

## Różnice w budowie i funkcjonowaniu genomu mitochondrialnego i jądrowego

Anna Koseniuk, Agnieszka Szumiec, Dominika Rubiś, Anna Radko

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,  
Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Organizmy żywe to takie, które ulegają wzrostowi, posiadają umiejętność rozmnażania, reagowania na bodźce zewnętrzne oraz przekształcania energii. U eukariontów za tą ostatnią właściwość żywego organizmu odpowiadają mitochondria, stanowiące centra energetyczne komórek. W ich obrębie zachodzi ostatni cykl reakcji oddychania komórkowego – fosforylacja oksydacyjna, w wyniku której powstają cząsteczki adenozyno-5'-trifosforanu (ATP).

Skomplikowany proces przepływu elektronów jest katalizowany przez grupę enzymów, które tworzą cztery funkcjonalne kompleksy. Należy do nich siedem podjednostek kompleksu I, czyli dehydrogenazy nukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH dehydrogenase); jedna podjednostka kompleksu III, czyli grupa cytochromów  $bc_1$ ; trzy podjednostki kompleksu IV, czyli oksydazy cytochromu c oraz dwie podjednostki kompleksu V – syntazy ATP (Anderson 1982). Znajdują się one w wewnętrznej błonie mitochondrium i są uszeregowane według rosnącego potencjału oksydoredukcyjnego. Każdy z kompleksów jest złożony z mniejszych podjednostek polipeptydowych. Elektrony pochodzące z różnych reakcji biochemicznych (m.in. glikolizy i cyklu kwasu cytrynowego) przepływają przez enzymy łańcucha oddechowego, czemu towarzyszy wytwarzanie energii. W reakcji fosforylacji oksydacyjnej (oxidative phosphorylation, OXPHOS), katalizowanej przez syntazę ATP, energia ta jest wiązana w postaci wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych.

Komórki eukariotyczne powstały przez fuzję komórki *Archaea* (dała początek genomowi jądrowemu) z pierwotnymi formami  $\alpha$ -proteobakterii (współczesne mitochondria), która mia-

ła miejsce prawdopodobnie 2 mld lat temu. Z biegiem czasu nastąpiła stopniowa redukcja genomu proteobakterii, której geny zostały włączone w DNA archeobakterii. Współcześnie, w mitochondrialnym genomie znajduje się zaledwie 2% genów białek, biorących udział w reakcjach transportu elektronów. Pozostałe geny białek, związanych z OXPHOS, są ulokowane w jądrowym DNA. Dzięki zachowaniu częściowej autonomii powielenie mitochondriów następuje w miarę wzrostu zapotrzebowania komórki na energię, a replikacja mtDNA nie jest zależna od nDNA.

### Różnice w budowie

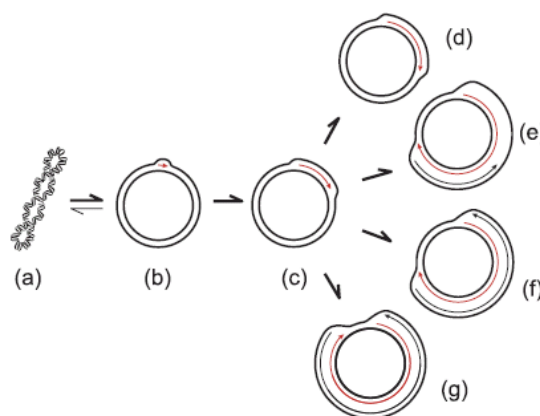
Od kiedy w latach 60. poprzedniego wieku wykryto materiał genetyczny mitochondriów, rozpoczęto intensywne prace, zmierzające do jego poznania. Z oczywistych względów najwięcej uwagi poświęcono ludzkiemu genomowi mitochondrialnemu, którego sekwencja została opublikowana w 1981 r. przez Anderson i in. Zawierała ona jednak błędy, które zostały skorygowane prawie dwadzieścia lat później przez Andrews i in. (1999). Wśród zwierząt gospodarskich sekwencje mtDNA poznano najpierw dla bydła (Anderson i in., 1982), następnie dla koni (Xu i Aranson, 1994), owiec i świń (Hiendleder i in., 1998; Ursing i Arnason, 1998), a najpóźniej dla kóz (Luikart i in., 2001).

