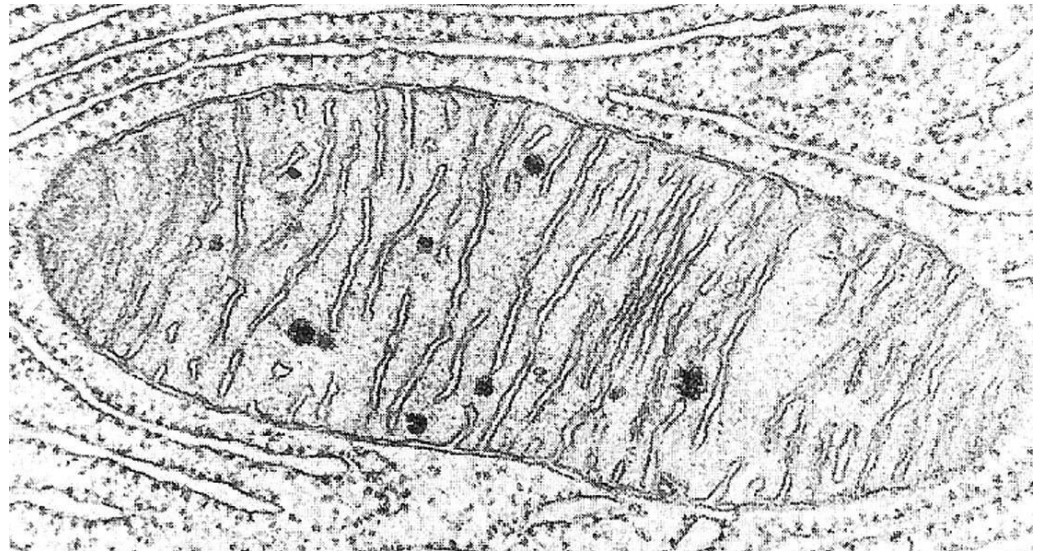


Особенности организации и функционирования митогенома. Гетерогенность внутриклеточной популяции митохондрий.

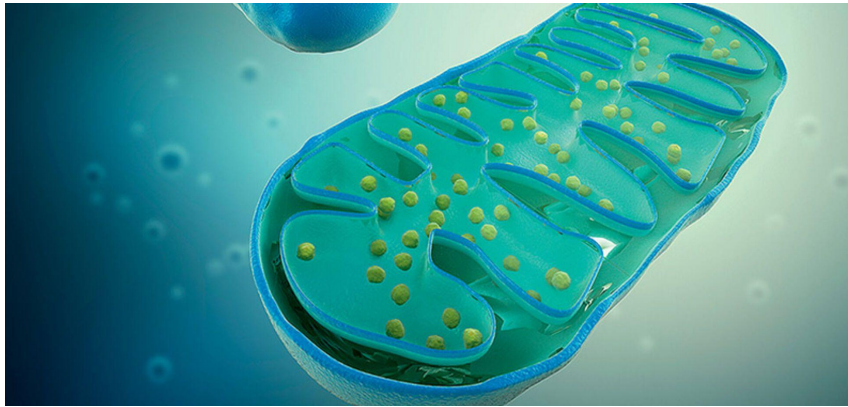
Выполнил студент 215 группы
лечебного факультета: Байгабилов
Дамир

