ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 2, с. 241–244

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.224:599.323.4

НОВАЯ ДЕЛЕЦИЯ мтДНК МЫШИ ЛИНИИ BALB/c

© 2021 г. В. Н. Антипова*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Московская обл., Пущино, 142290 Россия

**e-mail: valery_a@rambler.ru*

Поступила в редакцию 23.02.2020 г.
После доработки 20.04.2020 г.
Принята к публикации 17.06.2020 г.

В тканях головного мозга, селезенки, сердца и периферической крови самца мыши линии BALB/c выявлена новая крупномасштабная делеция митохондриальной ДНК размером 7653 пн.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, делеция, мышь.

DOI: 10.31857/S0016675821020028

Митохондриальная ДНК (мтДНК) млекопитающих – это небольшая (около 16.6 пн) кольцевая молекула. Она кодирует белковые субъединицы митохондриальных комплексов, которые участвуют в окислительном фосфорилировании [1]. Мутации мтДНК, приводящие к нарушениям в системе окислительного фосфорилирования [2], вызывают дисфункцию митохондрий и мультисистемные заболевания [3, 4].

Важным мутационным событием, возникающим в митохондриальном геноме, является образование таких структурных нарушений, как делеции. Чаще всего это крупномасштабные (протяженные) делеции, до нескольких тысяч пар нуклеотидов, приводящие к утрате некоторых генов [5].

Множественные делеции (молекулы мтДНК с делециями разного размера) часто происходят из-за мутаций в ядерных генах, которые необходимы для правильной репликации и/или поддержания митохондриального генома. Они встречаются в соматических клетках и возникают в течение жизни индивида. Такие мутации наследуются по менделеевскому типу [6, 7]. Одиночные делеции возникают случайно во время репликации мтДНК в ооците или на ранних стадиях эмбрионального развития [7]. Они почти никогда не наследуются [8].

Точный механизм образования делеций мтДНК неизвестен. Наиболее обсуждаемыми являются модели формирования делеций в процессе репликации [9, 10] или в процессе репарации двухцепочечных разрывов [11]. В модели репликации с проскальзыванием цепи (slipped-strand replication model) предполагается, что разрыв в смещенной одноцепочечной матричной тяжелой цепи между 3' и 5' прямыми повторами может способствовать отжигу 3' прямого повтора этой цепи с гомологичным 5' прямым повтором на матричной легкой цепи. Репликация, начавшаяся на участке начала репликации легкой цепи приведет к образованию дочерней молекулы с делецией [12]. Согласно второй модели, делеции мтДНК являются результатом процесса репарации двухцепочечных разрывов. 3' → 5' экзонуклеазная активность митохондриальной ДНК-полимеразы приводит к образованию одноцепочечных участков ДНК в области двухцепоченых разрывов. Эти одноцепочечные участки (с 5' и 3' повторами) могут отжигаться с микрогомологичными последовательностями, например, повторами. После репарации, лигирования и деградации одноцепочечных нитей формируется митоходриальный геном с делецией [11]. В недавнем исследовании были предложены экспериментальные доказательства того, что в процесс образования делеций мтДНК включена рекомбинация по механизму выбора копии (copy-choice recombination model) [13]. В данной модели делеции образуются во время синтеза легкой цепи мтДНК, когда матричная тяжелая цепь является одноцепочечной. Повторы на тяжелой цепи могут быть приближены друг к другу из-за образования вторичных структур, что может вызвать приостановку репликации и диссоциацию ДНК-полимеразы от матричной цепи. Если диссоциация произойдет во время синтеза (первого) повтора, 3'-конец растущей цепи и полимераза могут взаимодействовать с участком матричной цепи, содержащей гомологичный повтор. Когда синтез ДНК возобновляется, промежуточная последовательность удаляется. Детальный анализ моделей образования делеций мтДНК представлен в обзорных работах [12, 14].

