

ЯДЕРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОГЕНЕЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ ПРИ РЕНТГЕНОВСКОМ ОБЛУЧЕНИИ МЫШЕЙ

Губина Н.Е. *, Евдокимовский Э.В., Ушакова Т.Е.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.*

*Ответственный за переписку. Факс: +7 (4967)330-553 Телефон: +7 (4967)739-277

Электронный адрес: windhavenn@gmail.com

Резюме. Считается, что митохондрии произошли от симбиотических организмов, внедрившихся в эукариотическую клетку миллиарды лет назад. В ходе эволюции большая часть митохондриальных генов, в том числе все гены, ответственные за регуляцию процессов транскрипции и репликации митохондриальной ДНК (мтДНК), были перенесены в ядро. В настоящее время развиваются представления о роли отдельных ядерных генов в регуляции биогенеза мтДНК, однако неизвестно, как вся система регуляции реагирует на окислительный стресс и, в частности, на рентгеновское облучение.

Мы выделили из многокомпонентной системы регуляции одну каскадную цепь, состоящую из факторов, воспринимающих внешний сигнал (коактиватор *PGC-1 α* , корепрессор *RIP140*), ядерного респираторного фактора (*NRF2*) и факторов, непосредственно участвующих в процессах транскрипции и репликации мтДНК (*Polrmt*, *Tfam*, *Tfb2m*). В настоящей работе методом ПЦР в реальном времени измерено количество транскриптов указанных ядерных факторов в клетках печени в разные сроки после рентгеновского облучения мышей в дозе 10Гр. Обнаружено, что кинетика изменения транскриптов *Tfb2m* и *Polrmt* коррелирует с угнетением митохондриальной транскрипции, кинетика изменения уровня транскриптов *TFAM*, *NRF2*, *PGC-1 α* и *RIP140* – с инициацией репликации мтДНК. Различие в динамике экспрессии генов *Polrmt*, *Tfb2m* и *Tfam*, *NRF2*, *PGC-1 α* свидетельствует о возможности дифференциальной регуляции транскрипции и репликации мтДНК в условиях окислительного стресса в клетках печени мышей.

Возможно, ядерная регуляция функционирования митохондриального генома в радиорезистентных клетках в условиях облучения является частью защитного механизма,

направленного на уменьшение вероятности синтеза дефектных белков и обновление пула мтДНК.

Ключевые слова: мтДНК, мтРНК, регуляция экспрессии генов, рентгеновское облучение, печень, мышцы,

NUCLEAR REGULATION OF MITOCHONDRIAL DNA BIOGENESIS IN MOUSE LIVER FOLLOWING X-RAY IRRADIATION

Gubina N.E.*, Evdokimovsky E.V., Ushakova T.E.

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS
Institutskaya Street, 3, 142290 Pushchino, Moscow region, Russia*

*Corresponding author. Fax: +7 (4967)330-553 Phone: +7 (4967)739-277

E-mail address: windhavenn@gmail.com

Abstract. It is widely believed now that mitochondria are the remnants of symbiotic organisms which have entered the eukaryotic cell about two billion years ago. In the course of the evolution most of mitochondrial genes, including all the genes regulating mitochondrial transcription and replication machinery, has been transferred into nucleus. By this moment great advances have been achieved in understanding the role of individual nuclear genes in the regulation of mitochondrial biogenesis. However, it is still unknown, how the whole system responds to the oxidative stress, in particular, X-ray irradiation.

We have focused our investigation on a regulatory cascade chain composed of two factors, recognizing external signals (nuclear coactivator *PGC-1 α* , nuclear corepressor *RIP140*), nuclear respiratory factor *NRF2* and three components of mitochondrial transcription and replication machinery (*Polrmt*, *Tfam*, *Tfb2m*). Using quantitative real-time PCR we have estimated transcription levels of all these factors in mouse liver at different time points following X-ray irradiation at the dose of 10 Gy. Reduction in transcription levels of *Polrmt* and *Tfb2m* correlates with inhibition of mtDNA transcription, and dynamics of *Tfam*, *NRF2*, *PGC-1 α* and *RIP140* transcription levels is connected to initiation of mtDNA replication. The divergence in the dynamics of expression of *Polrmt*, *Tfb2m* and *Tfam*, *NRF2*, *PGC-1 α* suggests that in the mouse liver under oxidative stress mtDNA transcription and replication may be regulated differentially. Probably, in radioresistant cells nuclear regulation of mitochondrial genome

functions under irradiation represents an element of defense mechanism preventing synthesis of defect proteins and purifying the mtDNA pool from mutant copies.

Keywords: mtDNA, mtRNA, regulation of gene expression, X-ray irradiation, liver, mice

Введение.

