказ № 5000 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru