

EWA BARTNIK

*Instytut Genetyki i Biotechnologii  
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
oraz Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa  
E-mail: ebartnik@igib.uw.edu.pl*

## LUZKI GENOM MITOCHONDRIALNY\*

W każdej komórce ludzkiej (z wyjątkiem erytrocytów) znajdują się mitochondria. W latach 60. ubiegłego wieku wykryto, że zawierają one swój własny DNA, który zsekwencjonowano na początku lat 80. ubiegłego wieku w laboratorium Francisa Sangera (który za techniki sekwencjonowania DNA otrzymał swoją drugą nagrodę Nobla). Ustalono wiele faktów o mitochondriach, od ewidentnych, takich jak ich rola w procesie oddychania, poprzez dość nieoczekiwane, takie jak stwierdzenie, że mutacje w tym genomie są odpowiedzialne za wiele chorób ludzkich, zazwyczaj dających najsilniejsze objawy w komórkach mięśniowych lub nerwowych.

Mitochondria dziedziczone są tylko od matki. Między genomami mitochondrialnymi (które w przeciętnej komórce somatycznej występują w około 5 kopiach na mitochondrium, przy kilkuset mitochondriach na komórkę) rekombinacja, o ile zachodzi, jest na poziomie na tyle niskim, że możemy traktować wszystkich potomków jednej matki jako jednorodną grupę. Oczywiście to nie jest do końca prawdziwe, bo DNA ulega mutacjom, i to z większą szybkością niż genom jądrowy. Wynika to z kilku przyczyn. Po pierwsze, DNA mitochondrialny jest położony blisko głównego źródła wolnych rodników – łańcucha oddechowego, poza tym jest pozbawiony histonów i nie ma pełnej gamy systemów naprawczych dostępnej w jądrze. Gdy wszystkie cząsteczki DNA w danej komórce są takie same, określane to jest jako homo-

plazmia, jeśli są obecne np. DNA zmutowane i niezmutowane jest to heteroplazmia (WALLACE 2005).

Wiadomo też, że w czasie powstawania gamet żeńskich, w którymś momencie w czasie rozwoju komórki jajowej, obecnych jest w niej niewiele mitochondriów – może około 20, choć to są dane dla myszy, nie dla ludzi – a następnie dzielą się one dochodząc do około 100000. Stadium „wąskiego gardła” z niewielką liczbą mitochondriów jest postrzegane jako etap selekcji mitochondriów aktywnych oddechowem, choć jest to pewne uproszczenie, ponieważ u kobiet cierpiących na choroby mitochondrialne produkowane są między innymi komórki jajowe zawierające nieomal całkowicie zmutowany DNA. Przy okazji warto dodać, że u większości osób mających choroby mitochondrialne DNA w mitochondriach jest mieszaniną normalnego i zmutowanego.

W latach 80. ubiegłego wieku Alan Wilson i jego współpracownicy (CANN i współaut. 1987) przebadali DNA kilkudziesięciu osób z różnych stron świata. Wówczas nie sekwencjonowano jeszcze zazwyczaj całych genomów mitochondrialnych, praca ta opiera się na analizie polimorfizmów miejsc restrykcyjnych w genomie mitochondrialnym. Największą różnorodność mitochondrialnego DNA znaleziono w Afryce; drzewa sporządzone na podstawie tych wyników (i potwierdzone wielokrotnie przez późniejsze badania) wskazały na wspólnego przodka (a raczej może na wspólną pramatkę) żyjącą w

\*Praca została wykonana w ramach funkcjonowania Polskiej Sieci Mitochondrialnej MitoNet.pl

Afryce około 180000 lat temu (CANN i współpracownicy 1987; WALLACE 1995, 2005). Oczywiście nie była to jedyna wówczas żyjąca kobieta (stąd nazwa „Ewa” może nie jest do końca uzasadniona), ale tylko jej mitochondria były przekazywane z córki na córkę przez wiele pokoleń aż do czasów współczesnych; inne mitochondrialne DNA pochodzące od kobiet żyjących w czasach „Ewy” nie dotrwały do dzisiaj.