Введение

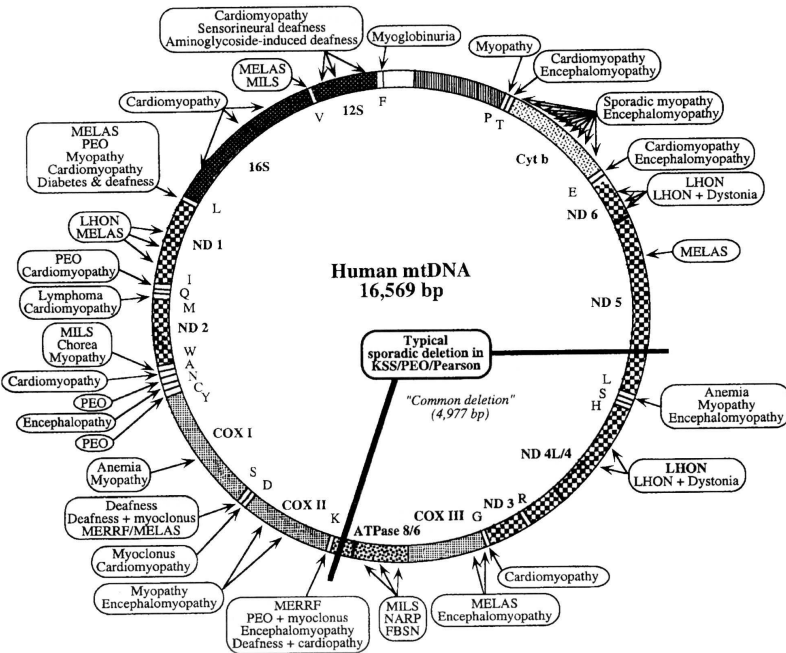
Цитоплазматические органеллы, осуществляющие биоэнергетические процессы в клетках растений и животных, были открыты в 1841 году; в 1900 году они получили название митохондрии.



- Митохондрии, присутствуют у большинства животных клеток (исключение составляют лишь эритроциты крови). Митохондрии являются наиболее распространенным видом бактерий в организме человека; их происхождение связывают с альфа-протеобактериями родов *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*. В клетках взрослого человека, как полагают, присутствует до 10^{15-17} митохондрий. Присутствие собственной ДНК у этих органелл было установлено лишь в 60-х годах прошлого века.

