

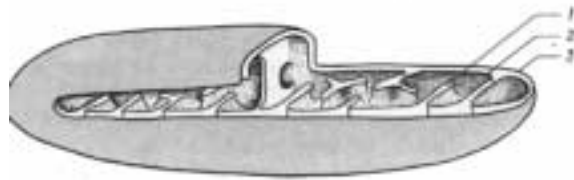
*Грошева Александра, 11 "Б"*

## ОРГАНИЗАЦИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

В задачи исследования входят нахождения закономерностей в организации генома различных организмов и эволюции митохондриального генома.

### МИТОХОНДРИЯ. ОБЩИЙ ПЛАН СТРОЕНИЯ.

Митохондрии – органоиды клетки, отвечающие за энергетический обмен (дыхание) в ней. Митохондрии ограничены двумя мембранами. Внешняя митохондриальная мембрана отделяет ее от гиалоплазмы. Обычно она имеет ровные контуры, не образует впячиваний или складок. Ее толщина около 7 нм, она не бывает связана ни с какими другими мембранами и замкнута сама на себе, так что представляет собой мембранный мешок. Внешнюю мембрану от внутренней отделяет межмембранное пространство шириной около 10-20 нм. Внутренняя мембрана ограничивает внутреннее содержимое митохондрии, ее матрикс или митоплазму. Характерной чертой внутренних мембран митохондрий является их способность образовывать многочисленные впячивания внутрь митохондрий. Такие впячивания чаще всего имеют вид плоских гребней, или крист. Кристы могут быть как пластинчатыми, так и трубчатыми – на основе морфологии митохондрий существует систематика некоторых организмов (напр. Грибов). В матриксе митохондрий иногда выявляются тонкие нити (2-3 нм) и гранулы (15-20 нм). Нити матрикса представляют собой молекулы ДНК, а гранулы – митохондриальные рибосомы.



Митохондрия. Общее строение.

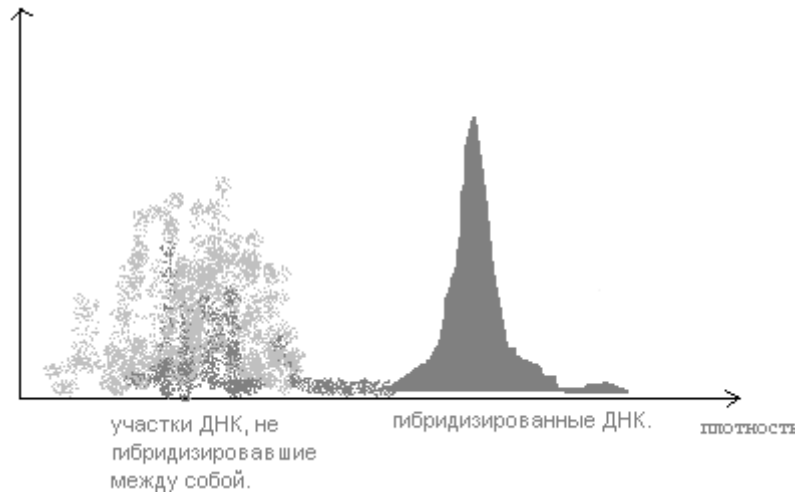
1- кристы; 2 – внутренняя мембрана; 3 – наружная мембрана.

### МЕТОДЫ.

Для изучения дивергенции между двумя видами часто используется метод ДНК-ДНК гибридизации. Этот метод позволяет делать выводы о гомологии в ДНК данных видов без непосредственного изучения генома. Данный метод заключается в создании гетеродуплексов из комплиментарных друг другу участков разных ДНК. Для этого одна из изначальных ДНК рестрикуется на небольшие участки одной или несколькими рестриктазами. Участки помещаются в гель, а через этот гель пропускаются участки другой ДНК. Комплиментарные друг другу участки полимеризуются (соединяются), и

полученные гетеродуплексы с помощью электрофореза или ультрацентрифугирования разделяются.