Митохондрии – это эукариотические органеллы, в которых осуществляется синтез АТФ. Считается, что митохондрии произошли от микроорганизмов, родственных альфа-протеобактериям, которые внедрились в эукариотическую клетку около 2 миллиардов лет назад [1]. Изначально геном этих организмов включал в себя десятки тысяч генов, однако в ходе эволюции большая часть митохондриальных генов мигрировала в ядро [2]. На современном этапе эволюции митохондриальная ДНК млекопитающих представлена ковалентно замкнутой двуцепочечной молекулой, размером около 16000 пар оснований, и содержит 37 генов, кодирующих 13 ключевых белков электронно-транспортной цепи (ЭТЦ), 2 рРНК (12S и 16S РНК) и 22 тРНК [3].

мтДНК располагается в матриксе митохондрий, в непосредственной близости к внутренней митохондриальной мембране [4]. Это обстоятельство приводит к тому, что даже в условиях нормы мтДНК подвергается атакам активных форм кислорода (АФК), которые образуются в качестве побочных продуктов деятельности ЭТЦ. Нарушение функционирования ЭТЦ, приводящее к повышению фона АФК, считается основой многих так называемых «митохондриальных патологий» [5, 6]. Механизм развития этих патологий может быть связан как с нарушением структуры генетического материала самих митохондрий (делеции, модификации нуклеотидов, одно- и двунитевые разрывы нуклеиновых кислот), так и с изменением ядерной регуляции процессов репликации и транскрипции мтДНК. В последние годы внимание исследователей было сконцентрировано на генетических нарушениях, вызывающих митохондриальные патологии, однако особенности ядерной регуляции биогенеза митохондрий в условиях окислительного стресса остались практически не изученными.

В настоящее время широко обсуждается так называемая «транскрипционная парадигма биогенеза митохондрий», согласно которой транскрипция и репликация мтДНК контролируются многоуровневой системой ядерных факторов [7]. На первом уровне этой системы находятся ядерные респираторные факторы *NRF1* (nuclear respiratory factor) и *NRF2* (у мыши – *GABP*, GA-binding protein). Это ДНК-связывающие белки из группы

ядерных рецепторов, действующие как активаторы транскрипции [8]. Сайты связывания для *NRF1* и *NRF2* обнаружены в промоторах ядерных генов, кодирующих респираторные субъединицы, факторы транскрипции и репликации мтДНК (*Tfam*, *Tfb1m* и *Tfb2m*, митохондриальная РНК-полимераза), РНК-компонент РНКазы Р [9, 10]. Кроме того, *NRF1* и *NRF2* регулируют транскрипцию генов, кодирующих ферменты биосинтеза гема, рибосомные белки митохондрий, тРНК-синтетазы и компоненты системы транспорта белков в митохондрии [11]. Предполагается, что таким образом ядерные респираторные факторы осуществляют координацию синтеза митохондриальных и ядерных субъединиц ЭТЦ [7].

Ядерные респираторные факторы экспрессируются в клетках на постоянном уровне, необходимом для поддержания гомеостаза митохондрий. Однако их активность может модулироваться посредством корегуляторов транскрипции – коактиваторов и корепрессоров [8]. К коактиваторам ядерных респираторных факторов относятся факторы семейства *PGC*: *PGC-1 α* , *PGC-1 β* и *PRC*. *PGC-1 α* (PPAR- γ -coactivator-1- α , Peroxisome-proliferation-activated receptor- $\{\gamma\}$ Coactivator-1 $\{\alpha\}$) считается главным положительным регулятором митохондриальных функций. Этот белок связывается с ядерными респираторными факторами *NRF1* и *NRF2*, что значительно повышает их способность активировать транскрипцию генов-мишеней [12]. Предполагается, что коактиватор *PGC-1 α* экспрессируется во всех тканях, однако его действие наиболее изучено в клетках бурого жира при индукции адаптивного термогенеза [13]; в клетках печени – при голодании [14]; в мышечных волокнах – в ответ на упражнения [15] и в ходе дифференциации миобластов [16]. Деятельность этого фактора проявляется на уровне целого организма: *PGC-1 α* управляет суточными ритмами метаболических процессов, в частности, ритмами дыхательной активности митохондрий [17].

Основным корепрессором ядерных респираторных факторов, а значит, и митохондриального биогенеза, является *RIP140* – receptor-interacting protein – массой 140 кДа [18]. Данный белок широко распространен в тканях млекопитающих как антагонист факторов семейства *PGC*, однако в некоторых тканях высокий уровень его экспрессии имеет принципиальное значение. Так, в клетках белой жировой ткани *RIP140* обеспечивает аккумуляцию жиров в виде триацилглицеридов [19], в клетках скелетной мышцы – уменьшение массы митохондрий и формирование «быстрых», гликолитических волокон [20]. Показано, что *RIP140* блокирует области, находящиеся рядом с консервативными сайтами связывания ядерных рецепторов и ядерных респираторных факторов [20, 21]. В настоящее время механизм взаимодействия коактиватора *PGC-1 α* и

корепрессора *RIP140* не известен, однако предполагается, что регуляция активации/репрессии биогенеза митохондрий осуществляется за счет изменения количественного соотношения этих факторов [22].