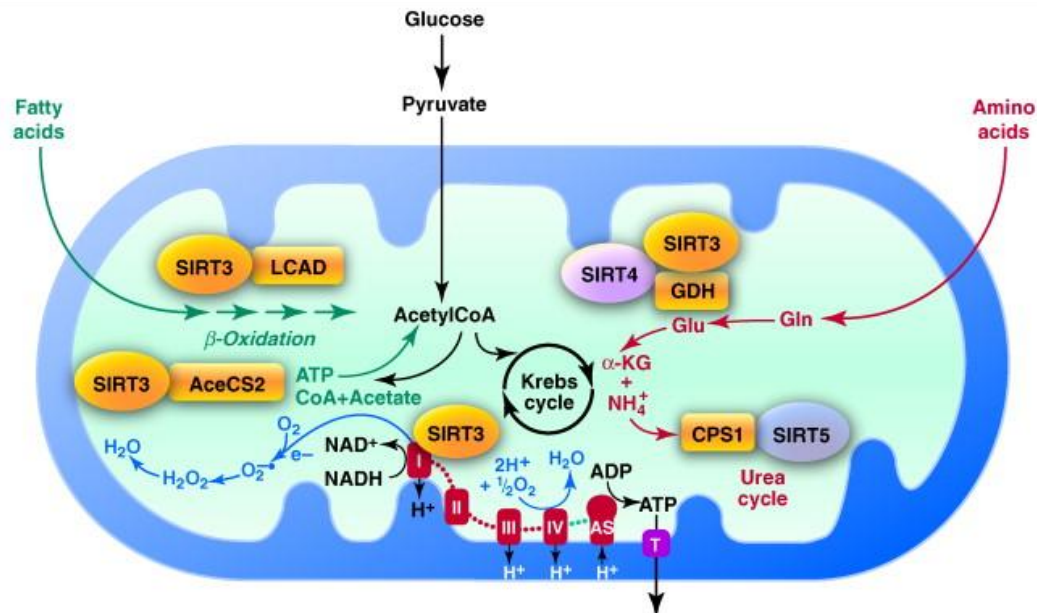


Генетика митохондрий



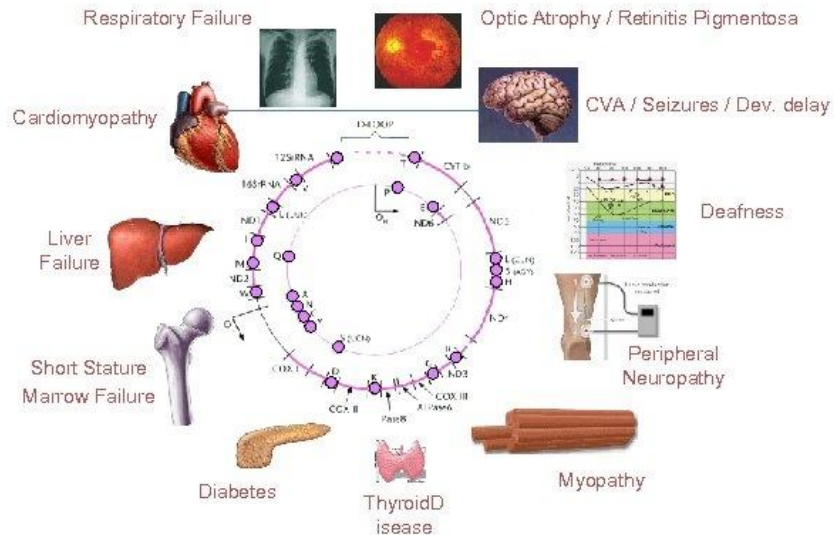
- Митохондриальный геном включает 1000-2000 клеточных ядерных генов, кодирующий наиболее важные гены, связанные с биоэнергетикой клеток. Собственный митохондриальный циркулярный геном (*нуклеоид*), способен частично транскрибироваться независимо от клеточного ядра. Размер митохондриального генома меньше 1% всей клеточной ДНК и включает в себя примерно 1000 нуклеотидов. МтДНК не содержит интроны и кодирует 37 генов, в том числе, ответственные за синтез 13 полипептидов, участвующих в транспортной цепи синтеза энергии. Для трансляции собственных белков митохондрии синтезируют две рибосомальные и 22 транспортные РНК.

- Ядерные и митохондриальные гены совместно участвуют в процессах транскрипции, трансляции белков и в дыхании. В мтДНК обнаружены также гены (*SIRT1* и *SIRT3*), ответственные за эпигенетические модификации ДНК и гистонов в эукариотических и прокариотических клетках. У митохондрий выявлено более 1500 различных белков, которые различаются от тканевой принадлежности клеток.
- Большинство белков (около 90%) кодируются митохондриальными генами, локализованными в ядерной ДНК. Лишь небольшое количество этих белков несут каталитическую функцию; две трети этих белков контролируют неизвестные функции митохондрий. В митохондриях могут присутствовать белки, проникающие в эти органеллы из цитоплазмы клеток хозяина, что увеличивает размеры митохондриального протеома.



- Наличие мутаций в мтДНК было обнаружено в 1988 году. Наследственные или приобретенные мутации в мтДНК (*точечные, делеции и вставки, как в гомо-, так и гетероплазмическом исполнении*) происходят в 100-1000 раз чаще, чем в ядерной ДНК. Большинство наследуемых нарушений в мтДНК происходит у детей младшего возраста; эти изменения позднее могут прогрессировать. Было выявлено, что у каждого из 5000 взрослых жителей Великобритании выявляются патологические мутации мтДНК. При исследовании пуповинной крови новорожденных оказалось, что каждый из двухсот обследованных имеет до 10 схожих патогенных мутаций в мтДНК. ДНК-полимераза митохондрий (*PolG*) полностью различается от ДНК-полимеразы клеточного ядра. Помимо *PolG*, в митохондриях могут присутствовать полимеразы (*PrimPol, PolB, PolZ, PolH, PolQ*) ядерного происхождения, участвующие в потенциальных репликационных и восстанавливающих механизмах.