Ze względu na fakt, że organizacja mtDNA jest wysoko konserwatywna wśród ssaków, ludzki mtDNA stanowi modelową sekwencję. Arbitralnie za jej początek przyjęto miejsce startu replikacji (ori), które znajduje się na nici ciężkiej w obrębie odcinka pętli D (D-loop) (Anderson

i in., 1981). Podobnie jak w jądrze komórkowym, w mitochondriach DNA jest on zbudowany z dwóch nici kwasu deoksyrybonukleinowego, które przyjmują konformację  $\alpha$ -helisy. Zawierają one reszty czterech zasad azotowych, połączonych wiązaniami wodorowymi: potrójnym – guanina (G) z cytozyną (C), a podwójnym – adenina (A) z tyminą (T). Jednak mimo tych kilku podobieństw, mtDNA znacząco różni się od jądrowego DNA. Przede wszystkim mtDNA ssaków jest kulistego kształtu cząsteczką, złożoną z zaledwie 16–17 tys. par zasad. Nicią wiodącą w mtDNA jest nić ciężka (H), nazwana tak z powodu dużej zawartości zasad purynowych. Druga nić, zawierająca dużą ilość zasad pirymidynowych, jest określana mianem lekkiej (L) (Holland i Parsons, 1999). W mtDNA nie występują introny, a geny są mocno upakowane, w niektórych przypadkach mogą one na siebie zachodzić (np. gen ATP-azy u człowieka). Interesującą cechą mtDNA jest ponadto regularne rozmieszczenie sekwencji tRNA, które rozdzielają inne geny (Wallace i in., 1992). MtDNA charakteryzuje bardzo duża zmienność. Około 10% całkowitej liczby zmian nukleotydowych w obrębie mtDNA zachodzi w pętli D – niekodującym regionie DNA mitochondriów (Bruford i in., 2003). Duża zmienność mtDNA jest spowodowana brakiem ochronnego działania chromosomów oraz bliskością łańcucha oddechowego, będącego głównym źródłem rodników tlenowych (Allen, 1996). Ponadto, mtDNA nie posiada równie wydajnych mechanizmów naprawczych co nDNA (Prinz i Bogenhagen, 1998). Mitochondrialny DNA nie ulega rekombinacji i jest dziedziczony w liniach żeńskich. W momencie zapłodnienia do oocyty, bogatego w matczyne mitochondria, nie przedostaje się wstawka plemnika, zawierająca ojcowskie mitochondria. W rzadkich przypadkach, gdy ojcowski mtDNA znajdzie się w oocycie, zostaje on aktywnie usunięty z komórki (Sutovsky i in., 1999).

### Różnice w funkcjonowaniu

Mitochondrialny DNA, zarówno w budowie, jak i funkcjonowaniu wykazuje szereg podobieństw do organizmów prokariotycznych. Należy jednak podkreślić, że procesy replikacji, transkrypcji i translacji mtDNA nie zostały jeszcze w pełni poznane.



Rys. 1. Model asynchronicznej replikacji mtDNA (Clayton i in., 2003)

*Ryc. 1. Pattern of asynchronous-displacement mechanism of mtDNA replication (Clayton et al., 2003)*

### Replikacja

W przeciwieństwie do nDNA, powielenie DNA w mitochondriach nie zależy od cyklu i podziału komórkowego. Jest to raczej odpowiedź na zapotrzebowanie energetyczne komórki, a tym samym syntezę białek tworzących OXPHOS (Clayton, 2000, 2003). Najbardziej rozpowszechniony i najstarszy model replikacji mtDNA zaproponował Clayton. Wykazał on, że przebiega ona dwukierunkowo, ale niesynchronicznie. Powielenie mtDNA rozpoczyna się od rozplecenia podwójnej nici mtDNA w miejscu startu replikacji nici ciężkiej ( $Ori_H$ ,  $O_H$ ) (rys. 1 b) i przyłączenia do niego startera RNA (Clayton, 2000, 2003). Etap dobudowywania nowej nici H (wiodącej) na łańcuchu L odbywa się zgodnie z ruchem wskazówek zegara. Procesowi temu nie towarzyszy równoległe dobudowywanie łańcucha nukleotydowego do odsłoniętej nici H (rys. 1 c, d). Ta z kolei, jako pojedynczy łańcuch DNA tworzy formę „spinki”. W momencie, gdy rozplatające się nici odsłonią miejsce startu replikacji nici L ( $Ori_L$ ,  $O_L$ ), rozpoczyna się synteza łańcucha lekkiego (rys. 1 e). Matrycę stanowi wtedy odsłonięta w wyniku replikacji pojedyncza nić H (rys. 1 f, g) (Clayton, 2000, 2003).

Opisany model asynchronicznej, dwukierunkowej replikacji mtDNA jest w ostatnich latach podważany. Wyniki niektórych badań wskazują bowiem na przebieg replikacji mtDNA w taki sam sposób, jak DNA jądra komórkowego (Holt i in., 2000; Yang i in., 2002;

Bowmaker i in., 2003; Yasukawa i in., 2005). Co więcej, według niektórych badaczy w mitochondrium powielanie materiału genetycznego odbywa się według obydwu tych schematów (Yasukawa i in., 2005).