Genom mitochondrialny wydaje się być idealny do badań ewolucji. Jest mały (16658 par zasad u człowieka), nie ulega rekombinacji lub ulega jej na bardzo niskim poziomie, dostępne są sekwencje nie tylko ludzkich mitochondrialnych DNA, ale także sekwencje szympansa, goryla i innych ssaków, które pozwalają na ustalenie momentów rozłączenia się dróg poszczególnych gatunków. Ponieważ występuje w wielu kopiach we wszystkich komórkach, daje się go pozyskać z materiałów muzealnych i kopalnych łatwiej, niż DNA jądrowy.

Obecnie różne warianty mitochondrialnego DNA są poklasyfikowane na grupy o wspólnym pochodzeniu i zbliżonych sekwencjach, tzw. haplogrupy. W Afryce występują cztery główne haplogrupy – L0, L1, L2 i L3. Poza Afryką rozprzestrzeniły się tylko dwie haplogrupy M i N, pochodzące z L3. W Europie z N powstały haplogrupy H, T, U, V, W, X, I, J i K, w Azji z M i N powstały odpowiednio haplogrupy C, D i G oraz A, B i F. Analiza rozmieszczenia poszczególnych haplogrup na świecie pozwoliła na prześledzenie migracji ludzi oryginalnie wychodzących z Afryki i zasiedlających całą naszą planetę (WALLACE 1995, 2005).

W genomie mitochondrialnym człowieka, który wielkością jest zbliżony do niewielkiego genu jądrowego, zapisana jest informacja o syntezie 22 tRNA, 2 rRNA i 13 polipeptydów wchodzących w skład łańcucha oddechowego (patrz artykuł GOLIKA w tym zeszycie KOSMOSU). Polipeptydy te znajdują się w czterech z pięciu kompleksów łańcucha oddechowego, jedynie kompleks II jest złożony z białek kodowanych wyłącznie przez genom jądrowy, w którym zakodowanych jest też około 1000 innych białek obecnych w mitochondriach. Koewolucja genomu mitochondrialnego i jądrowego jest zagadnieniem fascynującym, ale jeszcze słabo poznany (patrz artykuł GOLIKA w tym zeszycie KOSMOSU). Sama natomiast ewolucja genomu mitochondrialnego stanowi obiekt badań wielu grup, na coraz bardziej interesującym

poziomie, ponieważ obecnie w bazach danych (mtDB) dostępnych jest ponad 2000 sekwencji ludzkiego mitochondrialnego DNA z całego świata (INGMAN i GYLLENSTEN 2006) i baza ta jest ciągle aktualizowana.

W badaniu szybkości zmian mitochondrialnego DNA bardzo często porównuje się szybkość podstawień synonimicznych w porównaniu z podstawieniami niesynonimicznymi. Zakłada się, że w każdym punkcie genomu mutacje mogą zachodzić z równym prawdopodobieństwem. To czy pozostaną czy zostaną wyeliminowane zależy od tego, jaki będą miały wpływ na fenotyp. Ponieważ dla genów kodujących białka na fenotyp wpływa białkowy produkt, uważa się, że jeśli mutacja powoduje zmianę kodonu dla danego aminokwasu na inny kodon dla dokładnie tego samego aminokwasu (czyli mutacja synonimiczna) nie będzie miała wpływu na fenotyp. Jeśli mutacja spowoduje, że kodowany będzie inny niż oryginalny aminokwas, wówczas powstające białko będzie inne (mutacja niesynonimiczna). Mutacja taka może być szkodliwa i wówczas osobnik z taką mutacją będzie eliminowany, lub może być korzystna, wówczas mutacja ma szansę się utrwalić.

Warto tu może dodać, że w ostatnich latach w stosunku do genów kodowanych jądrowo znaleziono kilka wyjątków od braku efektów mutacji synonimicznych. Mutacje takie mogą powodować zmianę wykorzystywanego tRNA, co z kolei może wpływać na tempo syntezy białka (nie wszystkie tRNA dla danej grupy kodonów aminokwasu występują w komórce na tym samym poziomie), a tempo syntezy może wpływać na konformację białka. Także niewinne z pozoru mutacje synonimiczne mogą wpływać zarówno na splicing (co może zmieniać sekwencję białka), jak i na konformację mRNA. Konformacja mRNA może z kolei wpływać na proces translacji (PARMLEY i HURST 2007). Na szczęście w mitochondriach tego typu efekty raczej nie występują – 22 tRNA odpowiada za odczytywanie 20 kodonów aminokwasów, więc dla olbrzymiej większości aminokwasów (z wyjątkiem seryny i leucyny) istnieje tylko jedna cząsteczka tRNA. Nie ma też intronów, i w zasadzie praktycznie mRNA nie mają części nie ulegających translacji. W mitochondriach ludzkich istnieje jeden obszar niekodujący, o długości około 1100 par zasad, tzw. pętla D, w której znajdują się miejsca inicjacji transkrypcji obu nici i początek replikacji jednej z nich. Reszta genomu mitochondrialnego jest ściśle upakowana,