Мутации в мтДНК и их фенотипические проявления

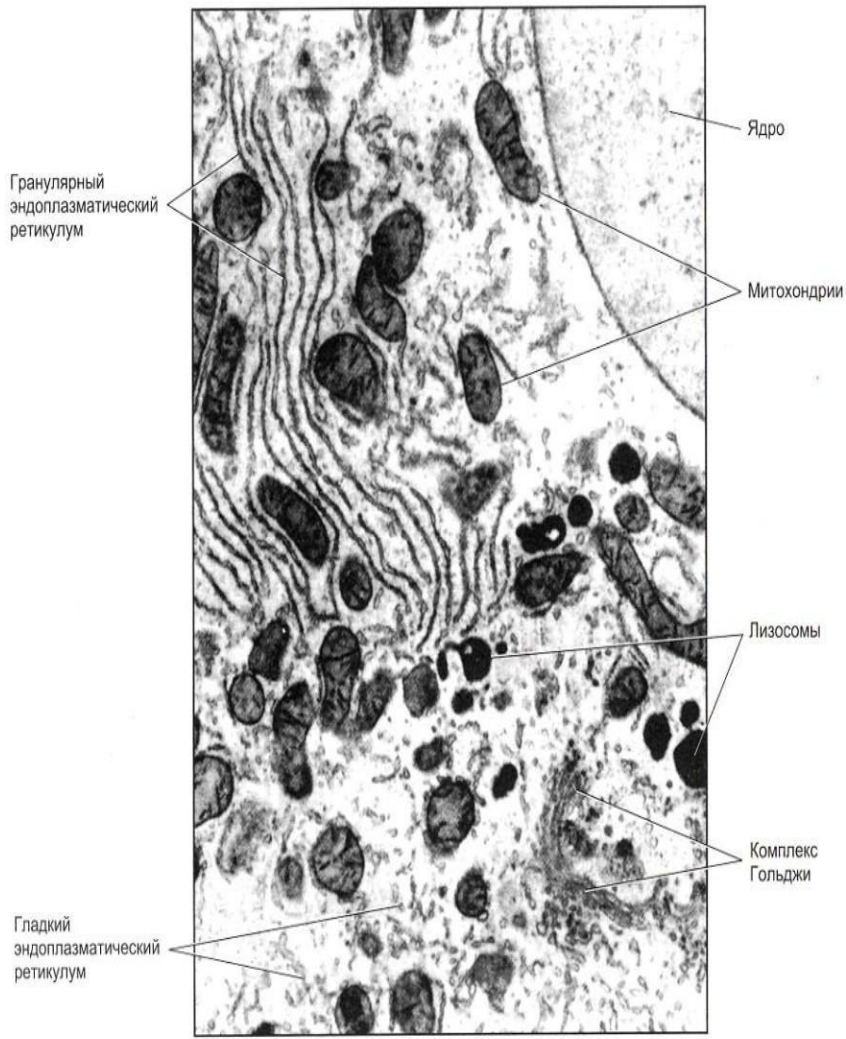


- 
- В формировании митохондриального генома будущего ребенка мтДНК отца не участвует. Все мутации и нарушения в митохондриях наследуются от матери. Подобная наследуемость мтДНК и высокий уровень мутаций митохондриальных генов способствовали аккумуляции генетических вариантов внутри определенных материнских линий (известные как гаплогруппы) в географически изолированных популяциях человека при древнейших миграциях женской половины человечества. Наследуемые матерью мутации возникают среди сотен и тысяч копий мтДНК внутри женских зародышевых клеток; каждая новая мутация приводит к смеси нормальных и мутантных мтДНК. Прото-ооциты и/или ооциты, несущие серьезные мутационные изменения в мтДНК, обычно селективно элиминируются до, вовремя или вскоре после фертилизации. В результате в клетках сохраняются единичные копии измененных митохондрий.

Гетерогенность внутриклеточной популяции митохондрий

- Митохондриальная популяция единичной клетки состоит из смеси митохондрий разнородной морфологии. Гетерогенность митохондриальной популяции в клетке может быть обусловлена этапами биогенеза этих органелл на разных стадиях развития организма или различием их метаболических функций, выполняемых в разных тканях. Значительные вариации морфологических отличий среди митохондрий в клетках разных тканей могут быть связаны с различными функциональными задачами этих клеток и являться одним из механизмов адаптации к особому метаболическому статусу клетки.