### Transkrypcja

W mtDNA znajdują się trzy miejsca startu transkrypcji: dwa nici ciężkiej – HSP1 i HSP2 oraz jeden nici lekkiej – LSP. HSP1 i LSP są położone w obrębie pętli D, natomiast HSP2 genu 12S rRNA (Montoya i in., 1981). W miejscu HSP1 rozpoczyna się transkrypcja dla dwóch jednostek rybosomowego RNA, tj. 12S i 16S rRNA oraz dla dwóch rodzajów transportującego RNA, tj. tRNA<sup>Phe</sup> i tRNA<sup>Val</sup> (Van Etten i in., 1983). W wyniku transkrypcji, zainicjowanej w miejscu HSP2, powstaje policistronowy mRNA dla większości białek, których sekwencje znajdują się na nici H, tj. podjednostki 1–6 kompleksu I, cytochromu b – podjednostki kompleksu III, cytochromu c – podjednostki kompleksu IV oraz podjednostki syntazy. Transkrypcja, zapoczątkowana w LSP, daje produkt w postaci jednego policistronowego mRNA z przepisanyymi sekwencjami dla 6 podjednostki kompleksu I (dehydrogenazy NADH) oraz ośmiu tRNA dla następujących aminokwasów: prolina, kwas glutaminowy, seryna, tyrozyna, cysteina, asparagina, alanina, glutamina. Ponadto, w wyniku transkrypcji rozpoczętej w LSP powstaje starter RNA, niezbędny do zainicjowania replikacji mtDNA (Clayton, 2000).

### Translacja

W macierzy mitochondrialnej występuje

znaczna przewaga białek, dla których sekwencje znajdują się w nDNA. Pozostałe białka syntetyzowane są w mitochondriach, zasadniczo według schematu poznanego u prokariotów (Smits, 2010). Kod genetyczny mtDNA znacząco różni się od uniwersalnego kodu genetycznego. Kodon UGA w transkryptach, pochodzących z jądrowego DNA sygnalizuje zakończenie translacji (kodony „stop”), w mtDNA odczytywany jest jako tryptofan, w nDNA triplet AUA koduje izoleucynę, a AGA i AGG argininę, podczas gdy w mtDNA odczytywane są jako metionina (AUA) i zakończenie translacji (AGA i AGG) (Osawa i in., 1992).

Inna różnica dotyczy budowy mitochondrialnego mRNA. Nie posiada on niekodujących odcinków, odpowiedników intronów, ani tzw. „czapeczki” czy sekwencji liderowych przy końcu 5', bądź regionów nieulegających translacji 5' i 3' (UTR5' i UTR3), a ogon poliA jest formowany bezpośrednio za kodonem stop. Z powodu specyficznej budowy mitochondrialnego mRNA rodzi się pytanie, w jaki sposób dochodzi do przyłączenia rybosomu i skierowania go do kodonu start na mRNA (Temperley i in., 2010). Etap elongacji przebiega identycznie jak u bakterii. Ilość czynników elongacyjnych różni się między różnymi tkankami i wpływa na wydajność wydłużania się łańcucha aminokwasowego (Taanman, 1999).

### Podsumowanie

W tabeli 1 przedstawiono w skondensowany sposób podstawowe różnice w budowie i funkcjonowaniu między mitochondrialnym i jądrowym DNA.

Tabela 1. Zestawienie podstawowych różnic między mitochondrialnym a jądrowym DNA  
Table 1. Major differences between mitochondrial DNA and nuclear DNA

	mtDNA	nDNA
Lokalizacja – Location	mitochondrium – mitochondrion	jądro komórkowe – cell nucleus
Struktura – Structure	kolista – circular	liniowa – linear
Liczba kopii – Number of copies	2–10 na komórkę – 2–10 per cell	1 na komórkę – 1 per cell
Dziedziczenie – Inheritance	w linii matczynej – maternal	po matce i ojcu – maternal and paternal
Źródło zmienności Source of variation	mutacje mutations	rekombinacja, mutacje recombination, mutations