Минимальный необходимый аппарат транскрипции мтДНК представлен митохондриальной РНК-полимеразой, транскрипционными факторами *mtTFA* (*Tfam*), *Tfb1m* и/или *Tfb2m* для инициации и фактором *mTERF* – для терминации транскрипции. Митохондриальная РНК-полимераза (*Polrmt*) млекопитающих – это белок массой около 120 кДа, гомологичный РНК-полимеразам дрожжей и бактериофагов [23]. В отсутствие транскрипционных факторов мтРНК-полимераза проявляет либо низкую, либо неспецифическую активность. Ключевым фактором инициации транскрипции мтДНК млекопитающих считается белок *Tfam* (масса 24 кДа), который специфически связывается с мтДНК, изгибает и расплетает ее [24]. *Tfb1m* и *Tfb2m* взаимодействуют с С-концевым доменом *Tfam* и необходимы для узнавания мтРНК-полимеразой промоторного участка [25]. Наконец, терминацию транскрипции митохондриальной ДНК осуществляет белок массой 34 кДа, называемый *mTERF*, который специфически связывается с *Polrmt* и переносит ее с сайта терминации на сайт инициации транскрипции мтДНК [26].

Таким образом, функционирование генетического аппарата митохондрий находится под контролем сложной многоуровневой системы ядерных генов. В данной работе из этой системы выделена одна каскадная цепь регуляции, состоящая из факторов, воспринимающих физиологический сигнал (коактиватор *PGC-1α*, корепрессор *RIP140*), ядерного респираторного фактора *NRF2* и трех генов-мишеней, продукты экспрессии которых непосредственно участвуют в процессах транскрипции и репликации мтДНК (*Polrmt*, *Tfam*, *Tfb2m*) (рис. 1). Целью настоящей работы является исследование регуляции транскрипции и репликации мтДНК указанными факторами в клетках печени при рентгеновском облучении мышей в дозе 10 Гр.

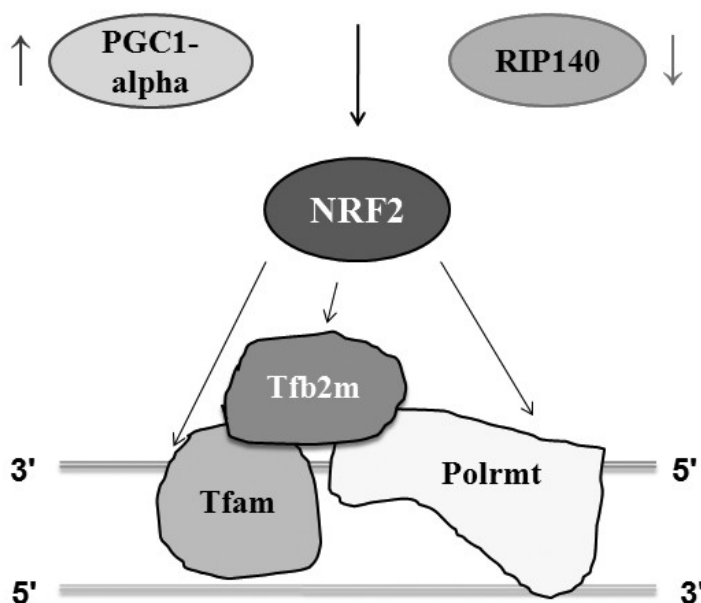


Рис. 1. Исследуемые ядерные гены, участвующие в транскрипции мтДНК и регуляции этого процесса.

Polrmt – митохондриальная ДНК-зависимая РНК-полимераза. *Tfam*, *Tfb2m* – факторы инициации транскрипции мтДНК. *NRF2* – ядерный респираторный фактор. *PGC-1α* – ядерный коактиватор факторов биогенеза митохондрий. *RIP140* – ядерный корепрессор факторов биогенеза митохондрий.

Материалы и методы исследования

Лабораторные животные и облучение.

В настоящем исследовании использовали двухнедельных самцов мышей линии Balb/c из питомника экспериментальных животных Института Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН (г. Пущино), по 10 животных на каждую экспериментальную точку.

Облучение мышей в дозе 10 Гр проводили однократно, на установке РУТ-250-15-1 (рентгеновская установка терапевтическая с подвижным лучом), мощность облучения - 2 Гр/мин. После облучения мыши содержались в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Через определенные сроки после облучения (1 час, 5 часов, 24 часа, 72 часа) мышей умерщвляли методом смещения шейного позвонка, извлекали печень, промывали холодным физиологическим раствором и использовали в эксперименте.