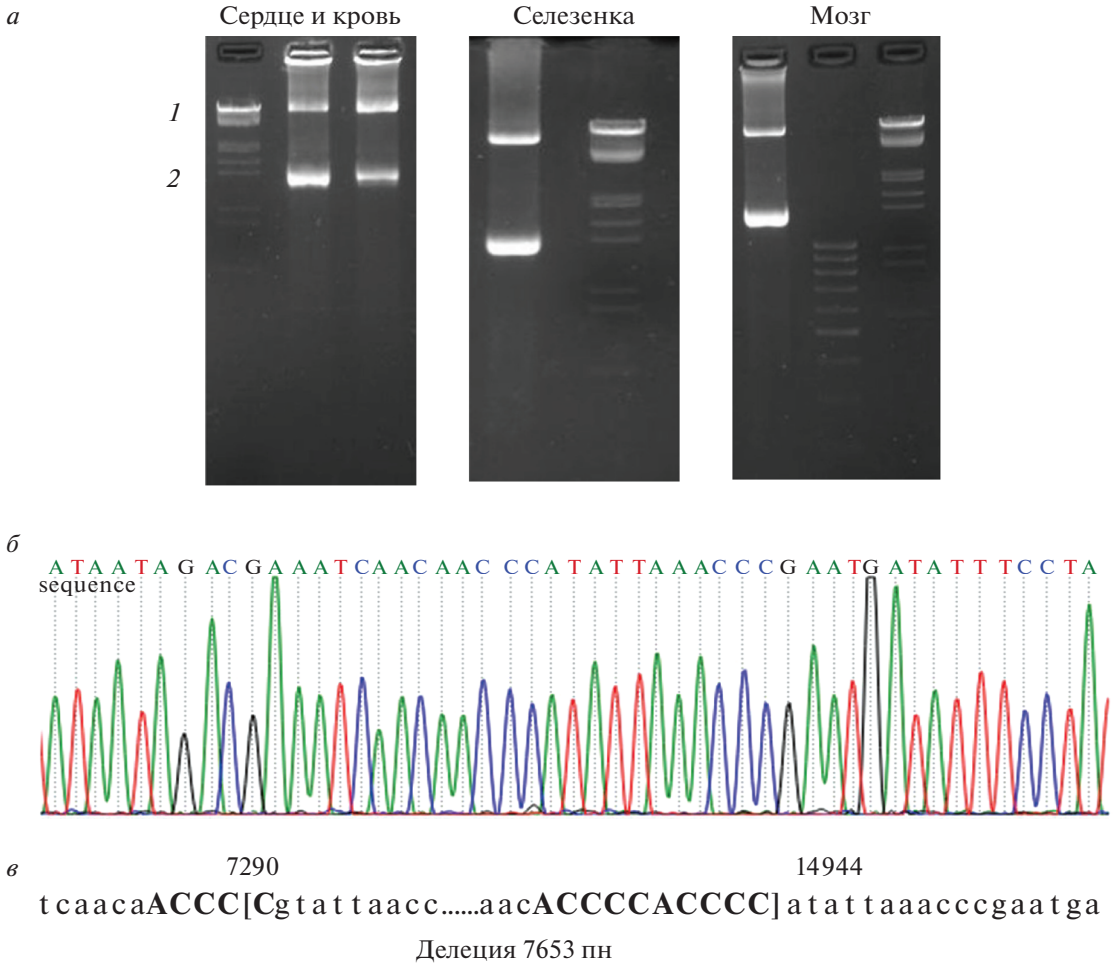

Рис. 1. Делеция мтДНК 7653 пн. *а* – электрофореграммы продуктов ПЦР образцов мтДНК из клеток головного мозга, селезенки, сердца и периферической крови. Дополнительный фрагмент ≈1300 пн (*2*); наряду с полноразмерным 8999 пн (*1*) указывает, что часть копий мтДНК содержит делецию. Маркеры: λ DNA/EcoRI + HindIII и 50 bp DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Литва). *б* – фрагмент хроматограммы продукта ПЦР ≈1300 пн из образцов мтДНК клеток сердца. Для работы с нуклеотидной последовательностью использовалась программа Unipro UGENE (http://ugene.net/ru) [21]. *в* – локализация точек разрывов делеции и повторяющиеся последовательности (выделены жирным шрифтом и прописными буквами). *г* – фрагменты последовательности мтДНК *Mus musculus* (NC_005089.1).

В данной работе описана новая одиночная делеция в митохондриальной ДНК мыши линии BALB/c. Она была обнаружена случайно, при подборе пар праймеров.