- Митохондрии растений, в отличие от митохондрий дрожжей и млекопитающих, не формируют непрерывную сеть, являются очень динамичными в отношении морфологии и движения внутри клетки.
- Изучение особенностей импорта ДНК в митохондриальные субпопуляции клеток растений позволяет провести не только более углубленное исследование механизма транспорта этих макромолекул в митохондрии, но и выявить взаимосвязь между выполнением отдельными митохондриями или их популяциями внутри клетки специализированных функций, связанных с продуцированием энергии, сигнализацией или индукцией апоптоза и их структурной организацией.

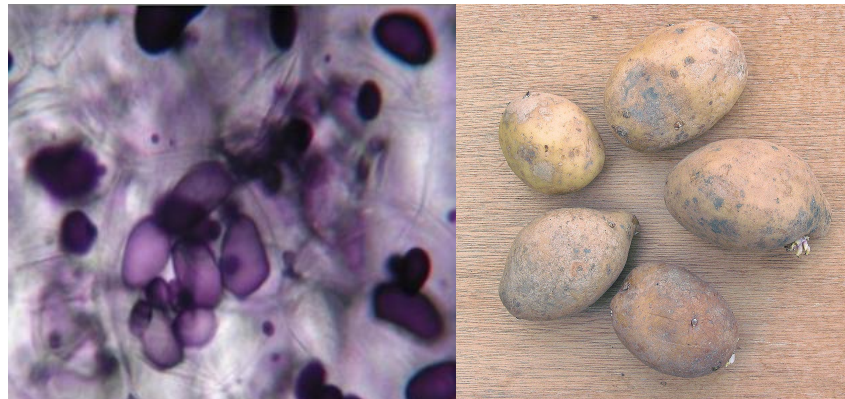
- Объектами исследования были митохондрии, изолированные из двух типов растительной тканей: прорастающей (*этиолированные 3х-дневные проростки кукурузы *Zea mays**) и запасающей (*корнеплоды репы *Brassica rapa* и клубни картофеля *Solanum tuberosum**). Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования с последующим разделением в линейном градиенте плотности сахарозы (0.3-1.2 М) – для кукурузы, или в ступенчатом градиенте плотности перколла – для репы и картофеля. Визуально в обоих типах градиентов можно было выделить 3 фракции.



Zea mays



Brassica rapa



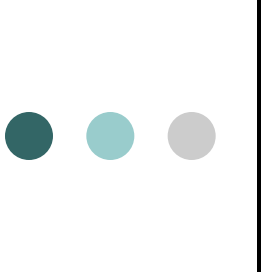
Solanum tuberosum



Данные

- - Фракция 1 локализовалась на уровне 0,3-0,4 М концентрации сахарозы или на границе между 18% и 21% плотности перколла.
- - Основная митохондриальная фракция (фракция 3) для кукурузы находилась на уровне градиента плотности, соответствующем 0,5-0,8 М сахарозы, для репы и картофеля-на границе между 21% и 45% перколла.
- - Фракцию 2 отбирали из слоя градиента сахарозы или перколла, находящегося непосредственно над фракцией 3.

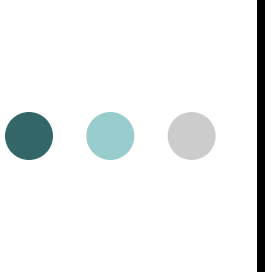
Отобранные митохондрии отмывали от избытка сахарозы или перколла и использовали для функциональных исследований.

- 
- 1) С помощью электрофореза в ПАА-геле в денатурирующих условиях были обнаружены незначительные отличия в белковых спектрах 1-й фракции в сравнении со спектрами 2-й и 3-й фракций.

В первой фракции митохондрий кукурузы и репы можно было отметить увеличение количества белка размером 80 кДа и изменение соотношения количества белков размером 100 и 110 кДа.