Ультрацентрифугирование обычно производится в градиенте плотности хлорида цезия. Распределение ДНК в большинстве случаев имеет следующий вид:



Гетеродуплексы обладают большей плотностью и примерно одинаковой массой, поэтому на графике они образуют пик. У негибридизованных ДНК небольшая плотность и различная масса, и они образуют область из нескольких пиков. Степень гомологии рассчитывается как количественное отношение гибридизовавших ДНК к общему числу участков.

### **ОРГАНИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА.**

Известны две конфигурации молекул ДНК в природе: линейные молекулы, т.е. молекулы, имеющие два свободных конца, и кольцевые молекулы, которые свободных концов не имеют. В 1965 году было обнаружено небольшое количество кольцевых молекул ДНК длиной 0,6-9,7 мкм в суммарном препарате ДНК из спермы кабана. Такую конфигурацию молекул ранее не наблюдали в препаратах ДНК животного или растительного происхождения, хотя она довольно широко распространена в природе. Такая конфигурация ДНК наблюдается у вирусов животных, бактериофагов, бактериальных плазмид и собственно ДНК бактерий. Несколько позднее кольцевые молекулы ДНК были обнаружены в митохондриях животных клеток. В настоящее время изучены митохондриальные ДНК (мтДНК) многих видов животных — от беспозвоночных до человека, а также грибов и растений.

Молекулярная и функциональная организация молекулярного генома характеризуется большим разнообразием даже в пределах групп сходных организмов. МтДНК различаются не только своими размерами и набором генов, но и особенностями генетического кода. Наибольшими размерами мтДНК обладают растения — 200-2500 тыс. пар нуклеотидов. При этом активные гены занимают лишь неболь-

шую часть этого генома. МтДНК грибов (аскомицетов) имеют меньшие размеры – 20-100 т.п.н.

Самый маленький геном у многоклеточных животных – их мтДНК, не завися от типа клеток, тканей, органов или вида животных, имеет вид колец с длиной контура около 5 мкм, молекулярным весом  $10^7$  дальтон и с количеством 16-20 т.п.н. Митохондриальный геном животных отличается наибольшей унификацией и высокой компактностью организации генетического материала.

Особенная организация мтДНК у простейших из отряда кинето-



Кинетопласт простейших

топластид: геном организован в систему малых и больших колец, т.н. кинетопласт. Эти кольцевые структуры, переплетаясь, образуют сеть – катетан. Из всей системы только макси-кольца выполняют функцию митохондриального генома – назначение мини-колец не известно.

### СРАВНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА.

Опыты по ДНК-ДНК-гибридизации мтДНК различного происхождения позволили сделать вывод о наличии гомологии в последовательности оснований для близких видов и ее отсутствии для видов отдаленных. Минимальная гомология в нуклеотидной последовательности была обнаружена между мтДНК *Xenopus laevis* (шпорцевой лягушки) и *Rana pipiens* (леопардовой лягушки) или цыпленка и червей *Urechis caupo*. Так, например, мтДНК цыпленка и лягушки имеют, по-видимому, одну общую последовательность длиной в 12 нуклеотидов. Опыты по гибридизации кинетопластной ДНК простейших *Leishmania tarentolae* и *Trypanosoma cruzi* свидетельствуют о наличии 2-4% гомологичных нуклеотидных последовательностей. Никакой гомологии не обнаружено в нуклеотидной последовательности кинетопластной ДНК *Crithidia luciliae* и *Trypanosoma mega*, ДНК митохондрий *Xenopus laevis* и дрожжей.

Были предприняты попытки количественного изучения существующей гомологии в нуклеотидных последовательностях между мтДНК животных клеток. После выделения тяжелой (H) и легкой (L) цепей различных мтДНК проводили гибридизацию комплементарных цепей из разных ДНК и образующиеся гибридные дуплексы анализировали при помощи равновесного ультрацентрифугирования в нейтральном градиенте плотности CsCl. Содержание полученного таким образом дуплекса изменялось от 45% для гетеродуплекса мтДНК *Xenopus* и человека до 65% для дуплекса мтДНК мыши и человека. Для других видов млекопитающих гомология составила примерно 70% (гибридизация ДНК быка и дельфина).