В работе использовались образцы общей ДНК, ранее использованные в работе [15]. Они были получены из тканей головного мозга (полушария), селезенки, сердца и клеток периферической крови двухмесячного самца мыши линии BALB/c (питомник экспериментальных животных Филиала Института биоорганической химии РАН, Пущино). Животное входило в контрольную группу. ДНК выделялась стандартным методом с использованием фенола и хлороформа, хранилась под спиртом при –20°C, перед использованием растворялась в ТЕ-буфере (10 мМ трис-HCl, 1 мМ Na_2EDTA, pH 8.0).

Фрагмент митохондриального генома 8999 пн амплифицировался с комбинацией праймеров F 5'-CTT GGT CTA CAA GAC GCC ACA-3' и R 5'-TAG GTG ATT GGG TTT TGC GGA CTA-3'.

Синтез праймеров был произведен ООО “Синтол” (Россия). Реакция амплификации состояла из 30 циклов и проводилась в условиях: денатурация при 94°C в течение 30 с, отжиг и элонгация при 68°C 8 мин. Предварительная денатурация при 94°C – 4 мин, завершающий синтез – 10 мин при 72°C.

Реакционная смесь ПЦР (общий объем 25 мкл) содержала: 75 мМ трис-HCl, pH 8.8, 20 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 2.5 мМ $MgCl_2$, 200 мкМ каждого dNTP, 250 нМ каждого праймера, 0.01%-ный Твин 20, 100 нг общей ДНК и 0.5 единицы суммарной смеси полимераз Taq-Pfu (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Литва) в соотношении 16 : 1. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-м агарозном геле с бромистым этидием (0.5 мг/л). Полоски геля с ДНК очищались с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Секвенирование было выполнено ООО “Синтол” (Россия).

При амплификации фрагмента митохондриального генома размером 8999 пн на образце ДНК из клеток головного мозга мыши помимо фрагмента ожидаемой длины был получен дополнительный фрагмент ≈1300 пн. Такой же дополнительный фрагмент амплифицировался на образцах ДНК из клеток сердца, селезенки и периферической крови (рис. 1,*а*).

Прямое секвенирование этого фрагмента показало, что он является следствием делеции размером 7653 пн (удалена нуклеотидная последовательность с положения 7291 по положение 14943) (рис. 1,*б* и *в*). Как и большинство крупномасштабных делеций мтДНК, обнаруженная делеция находится между участками начала репликации легкой и тяжелой цепей [16] и приводит к утрате генов: *mt-Co2*, *mt-Co3*, *mt-Atp8*, *mt-Atp6*, *mt-Nd3*, *mt-Nd4l*, *mt-Nd4*, *mt-Nd5*, *mt-Nd6*, семи генов тРНК и частично *mt-Cytb*, которые имеют решающее значение для нормального функционирования системы окислительного фосфорилирования.

Рядом с точками разрывов расположен прямой повтор ACCCC. При образовании делеции повтор на 5'-конце сохраняется, а на 3'-конце теряется вместе с промежуточной последовательностью (рис. 1,*в*). Наличие прямого повтора позволяет отнести делецию к I классу [17].

По мнению авторов работы [18] распределение точек разрыва делеций в митохондриальном геноме млекопитающих не случайное. Преимущественно они сосредоточены внутри или вблизи областей мтДНК, содержащих прямые повторы или способных к образованию неканонических структур (шпилек, крестов) [16] или G-квадруплексов [19]. Такие области митохондриального генома рассматриваются как регионы, более подверженные разрушению механическим или химическим стрессом и более уязвимые для воздействия активных форм кислорода и свободных радикалов [16].

С помощью ресурса nBMST [20] был выполнен анализ нуклеотидных последовательностей рядом с точками разрывов делеции 7653 пн для поиска участков, способных к образованию неканонических структур. В пределах 40 пн таких участков выявлено не было.

Поскольку точки разрыва делеции не найдены ни в базе MitoBreak (http://mitobreak.portugene.com) [18], ни в каких-либо публикациях PubMed, можно заключить, что выявлена новая крупномасштабная делеция мтДНК мыши размером 7653 пн.