- 2) В кукурузе уровень дыхательной активности во всех трех митохондриальных фракциях был низким, коэффициент дыхательного контроля, показывающий сопряженность дыхания и фосфорилирования митохондрий, варьировал от 2 до 3. Для первой фракции («легких» митохондрий) был характерен более высокий уровень дыхательной активности, однако этот показатель фракции 1 был нестабильным.

В корнеплодах репы и клубнях картофеля наиболее высоким показателем дыхательной активности (около 4) обладали митохондрии фракций 2 и 3. Митохондрии фракции 1 характеризовались более низким уровнем дыхательной активности (около 2), или же, в ряде случаев, сопряжение дыхания и фосфорилирования в этой фракции вообще отсутствовало.

- 
- 3) Анализ активности дыхательных комплексов с помощью метода *BN-PAGE* показал, что 1-я митохондриальная фракция во всех трех исследованных растительных видах имела существенные различия в составе и функционировании мембранных комплексов по сравнению с комплексами фракций 2 и 3. У кукурузы и репы в 1-й фракции активность мембранных дыхательных комплексов была снижена (для комплексов I и II) или отсутствовала (для комплекса IV). Для митохондрий 1-й фракции картофеля характерно некоторое повышение активности комплекса I и снижение активности комплекса II в сравнении с двумя другими фракциями.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что популяция митохондрий, выделяемых из этиолированных проростков кукурузы, корнеплодов репы и клубней картофеля характеризуется структурной и функциональной неоднородностью. Фракция 1, по всей видимости, представляет собой незрелые митохондрии, в мембране которых комплексы дыхательной цепи еще только формируются и не функционируют в полной мере.

- С целью дальнейшей функциональной характеристики различных митохондриальных субпопуляций в клетке было проведено исследование эффективности импорта ДНК в митохондрии трех клеточных субпопуляций этих органелл. Анализ эффективности импорта методом количественной ПЦР показал, что в митохондриях 1-й фракции наблюдается существенно повышенный уровень поглощения ДНК (рис. 1). При этом повышенный уровень импорта ДНК в 1-ю фракцию не зависел ни от длины субстрата, ни от растительного источника митохондрий

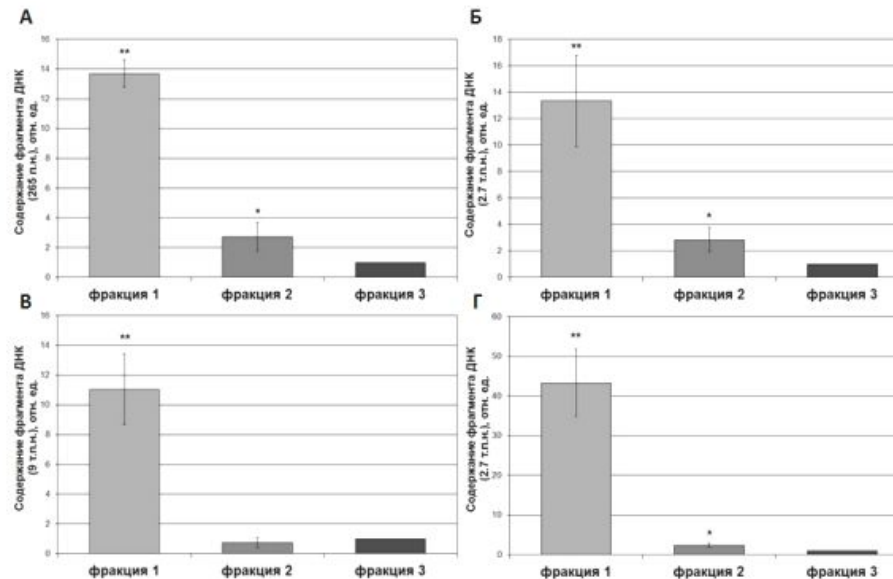


Рис. Анализ эффективности импорта ДНК разной длины в митохондриальные фракции различных видов растений методом количественной ПЦР *Z. mays* (А и Б), *S. tuberosum* (В) и *B. rapa* (Г).