Выделение ДНК

Тотальную ДНК выделяли методом фенольно-хлороформного разделения с последующим осаждением в спирте; осадок ДНК растворяли в буфере TE (10 mM trisHCl, pH8.0, 1mM EDTA).

Выделение РНК и синтез первой цепи кДНК

Выделение тотальной РНК осуществляли методом фенольно-хлороформного разделения с использованием гуанидин тиоцианата [27]. Перед проведением обратной транскрипции проводили обработку препаратов РНК ДНКазой I (Силекс, Россия). После инкубации с ферментом (30 минут, 37°C) ДНКазу I инактивировали нагреванием в течение 5 минут при 65°C. Чистоту препаратов РНК (отсутствие ДНК) контролировали с помощью метода ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными для ядерных генов.

Синтез кДНК проводили с помощью RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit по методике, указанной производителем (Fermentas™, USA). В качестве праймеров использовали oligo-d(T)₁₈. Полученные препараты одноцепочечной кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени. ПЦР всех исследованных генов проводились на одном препарате кДНК для каждой мыши.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Количество копий кДНК определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием прибора 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) и олигонуклеотидных проб TaqMan (Синтол, Россия). Амплификация кДНК исследуемых генов и кДНК референсного гена *Actb* проводилась независимо (в отдельных пробирках).

Состав инкубационной смеси ПЦР-РВ: 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0,25 mM dNTPs, 2,5 mM Mg²⁺, 250 nM каждого праймера и зонда, 1,5 ед. Taq-полимеразы (Fermentas™, USA), 2 мкл раствора кДНК либо ДНК в качестве матрицы. Пробу прогревали в течение 10 минут при 95°C, затем проводили 45 циклов амплификации фрагментов генов и кДНК по программе: 95° - 15 с, 62° - 1 мин. Репортерную флуоресценцию считывали на этапе элонгации при температуре 62°.

Праймеры и зонды для амплификации кДНК генов *Polrmt*, *Tfam*, *Tfb2m*, *NRF2*, *PGC-1α*, *RIP140* и *Actb* представлены в табл.1. Праймеры подбирали с помощью программы Primer Express 2.0 таким образом, чтобы амплифицируемый фрагмент располагался рядом с 3'-концом мРНК.

Табл. 1. Последовательности праймеров и зондов для ПЦР-РВ.

Название праймера	Последовательность 5-3	Длина ампликона
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	
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	GTGTACCTTCTTCGTTTGGGAAA	73
PGC1 Rev	TCA GAG GCC ATG CTA GTG AAA G	
PGC1 Probe	FAM - TCAGCTCTCGCAGAAGCAGTGTTCCA - BHQ1	
RIP140 For	CAGTACTCCCGCTTCCAAGCT	66
RIP140 Rev	TTG CCT TTC GTG AGG TCC AT	
RIP140 Probe	FAM - ACGAACACCGCGCCTAGCCACC - BHQ1	

Определение количества копий кДНК исследуемых генов и референсного гена *Actb* производили с помощью калибровочного графика на основе порядковых разведений тотальной ДНК. Исходная концентрация ДНК (мкг/мкл) определялась методом спектрофотометрии, масса ДНК в мкг переводилась в количество копий на основе зависимости молекулярного веса от размера ДНК. Все вычисления производились с помощью программы 7300 Real-Time PCR System Software (Applied Biosystems, USA).

По современным представлениям, для большей достоверности при нормализации получаемых результатов рекомендуется использовать несколько референсных генов [28]. Мы провели сравнение пострадиационной динамики изменения количества транскриптов двух ядерных конститутивных однокопийных генов – *Actb* (бета-актин, компонент цитоскелета клетки) и *Gapdh* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). Обнаружено, что их соотношение практически не меняется в течение всего времени после облучения (данные не представлены), что позволяет использовать любой из этих генов для

нормализации результатов. В настоящей работе все данные по транскрипции представлены в виде количества транскриптов исследуемого гена в пересчете на 1000 копий мРНК гена *Actb*.

Результаты исследования.

Процесс транскрипции мтДНК осуществляется в митохондриях, но находится под контролем ядерного генома. Ранее нами было показано, что в условиях повышенного содержания активных форм кислорода и свободных радикалов – при облучении мышей в дозе 10 Гр – в четырех тканях (головной мозг, печень, скелетная мышца, селезенка) происходит резкое падение уровня транскрипции мтДНК. Параллельно с падением транскрипции митохондриальных генов наблюдалась индукция репликации мтДНК. Тот факт, что количество копий мтДНК не снижалось ниже контрольного уровня ни в одной из исследованных тканей, означает, что недостаток матрицы для осуществления синтеза мтРНК не может быть причиной ингибирования митохондриальной транскрипции [29, 30].