Работа частично выполнена на базе лаборатории радиационной молекулярной биологии ИТЭБ РАН и автор выражает благодарность сотрудникам данной лаборатории. Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00845-20-00.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome // Nature. 1981. V. 290. P. 457–465. https://doi.org/10.1038/290457a0
2. *Greaves L.C., Reeve A.K., Taylor R.W., Turnbull D.M.* Mitochondrial DNA and disease // J. Pathol. 2012. V. 226. P. 274–286. https://doi.org/10.1002/path.3028
3. *Schaefer A.M., McFarland R., Blakely E.L. et al.* Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults // Ann. Neurol. 2008. V. 63. P. 35–39. https://doi.org/10.1002/ana.21217
4. *Schaefer A.M., Taylor R.W., Turnbull D.M., Chinnery P.F.* The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1659. P. 115–120. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2004.09.005
5. *Cooper J.M., Mann V.M., Schapira A.H.* Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: Effect of ageing // J. Neurol. Sci. 1992. V. 113. P. 91–98. https://doi.org/10.1016/0022-510x(92)90270-u
6. *Ahmed N., Ronchi D., Comi G.P.* Genes and pathways involved in adult onset disorders featuring muscle mitochondrial DNA instability // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. P. 18054–18076. https://doi.org/10.3390/ijms160818054
7. *Schon E.A., DiMauro S., Hirano M.* Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. P. 878–890. https://doi.org/10.1038/nrg3275
8. *Chinnery P.F., DiMauro S., Shanske S. et al.* Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder //

Lancet. 2004. V. 364. P. 592–596.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16851-7

9. *Shoffner J.M., Lott M.T., Voljavec A.S. et al.* Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy // PNAS USA. 1989. V. 86. P. 7952–7956.
https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.7952
10. *Schon E.A., Rizzuto R., Moraes C.T. et al.* A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA // Science. 1989. V. 244. P. 346–349.
https://doi.org/10.1126/science.2711184
11. *Krishnan K.J., Reeve A.K., Samuels D.C. et al.* What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 275–279.
https://doi.org/10.1038/ng.f.94
12. *Oliveira M.T., Pontes C.B., Ciesielski G.L.* Roles of the mitochondrial replisome in mitochondrial DNA deletion formation // Genet. Mol. Biol. 2020. V. 43. (Suppl. 1). P. e20190069.
https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0069
13. *Persson Ö., Muthukumar Y., Basu S. et al.* Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 759–763.
https://doi.org/10.1038/s41467-019-08673-5
14. *Nissanka N., Minczuk M., Moraes C.T.* Mechanisms of mitochondrial DNA deletion formation // Trends in Genetics. 2019. V. 35. № 3. P. 235–244.
https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.01.001
15. *Антипова В.Н., Малахова Л.В., Безлепкин В.Г.* Выявление делеций митохондриальной ДНК в тканях мышей, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения // Биофизика. 2011. Т. 56. № 3. С. 439–445.
16. *Damas J., Carneiro J., Gonçalves J. et al.* Mitochondrial DNA deletions are associated with non-B DNA conformations // Nucl. Ac. Res. 2012. V. 40. P. 7606–7621.
https://doi.org/10.1093/nar/gks500
17. *Mita S., Rizzuto R., Moraes C.T. et al.* Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA // Nucl. Ac. Res. 1990. V. 18. P. 561–567.
https://doi.org/10.1093/nar/18.3.561
18. *Damas J., Carneiro J., Amorim A., Pereira F.* MitoBreak: The mitochondrial DNA breakpoints database // Nucl. Ac. Res. 2014. V. 42. (Database issue): D1261–1268.
https://doi.org/10.1093/nar/gkt982
19. *Dong D.W., Pereira F., Barrett S.P. et al.* Association of G-quadruplex forming sequences with human mtDNA deletion breakpoints // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 585–677.
https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-677
20. *Cer R.Z., Donohue D.E., Mudunuri U.S. et al.* Non-B DB v2.0: A database of predicted non-B DNA-forming motifs and its associated tools // Nucl. Ac. Res. 2013. V. 41. (Database issue): D94–D100.
https://doi.org/10.1093/nar/gks955
21. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091

A New Deletion of Mitochondrial DNA of a BALB/c mouse

V. N. Antipova*

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Pushchino, 142290 Russia
**e-mail: valery_a@rambler.ru*

A large deletion of mitochondrial DNA 7653 bp long has been identified in tissues of the brain, the spleen, the heart and peripheral blood of a BALB/c male mouse.

Keywords: mitochondrial DNA, deletion, mouse.