- Следует отметить, что разница между уровнем импорта ДНК в 1-ю и 3-ю фракции митохондрий репы (в среднем в 43 раза) была существенно выше по сравнению с наблюдаемой для митохондрий кукурузы и картофеля (в 11-13 раз). Интенсивность импорта ДНК малой и средней длины в митохондрии 2-й фракции также был несколько выше (в 2-3 раза) по сравнению с импортом в митохондрии фракции 3 (для кукурузы и репы), импорт ДНК большой длины в митохондрии фракций 2 и 3 из картофеля оставался приблизительно на одном уровне

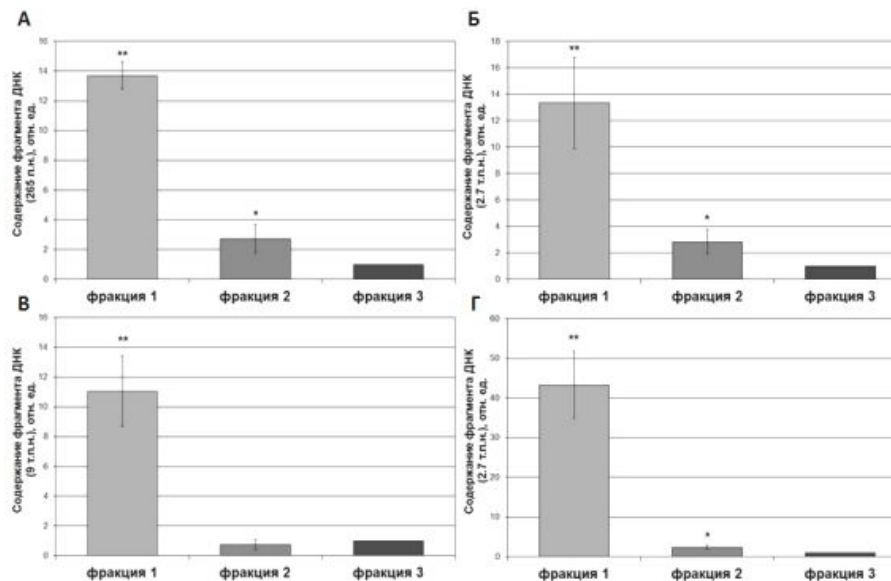
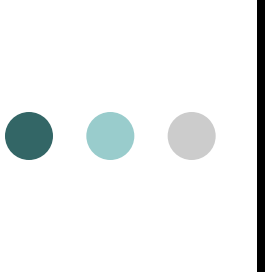


Рис. Анализ эффективности импорта ДНК разной длины в митохондриальные фракции различных видов растений методом количественной ПЦР *Z. mays* (А и Б), *S. tuberosum* (В) и *B. rapa* (Г).

- 
- Феномен различия в активности импорта ДНК в различные митохондриальные субпопуляции может быть обусловлен тем, что митохондрии 1-й фракции являясь «протомитохондриями», имеют отличающуюся от типичных, зрелых митохондрий структуру мембран с измененным составом и проводимостью транспортных каналов, либо могут содержать дополнительные клеточные факторы и сохранившиеся контактные сайты с мембранами других органелл, например, эндоплазматического ретикулума, способствующими формированию транспортных мембранных путей, осуществляющих транслокацию молекул ДНК.



Заключение

- Митохондрии — органеллы энергообеспечения метаболических процессов в клетке. ДНК митохондрий наследуются почти исключительно по материнской линии. Каждая митохондрия имеет несколько участков нуклеотидов в ДНК, идентичных во всех митохондриях (то есть в клетке много копий митохондриальных ДНК), что очень важно для митохондрий, неспособных восстанавливать ДНК от повреждений (наблюдается высокая частота мутаций). Мутации в митохондриальной ДНК являются причиной целого ряда наследственных заболеваний человека. Так же мы узнали, что митохондриальная популяция обладает большой разновидностью по морфологии



▣ Спасибо за внимание!