Replikacja <i>Replication</i>	asynchroniczna, jednokierunkowa; niezależna od fazy cyklu komórkowego i replikacji nDNA; indukowana zapotrzebowaniem energetycznym komórki; dwa miejsca startu replikacji – OriH i OriL <i>asynchronous, unidirectional; independent of cell cycle stage and nDNA replication; induced by the cell's energy demand; two replication initiation sites – OriH and OriL</i>	semikonserwatywna; synchroniczna, dwukierunkowa; zależna od fazy cyklu komórkowego; wiele miejsc inicjacji replikacji <i>semi-conservative, bidirectional; dependent on cell cycle stage; many replication initiation sites</i>
Transkrypcja <i>Transcription</i>	obie nici są transkrybowane całkowicie; trzy miejsca inicjacji transkrypcji <i>both strands are completely transcribed; three transcription initiation sites</i>	transkrypcja przebiega dla pojedynczych genów; wiele miejsc transkrypcji <i>single genes are transcribed; many transcription sites</i>
Translacja <i>Translation</i>	mRNA nie posiada intronów <i>mRNA has no introns</i>	mRNA zawiera introny <i>mRNA contains introns</i>
Różnice w odczycie kodu genetycznego: <i>Differences in genetic code reading:</i>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• UGA</li> <li>• AUA</li> <li>• AGA</li> <li>• AGG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Trp</li> <li>Met</li> <li>Stop</li> <li>Stop</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stop</li> <li>Ile</li> <li>Arg</li> <li>Arg</li> </ul>

### Literatura

- Allen F. (1996). Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *J. Theor. Biol.*, 180: 135–140.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., Bruijn M.H. de, Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457–465.
- Anderson S., Bruijn M.H. de, Coulson A.R., Eperon I.C., Sanger F., Young I.G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.*, 156: 683.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowers R.N., Turnbull D.M., Howell N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, 23 (2): 147.
- Bowmaker M., Yang M.Y., Yasukawa T., Reyes A., Jacobs H.T., Huberman J.A., Holt I.J. (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J. Biol. Chem.*, 278: 50961–50969.
- Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Rev.*, 4: 900–910.
- Clayton D.A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reprod.*, 15 (2): 11–17.
- Clayton D.A. (2003). Mitochondrial DNA replication: What we know. *IUBMB Life*, 55 (4–5): 213–217.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R., Janke A. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence

- of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.*, 47: 441–448.
- Holland M.M., Parsons T.J. (1999). Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Sci. Rev.*, 11: 21–50.
- Holt I.J., Lorimer H.E., Jacobs H.T. (2000). Coupled leading and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 100: 515–524.
- Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J.-D., Bouvet J., Taberlet P. (2001). Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 5927–5932.
- Montoya J., Ojala D., Attardi G. (1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, 290: 465–470.
- Osawa S., Jukes T.H., Watanabe K., Muto A. (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.*, 56 (1): 229–264.
- Prinz K.G., Bogenhagen D.F. (1998). Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 1257–1265.
- Smits P., Smeitink J., Heuvel L. van den (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010; doi: 10.1155/2010/737385.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C., Schatten G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402 (25): 371.
- Taanman J.W. (1999). The mitochondrial genome, structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta*, 1410: 103–123.
- Temperley R.J., Wydro M., Lightowlers R.N., Chrzanowska-Lightowlers Z.M. (2010). Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different. *BBA – Bioenergetics*.
- Ursing B.M., Arnason U. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *J. Mol. Evol.*, 47: 302–306.
- Van Etten R.A., Bird J.W., Clayton D.A. (1983). Identification of the 3'-ends of the two mouse mitochondrial ribosomal RNAs. The 3'-end of 16 S ribosomal RNA contains nucleotides encoded by the gene for transfer RNA<sup>Leu</sup>UUR. *J. Biol. Chem.*, 258 (16): 10104–10110.
- Wallace D.C. (1992). Diseases of the mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 1175–1212.
- Xu X., Aranson U. (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the horse *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*, 48: 357–362.
- Yang M.Y., Bowmaker M., Reyes A., Vergani L., Angeli P., Gringeri E., Jacobs H.T., Holt I.J. (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell*, 111: 495–505.
- Yasukawa T., Yang M.Y., Jacobs H.T., Holt I.J. (2005). A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol. Cell*, 18: 651–662.

## DIFFERENCES IN THE STRUCTURE AND FUNCTION OF MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR GENOMES

### Summary

It is believed that endosymbiosis, which took place about 2 billion years ago, led to the formation of two genomes in mammalian cells. The DNA found in mitochondria (mtDNA), like that in the nucleus (nDNA), consists of double polynucleotide strands. Moreover, the nucleobases in the DNA that originated from either mitochondria or nucleus are the same and bond to each other in the same manner. However, despite these obvious similarities mtDNA differs considerably from nDNA. First of all mitochondrial DNA is the sole extranuclear genetic material in mammalian cells. It is a circular shaped molecule containing approximately 16 600 bp and codes for 37 genes for proteins building OXPHOS complexes. The sequences for the roughly 1500 remaining mitochondrial proteins are coded by nucleus DNA. mtDNA is characterized by very high polymorphism, lack of recombination and exclusively maternal inheritance in mammalian cells. Both mitochondria and their DNA are able to divide as long as the cell's demand for energy is needed. Finally, replication, transcription and translation of mtDNA, although not fully understood seem to be similar to those in prokaryotic organisms.