Использование техники ДНК-ДНК-гибридизации для обнаружения дивергенции нуклеотидных последовательностей между мтДНК разного происхождения не позволило обнаружить никаких различий между мтДНК печени и почек крысы. Отсюда следует, что значительные различия в морфологии и ферментативном составе митохондрий животных тканей не связаны с большими различиями генов в соответствующих мтДНК.

Данные о том, как эволюционирует мтДНК в сравнении с ядерной ДНК, противоречивы. На основании количественного сравнения гибридизации мтДНК крысы и мыши и гибридизации уникальных последовательностей ядерной ДНК тех же видов был сделан вывод, что эволюция мтДНК протекает с меньшей скоростью, чем эволюция ядерной ДНК. Иные результаты получены тем же методом при изучении четырех видов дрожжей. Было обнаружено, что гомологичные последовательности ядерной и митохондриальной ДНК содержат преимущественно цистроны (кодирующие участки) рибосомальной и, вероятно, транспортной РНК. Методом гибридизации ДНК с РНК рибосом и анализом кривых плавления гибридов ДНК-РНК рибосом было показано, что нуклеотидные последовательности цистронов рибосомальной РНК в ядерном и митохондриальном геномах консервативны, причем наиболее консервативны эти цистроны в ядерном геноме. Цистроны рибосомальной РНК в геноме митохондрий эволюционируют быстрее.

Сходные результаты получены при изучении гомологии нуклеотидных последовательностей мтДНК у двух близких видов амфибий: *Xenopus laevis* и *Xenopus mulleri*. В этих опытах была использована техника гибридизации ДНК с рибосомальной РНК и РНК, комплементарной мтДНК. Установлено, что около  $\frac{1}{4}$  митохондриального генома *Xenopus laevis* и *Xenopus mulleri* различаются по нуклеотидной последовательности. Цистроны митохондриальной рибосомальной РНК были наиболее сходными участками генома, в то же время нерибосомальные цистроны по последовательности оснований существенно различались. Исходя из этого, высказано предположение, что эволюционная судьба различных цистронов мтДНК может быть различна: митохондриальные гены, кодирующие рРНК и 4S РНК, по-видимому, наиболее консервативны, тогда как другие участки мтДНК, возможно спейсерные (вставочные), эволюционируют весьма быстро. Основываясь на данных, что мтДНК реплицируется чаще, чем один раз на одну клеточную генерацию, был сделан вывод, что абсолютное число «митохондриальных генераций» превосходит число «ядерных генераций» (истинное число генераций) и, следовательно, дивергенция последовательностей в мтДНК идет в среднем быстрее, чем в ядерной ДНК.

Противоречие, наблюдаемое при изучении мтДНК у крыс и мышей объясняется тем, что на аэробных организмов действует ес-

тестовый отбор, направленный на отсеивание неблагоприятных мутаций в митохондриях – нарушение работы или уменьшение размеров. Из-за этого возникает видимость того, что мтДНК эволюционирует с меньшей скоростью, чем ядерная ДНК.

### ОРГАНИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ГРИБОВ.

У грибов наблюдается наибольшая вариабельность в организации митохондриального генома, связанная прежде всего с различной длиной некодирующих областей и различным содержанием интронов в генах.

Наиболее четко наблюдается частота мутаций у аскомицетов (дрожжей). Так как дрожжи являются факультативными анаэробами, то всевозможные изменения (в частности, делеции) митохондриального генома редко отражаются на жизнеспособности штаммов.



Аскоспоровые  
дрожжи  
*Kluyveromyces*

| Организм                            | Форма мДНК | Размер (т.п.н.) |
|-------------------------------------|------------|-----------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     | Кольцевая  | 76-83           |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | Кольцевая  | 68              |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>         | Кольцевая  | 36              |
| <i>Hansenula petersonii</i>         | Кольцевая  | 42              |
| <i>Hansenula mrakii</i>             | Линейная   | 54              |
| <i>Candida maltosa</i>              | Кольцевая  | 52              |
| <i>Candida rhagii</i>               | Линейная   | 30              |
| <i>Brettanomyces</i> spp.           | Кольцевая  | 28-101          |
| <i>Kloeckera africana</i>           | Кольцевая  | 27              |
| <i>Torulopsis glabrata</i>          | Кольцевая  | 19              |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>    | Кольцевая  | 18-19           |