В настоящей работе проведено исследование транскрипции шести ядерных генов: *Polrmt*, *Tfam* и *Tfb2m* (минимальный аппарат транскрипции мтДНК [31]) и *NRF2*, *PGC-1 α* и *RIP140* (гены, контролирующие экспрессию факторов *Polrmt*, *Tfam* и *Tfb2m*) – в клетках печени облученных мышей.

Облучение мышей в летальной дозе 10Гр вызывает изменение количества транскриптов всех исследованных ядерных генов – *Polrmt*, *Tfam*, *Tfb2m*, *NRF2*, *PGC-1 α* , *RIP140*. Динамика этих изменений, несмотря на участие факторов в одном транскрипционном каскаде, неоднотипна. На протяжении всего времени после облучения снижено количество транскриптов генов *Polrmt* и *Tfb2m* (рис. 2).

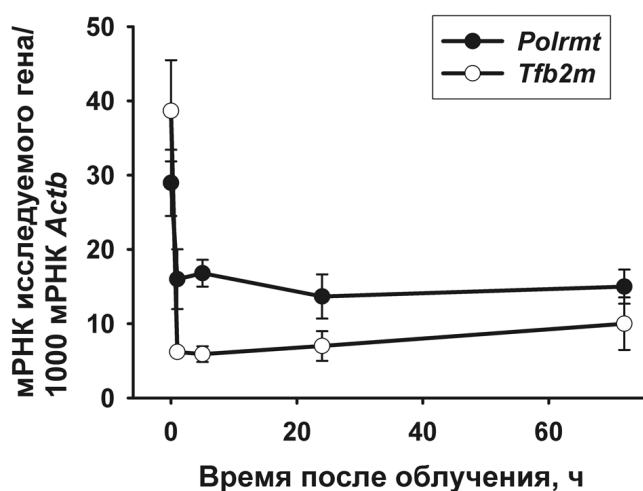


Рис. 2. Изменение транскрипции генов *Polrmt* и *Tfb2m* в клетках печени после рентгеновского облучения мышей в дозе 10 Гр.

Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов исследуемых генов в пересчете на 1000 копий мРНК гена *Actb*.

Количество транскриптов *Tfam* и *NRF2*, также как и количество транскриптов генов *Polrmt* и *Tfb2m*, снижается приблизительно в два раза через час после облучения мышей, однако уже через 5 часов наблюдается возвращение уровня транскрипции к контрольным значениям и сохранение его в течение последующих трех суток (рис.3).

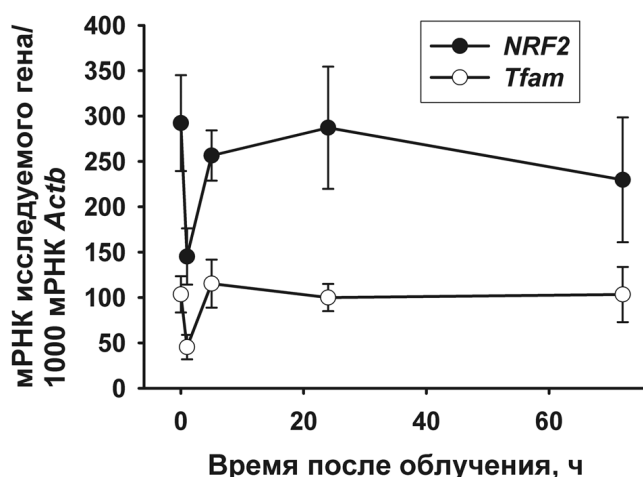


Рис. 3. Изменение транскрипции генов *NRF2* и *Tfam* в клетках печени после рентгеновского облучения мышей в дозе 10 Гр.

Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов исследуемых генов в пересчете на 1000 копий мРНК гена *Actb*.

Совершенно противоположная картина наблюдается в динамике количества транскриптов *RIP140* и *PGC-1α*: в отличие от предыдущих генов, происходит активация транскрипции как гена *RIP140* (возрастает на порядок через пять часов после облучения, рис. 4), так и гена *PGC-1α* (количество транскриптов увеличено в 4 раза через сутки после облучения, рис. 5).

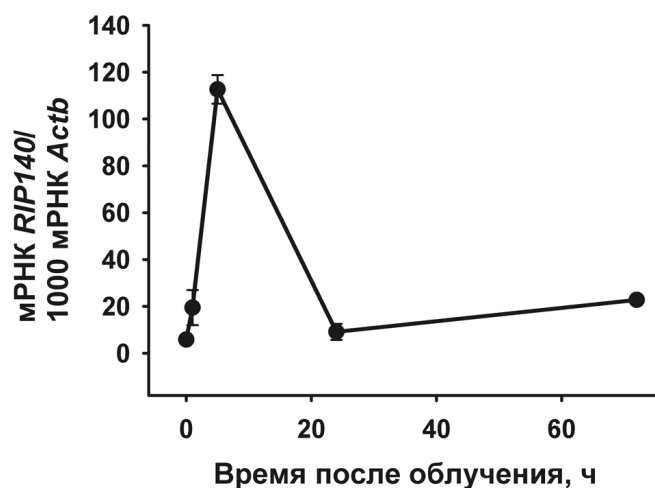


Рис. 4. Изменение транскрипции гена *RIP140* в клетках печени после рентгеновского облучения мышей в дозе 10 Гр.

Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов гена *RIP140* в пересчете на 1000 копий мРНК гена *Actb*.

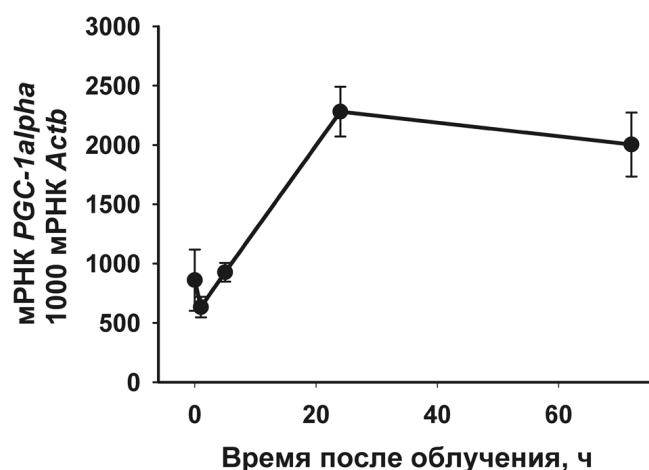


Рис. 5. Изменение транскрипции гена *PGC-1α* в клетках печени после рентгеновского облучения мышей в дозе 10 Гр.

Ось абсцисс – время после облучения, ч. Ось ординат – количество транскриптов гена *PGC-1α* в пересчете на 1000 копий мРНК гена *Actb*.

Обсуждение результатов.

Митохондриальный генетический аппарат млекопитающих представляет собой в значительной степени урезанный вариант по сравнению с геномом своих бактериальных предшественников. В процессе эволюции большая часть митохондриальных генов мигрировала в ядро, и в настоящее время, несмотря на то, что процессы экспрессии и

репликации мтДНК осуществляются в матриксе митохондрий [3], управление данными процессами осуществляется под контролем каскада ядерных генов [7, 22].

Мы исследовали одну регуляторную цепь из этого каскада, которая состоит из факторов, участвующих в транскрипции мтДНК (*Polrmt* – митохондриальная ДНК-зависимая РНК-полимераза, *Tfam* и *Tfb2m* – факторы инициации транскрипции мтДНК) [8], активаторов их экспрессии — *NRF2* и *PGC-1α*, и антагониста этих белков, корепрессора *RIP140* (рис. 1).

На примере клеток печени мышей мы попытались выяснить, как функционирует эта регуляторная система при действии рентгеновского облучения. Печень обладает относительно гомогенным клеточным составом — приблизительно 80% популяции клеток представлено гепатоцитами — что позволяет интерпретировать результаты как реакцию клеток на облучение, без учета специфических ответов разных клеточных популяций. Более того, даже при действии летальных доз (5-10 Гр) клеточный состав органа не меняется, поскольку не реализуется программируемая клеточная гибель гепатоцитов [32].

Ранее нами было показано, что в условиях окислительного стресса, инициированного тотальным рентгеновским облучением мышей, происходит необратимое снижение количества транскриптов четырех митохондриальных генов (*ND2*, *ND4*, *CytB*, *ATP6*) в клетках печени, так же как и в клетках головной мозга, скелетной мышцы и селезенки [29, 30]. Тот факт, что эти гены расположены в разных участках полицистрона мтДНК, позволяет говорить о падении транскрипции мтДНК в целом. Пострадиационное снижение транскрипции в митохондриях невозможно объяснить дефицитом матрицы мтДНК, поскольку в те же самые сроки происходит увеличение копииности мтДНК [29, 30]. Мы высказали предположение о том, что наблюдаемые эффекты связаны с нарушением ядерной регуляции процессов транскрипции и репликации мтДНК.

В настоящей работе показано, что в клетках печени происходит активация транскрипции генов *RIP140* (первые часы после облучения) и *PGC-1α* (через сутки после облучения), что может означать, что аппарат транскрипции клетки в целом не нарушен. Более того, после облучения сохраняется антагонистическое взаимодействие этих факторов: снижение количества транскриптов *RIP140* сопровождается активацией транскрипции гена *PGC-1α*, что находится в соответствии с современными представлениями о способе регуляции биогенеза митохондрий этими факторами [22].