prawie wszystkie geny są na jednej nici, na drugiej jest tylko zakodowane jedno białko i 8 tRNA. Teoretycznie więc w genach kodujących białka (a jest ich 13) można porównywać podstawienia synonimiczne w stosunku do niesynonimicznych a w obszarze niekodującym pętli D badać częstość zmian w poszczególnych miejscach. Jeśli zmian niesynonimicznych jest mało, zachodzi najprawdopodobniej selekcja oczyszczająca. Jeśli jest ich dużo może to świadczyć o pozytywnej selekcji w danym genie.

Wallace i jego współpracownicy (MISHMAR i współaut. 2003) określili stosunki zmian niesynonimicznych do synonimicznych dla genów 13 białek kodowanych w mitochondrialnym DNA na dużej próbie sekwencji 1125 genomów mitochondrialnych. Okazało się, że częstość zmian w jednej z kodowanych mitochondrialnie podjednostek ATPazy (gen ATP6) nie jest stała w różnych strefach geograficznych. W obszarach zimnych gen był bardzo zmienny, za to był silnie konserwowany w obszarach tropikalnych, natomiast odwrotne efekty stwierdzono dla genu cyt. B. Stwierdzono i inne zależne od strefy klimatycznej zmiany, co doprowadziło do postawienia hipotezy, że mutacje tego typu stanowią przystosowanie do różnych klimatów. Ta hipoteza, omówiona obszernie przez WALLACE'A (2005) nie jest potwierdzana we wszystkich badaniach sekwencji mitochondrialnego DNA i obecnie toczą się dyskusje nad tym, czy metodologia badań, klasyfikacja haplogrup itp. są prawidłowe. Jednak uzyskiwane wyniki są bardzo ciekawe. Na przykład MOILANEN i współaut. (2003) wykazali, że różnice w częstości podstawień niesynonimicznych w stosunku do synonimicznych są różne zarówno dla różnych genów, jak i haplogrup. Stwierdzili na przykład, że w jednej z haplogrup europejskich, J, jeden z genów podjednostek kompleksu I, ND5, był praktycznie pozbawiony jakichkolwiek mutacji niesynonimicznych, choć nie stwierdzono tego dla innych haplogrup. Wiele badań stwierdza także, że pętla D jest bardzo interesującym obszarem – niektóre nukleotydy wydają się nie mutować, w innych miejscach mutacje zachodzą często (HOWELL i współaut. 2007).

Oprócz badań nad ewolucją, które są bardzo liczne i nie wszystkie dają wyniki zgodne z hipotezą Wallace'a o wpływie klimatu na ewolucję genomu mitochondrialnego (HOWELL i współaut. 2007, SUN i współaut. 2007), zainteresowanie budzi ustalenie, na co tak naprawdę wpływa posiadanie danej haplogrupy. Badania asocjacji haplogrup mitochon-

drialnych ze starzeniem, nowotworami i poszczególnymi chorobami (choroba Alzheimera, Parkinsona, schizofrenia) czy zjawiskami (ruchliwość plemników) zajmują sporą część współczesnej literatury dotyczącej mitochondriów i są w wielu przypadkach trudne do interpretacji. Często wynika to ze zbyt małej liczebności badanych prób (TOŃSKA i współaut. 2009). Fakt, że wyniki często nie są powtarzalne dla innych populacji niż pierwotnie badana przypomina sytuację z szukaniem genów odpowiedzialnych za ludzkie choroby wieloczynnikowe. Należy pamiętać, że mitochondria nie są niezależnymi organellami i że często zupełnie nie rozumiemy interakcji jądro-mitochondrium-środowisko. Dla jednej z najczęstszych chorób mitochondrialnych, choroby Lebera, mimo wieloletnich badań nie rozumiemy, dlaczego trzy znane mutacje mitochondrialne w podjednostkach kompleksu I, odpowiedzialne za ponad 90% przypadków tej choroby, są warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym wystąpienia tej choroby, dlaczego najłagodniejsza z tych trzech mutacji występuje prawie zawsze w haplogrupie J, i dlaczego kobiety o wiele rzadziej od mężczyzn tracą wzrok przy posiadaniu takiego samego poziomu mutacji (WALLACE 2005).