Возникновение линейной организации мтДНК в дрожжах *Candida rhagii*, возможно, произошло из-за делеции значительной части генома – размер мтДНК по сравнению с другими видами *Candida* меньше. *Candida* и *Hansenula* активно взаимодействуют с другими организмами - *Hansenula* являются симбионтами некоторых насекомых-ксилофагов (например, жука-короеда), а многие из *Candida* – паразиты. На размер генома мтДНК *Schizosaccharomyces pombe*,

видимо, влияет их тип питания – спиртовое брожение, т.е. нет необходимости сохранения больших участков генома. У дрожжей *Brettanomyces* брожение стимулируется молекулярным кислородом, а *Kluyveromyces* сбраживают лактозу. Кроме того, *S. Pombe* как и *Saccharomyces cerevisiae* являются «культурными» дрожжами и возможен также их селективный отбор.

### **ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА.**

Можно выделить два основных направления изменения генома митохондрий – изменения в животных и растительных клетках. МтДНК растений наиболее архаична и гомологична геному бактерий. У митохондриального генома растений очень большие размеры, в основном, за счет некодирующих областей. Возможно, это вызвано тем, что митохондрии растений играют не настолько важную роль в метаболизме клетки, как пластыды. Но при этом большинство мутаций мтДНК растений были летальны, и поэтому максимально сохранился исходный геном. Близка к растительной мтДНК грибов. Меньшие размеры генома вызваны естественной вырезкой генов при дупликации ДНК, а так как большинство данных мутаций – не летальны, то они оказались закреплены в мтДНК.

Митохондриальный геном животных клеток максимально упрощен – отсутствуют некодирующие области, митохондрия даже не может производить некоторые из собственных белков, так как часть генома перешла в ядро. Подобная потеря автономности, во-первых, говорит о раннем приходе промитохондрий в животную клетку (относительно клеток растительных), во-вторых, о значении митохондрий в метаболизме клетки (дыхательной цепи).

Можно также предположить, что митохондрии растительные и животные имеют разное происхождение – первые произошли от археобактерий (наличие экзон-интронной структуры гена), а вторые – от эубактерий. Данную гипотезу можно подтвердить или опровергнуть изучением внутренней мембраны митохондрий у растений и животных, а также изучения природы анаэробности у грибов. С помощью этой гипотезы можно объяснить различия в организации генома у различных групп организмов. Так как у эубактерий нет сложных систем репарации ДНК, то частота генных мутаций возрастает, но у животных большинство мутаций – летальны, в отличие от дрожжей. У последних наблюдаются сильные расхождения в организации генома даже у близких видов. У растений же, митохондриальный геном стабилизирован большими некодирующими участками и практически не изменяется.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Геном митохондрий сильно дифференцирован у различных групп организмов – нахождение гомологии в мтДНК различных ор-

ганизмов наряду с нахождением гомологии в ядерной ДНК помогает при систематизировании или выявлении различных путей развития у данных организмов. Митохондриальный геном мутирует с большей скоростью, чем ядерный – это объясняется отсутствием систем репарации ДНК, (возможно, за исключением митохондрий растений), но истинную частоту мутаций можно пронаблюдать у дрожжей, так как роль митохондрий у них уменьшается в связи с изменением типа питания.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Ю.С. Ченцов «Общая цитология», издательство Московского Университета, 1984 г.
2. Е.В. Кузьмин, Г.Н. Зайцева «Организация и экспрессия митохондриального генома», 1987 г.
3. М. Одинцова «ДНК хлоропластов и митохондрий», 1976 г.
4. «Мир растений», 2 том, под редакцией А.Л. Тахтаджяна, Москва «Просвещение», 1991 г.
- 5 М. Сингер, П. Берг «Гены и геномы» изд. «Мир» 1998 г.
6. Минченко А.Г., Дударева Н.А. «Митохондриальный геном», «Наука» Сибирское отд., 1990 г.