В рамках этих представлений активация экспрессии гена *RIP140* в первые часы после облучения должна приводить к снижению транскрипции всех генов рассматриваемого каскада. Однако мы наблюдаем падение транскрипции всего двух генов участвующих в

процессе транскрипции — *Polrmt* и *Tfb2m*, при этом динамика их изменения полностью совпадает с динамикой пострадиационного изменения митохондриальной транскрипции, в то время как транскрипция еще двух исследованных нами генов *NRF2* и *Tfam* лишь незначительно снижается в первые часы после облучения и возвращается потом к контрольному уровню. На первый взгляд полученные результаты опровергают существование данного каскада регуляции.

Однако известно, что в митохондриях процессы транскрипции и репликации тесно связаны. В частности, процесс репликации Н-цепи мтДНК начинается с синтеза коротких транскриптов L-цепи, которые используются в качестве праймеров для репликации [33]. Несмотря на то, что промоторы для транскрипции мтДНК расположены как на Н-, так и на L-цепи, известно, что сродство минимального комплекса транскрипции, состоящего из факторов транскрипции *Tfam*, *Tfb2m* и РНК-полимеразы *Polrmt* выше к промотору L-цепи, чем к промотору Н-цепи [34]. При снижении количества транскриптов генов *Polrmt* и *Tfb2m* количество полноценных комплексов инициации транскрипции также будет снижаться, и можно предположить, что в условиях дефицита этих комплексов будет возникать конкуренция со стороны промоторов за связывание с ними. Очевидно, что таких условиях, преимущественное связывание будет осуществляться с промотором, сродство к которому выше, то есть с промотором L-цепи. Преимущественное связывание с этим промотором будет способствовать активации репликации и снижению транскрипции исследованных нами генов тяжелой цепи мтДНК (*ND2*, *ND4*, *Cytb*, *ATP6*), что и демонстрируют полученные нами результаты [29, 30]. Через сутки после облучения уровень экспрессии гена *RIP140* падает до исходного, увеличивается экспрессия гена *PGC-1α*, что на фоне продолжающегося ингибирования факторов транскрипции *Tfb2m* и *Polrmt* приводит к инициации репликации мтДНК [29, 30].

Тот факт, что именно *Polrmt* и *Tfb2m*, а не *Tfam*, являются лимитирующими факторами в регуляции транскрипции, может объясняться тем, что *Tfam*, помимо участия в транскрипции мтДНК, играет важную роль в поддержании структуры мтДНК, и количество его белка по данным разных авторов составляет от 50 [35] до 900 молекул в пересчете на одну копию мтДНК [36]. Как следует из рис. 123, в клетках печени даже в условиях нормы количество транскриптов *Polrmt* (29 ± 5) и *Tfb2m* (39 ± 7) в три раза меньше, чем *Tfam* (103 ± 20).

На основании этих данных можно сделать вывод о том, в клетках печени мышей в условиях окислительного стресса, вызванного рентгеновским облучением в дозе 10 Гр, наблюдается дифференциальная экспрессия ядерных факторов, необходимых для

функционирования генетического аппарата митохондрий. Подобные результаты — снижение транскрипции мтДНК и инициация ее репликации на фоне повышения количества транскриптов *PGC-1α*, *NRF1*, *NRF2*, *Poly*, *mtSSB* и *Tfam* — были получены ранее на клетках печени и сердечной мышцы мышей при внутривенном введении бактериальных липополисахаридов [37, 38].

Таким образом, система регуляции транскрипции и репликации мтДНК представляется более сложной, чем линейные транскрипционные каскады.

Полученные нами результаты полностью подтверждают предположение о том, что в условиях окислительного стресса снижение транскрипции и активация репликации мтДНК происходят не вследствие нарушений, а являются частью защитного механизма клетки, направленного на снижение вероятности синтеза дефектных белков и обновление пула мтДНК.

Литература

1. Lang B.F., Gray M.W., Burger G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 1999, 33:351–397.
2. Martin W., Herrmann R.G. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* 1998, 118:9-17.
3. Bibb M.J., Van Etten R.A., Wright C.T., Walberg M.W, Clayton D.A. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 1981, 26:167-180.
4. Bogenhagen D.F. Biochemical isolation of mtDNA nucleoids from animal cells. *Methods Mol Biol* 2009, 554:3-14.
5. Wallace D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer. *Annu Rev Genet* 2005, 39:259-407.
6. Schleicher E., Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int Suppl* 2007, 106:17-26.
7. Scarpulla R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 2008, 88:611–638.
8. Gleyzer N., Vercauteren K., Scarpulla R.C. Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators. *Mol Cell Biol* 2005, 25:1354–1366.
9. Virbasius J.V., Scarpulla R.C. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and

mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:1309-1313.