W nowotworach bardzo często występują mutacje w mitochondrialnym DNA. Są one bardzo różnorodne i na ogół prace polegają na porównywaniu zdrowej i rakowej tkanki u danej grupy pacjentów. Pewne mutacje stwierdza się częściej, pewne rzadziej dla danej grupy nowotworów, ale choć miano nadzieję, że będą one stanowić markery rozwoju tej choroby, lub że uda się ustalić zwiększone czy zmniejszone ryzyko dla pewnych haplogrup, w dziedzinie tej – podobnie jak dla wielu badań dotyczących mitochondriów – jest bardzo wiele prac i stosunkowo mało ciekawych pomysłów. Najciekawszy pochodzi znowu od Wallace'a – po kompilacji wszystkich opublikowanych do 2006 r. mutacji mitochondrialnego DNA w nowotworach doszedł do wniosku, że te mutacje są w olbrzymiej większości tymi samymi, które występowały w czasie normalnej ewolucji genomu mitochondrialnego (BRANDON i współaut. 2006).

Mitochondria są fascynującym obiektem badań, a ich ewolucja, rola, zmienność mitochondrialnego DNA i wpływ zmian w mitochondrialnym DNA na nasze zdrowie będzie na pewno jeszcze przez wiele lat dostarczać wielu ciekawych informacji.

## THE HUMAN MITOCHONDRIAL GENOME

## Summary

The human mitochondrial genome is a small 16.5 kb circular double-stranded DNA molecule containing 37 genes. Mutations in this DNA can lead to various diseases, and the mitochondrial DNA (mtDNA) genome which is maternally inherited has been very often used in studies on human evolution. Mitochondria of all humans appear to originate from

one woman who lived in Africa about 180000 years ago. Various parts of the mtDNA may not evolve at the same rate, and the different mitochondrial DNA haplogroups may not be totally functionally equivalent, raising questions as to the involvement of mitochondria in various human diseases and the process of aging.

## LITERATURA

- BRANDON M., BALDI P., WALLACE D. C., 2006. *Mitochondrial mutations in cancer*. *Oncogene* 25, 4647-4662.
- CANN R. L., STONEKING M., WILSON A. C., 1987. *Mitochondrial DNA and human evolution*. *Nature* 325: 31-36.
- HOWELL, N., ELSON J. E., HOWELL C., TURNBULL D. M. 2007. *Relative rates of evolution in the coding and control regions of African mtDNAs*. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2213-2221.
- INGMAN, M., GYLLENSTEN U., 2006. *mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences*. *Nucleic Acids Res.* 34 (Database issue): D749-51.
- MISHMAR D., RUIZ-PESINI E. F., GOLIK P., MACAULAY V., CLARK A. G. i współaut., 2003. *Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 171-176.
- MOILANEN J. S., FINNILA S., MAJAMAA K. 2003. *Lineage-specific deletion in human mtDNA: lack of polymorphisms in a segment of MTND5 gene in haplogroup J*. *Mol. Biol. Evol.* 20, 2132-2142.
- PARMLEY J. L., HURST L. D., 2007. *How do synonymous mutations affect fitness?* *BioEssays* 29, 515-519.
- SUN C., KONG Q.p., ZHANG Y. P., 2007. *The role of climate in human mitochondrial DNA evolution: a reappraisal*. *Genomics* 89, 338-342.
- TOŃSKA K., SOLYGA A., BARTNIK E. 2009. *Mitochondria and aging: innocent bystanders or guilty parties?* *J. Appl. Genet.* 50, 55-62.
- WALLACE D. C., 1995. *Mitochondrial DNA in human evolution, degenerative disease, and aging*. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 201-203.
- WALLACE D. C., 2005. *A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine*. *Annu. Rev Genet* 39, 359-407.