10. Ongwijitwat S., Wong-Riley M.T. Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons? *Gene* 2005, 360:65-77.

11. Scarpulla R.C. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell Biochem* 2006, 97:673-683.

12. Mootha V.K., Handschin C., Arlow D., Xie X., St. Pierre J., Sihag S., Yang W., Altshuler D., Puigserver P., Patterson N., Willy P.J., Schulman I.G., Heyman R.A., Lander E.S., Spiegelman B.M. Erralpha and Gabpa/b specify PGC 1alphadependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:6570-6575.

13. Puigserver P., Wu Z., Park C.W., Graves R., Wright M., Spiegelman B.M. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998, 92:829-39.

14. Handschin C., Lin J., Rhee J., Peyer A.K., Chin S., Wu P.H., Meyer U.A., Spiegelman B.M. Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell* 2005, 122:505-515.

15. Baar K., Wende A.R., Jones T.E., Marison M., Nolte L.A., Chen M., Kelly D.P., Holloszy J.O. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J* 2002, 16:1879-1886.

16. Lin J., Wu H., Tarr P.T., Zhang C.Y., Wu Z., Boss O., Michael L.F., Puigserver P., Isotani E., Olson, E.N. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002, 418:797-801.

17. Liu C., Li S., Liu T., Borjigin J., Lin, J.D. Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* 2007, 447:477-481.

18. Cavailles V., Dauvois S., L'Horset F., Lopez G., Hoare S., Kushner P.J., Parker M.G. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* 1995, 14:3741-3751.

19. Leonardsson G., Steel J.H., Christian M., Pocock V., Milligan S., Bell J., So P.W., Medina-Gomez G., Vidal-Puig A., White R., Parker M.G. Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:8437-8442.

20. Seth A., Steel J.H., Nichol D., Pocock V., Kumaran M.K., Fritah A., Mobberley M., Ryder T.A., Rowleson A., Scott J., Poutanen M., White R., and Parker M. The Transcriptional

Corepressor RIP140 Regulates Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle. *Cell Metab* 2007, 6: 236–245.

21. Christian M., Kiskinis E., Debevec D., Leonardsson G., White R., Parker M.G. RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Biol* 2005, 25:9383–9391.

22. Lin J.D. Minireview: The PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. *Mol Endocrinol* 2009, 23:2-10.

23. Tiranti V., Savoia A., Forti F., Dapolito M.F., Centra M., Rocchi M., Zeviani M. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* 1997, 6:615–625.

24. Fisher R.P., Clayton, D.A. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 1988, 8:3496–3509.

25. Falkenberg M., Gaspari M., Rantanen A., Trifunovic A. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* 2002, 31:289–294.

26. Martinez-Azorin F. The mitochondrial ribomotor hypothesis. *IUBMB Life* 2005, 57: 27-30.

27. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156–159.

28. Vandesompele J., Kubista M., Pfaffl M.V. Reference gene validation software for improved normalization. In: Logan J., Edwards K., Saunders N.; editors. *Real-Time PCR: current technology and applications*. London: Caister Academic Press; 2009. p. 47-64.

29. Губина Н.Е., Мерекина О.С., Ушакова Т.Е. Исследование транскрипции митохондриальной ДНК в клетках печени, скелетной мышцы и головного мозга после рентгеновского облучения мышей в дозе 10Гр. *Биохимия* 2010, 75:878-886.

30. Губина Н.Е., Евдокимовский Э.В., Ушакова Т.Е. Функционирование генетического аппарата митохондрий в клетках селезенки мышей в условиях индуцированного радиацией апоптоза. *Молекулярная биология* 2010, 44:1027-1035.

31. Litonin D., Sologub M., Shi Y., Savkina M., Anikin M., Falkenberg M., Gustafsson C.M., Temiakov D. Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *J Biol Chem* 2010, 285:18129-18133.

32. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных. Москва: Высшая школа, 2004.

33. Lee D.Y., Clayton D.A. Properties of a primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *J Biol Chem* 1996, 271:24262–24269.
34. Shutt T.E., Lodeiro M.F., Cotney J., Cameron C.E., Shadel G.S. Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:12133-12138.
35. Cotney J., Wang Z., Shadel G.S. Relative abundance of the human mitochondrial transcription system and distinct roles for h-mtTFB1 and h-mtTFB2 in mitochondrial biogenesis and gene expression. *Nuc Acids Res* 2007, 35:4042-4054.
36. Alam T.I., Kanki T., Muta T., Ukaji K., Abe Y., Nakayama H., Takio K., Hamasaki N., Kang D. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nuc Acids Res* 2003, 31:1640-1645.
37. Suliman H.B., Carraway M.S., Welty-Wolf K.E., Whorton A.R., Piantadosi C.A. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. *J Biol Chem* 2003, 278:41510–41518.
38. Suliman H.B., Welty-Wolf K.E., Carraway M.S., Tatro L, Piantadosi C.A. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc Res* 2004, 64:279-288.