

Митохондрии, митохондриальная ДНК и соматические митохондриальные мутации: имеют ли они отношение к старению?

К. Храпко



Константин Храпко,
5-й выпуск биокласса,
школа № 57 (1980 г.),
закончил Химфак МГУ
(1985 г.), к.х.н., профессор в
Медицинской Школе Гар-
вардского университета,
khrapko@hms.harvard.edu

Митохондрии — клеточные органеллы ответственные за тканевое дыхание — потомки симбионта древних эукариот, большая часть генома которого была перенесена в геном клетки-хозяина, возможно, чтобы избежать высокого уровня мутаций, характерного для митохондрий. Однако перенести геном полностью не удалось, и остаток этого генома — современная митохондриальная ДНК (мтДНК) — аккумулирует с возрастом большое количество мутаций, которые к тому же склонны к внутриклеточной клональной экспансии, так что их участие в процессе старения представляется весьма вероятным. Однако, хотя митохондриальная теория старения была сформулирована более 30 лет назад, она до сих пор ждет подтверждения. Мы обнаружили очень высокий уровень мутаций митохондриальной ДНК в пигментных нейронах черной субстанции, т.е. той области мозга, которая бывает поражена при болезни Паркинсона. Мы подозреваем, что эти мутации могут иметь отношение к «сенильному паркинсонизму» — синдрому, широко распространенному среди пожилых людей.

Митохондрии и дыхание. АТФ и радикалы

Митохондрии — клеточные органеллы, окруженные двойной мембраной и содержащие собственную ДНК, — имеются почти во всех эукариотических клетках. У митохондрий большое число разнообразных функций, из которых основная — производство АТФ путем окисли-

тельного фосфорилирования. Детали этого процесса очень интересны, но для последующего обсуждения важны только некоторые общие его аспекты.

Окислительное фосфорилирование — многоступенчатая окислительно-восстановительная реакция, в которой участвуют несколько ферментов (называемых электронно-транспортной цепью, или митохондриальными комплексами I, II, III и IV), находящихся на внутренней мембране митохондрии. Эти ферменты последовательно передают друг другу электрон, полученный тем или иным способом из органических молекул, пищи. Каждый последующий фермент связывает электрон немного сильнее, чем предыдущий, поэтому при каждой передаче освобождается небольшая порция энергии (т.е. электрон теряет энергию). Последний из ферментов, комплекс IV, передает четыре обессиленных таким образом электрона и четыре иона водорода молекуле кислорода и превращает ее в две молекулы воды. Таким образом митохондрии осуществляют окисление органического вещества кислородом, т.е. тканевое дыхание.

Многоступенчатая система ферментов нужна для того, чтобы разбить слишком большую энергию, которая бы выделилась, если бы электрон отправить прямо кислороду, на маленькие порции, удобные клетке. Эти небольшие порции энергии ферменты цепи частично используют для выталкивания ионов водорода из митохондрии в пространство между двумя мембранами. В результате, внутри митохондрии среда щелочная, а в межмембранном пространстве — кислая. В этом разделении запасается энергия (ведь если смешать кислоту и щелочь, выделится тепло). А потом еще один фермент, комплекс V, пускает протоны обратно внутрь митохондрии (т.е. смешивает немного кислоты и щелочи), но делает это так аккуратно, что тепло почти не выделяется, а энергия используется для фосфорилирования АДФ до АТФ и запасается теперь в высокоэнергетической фосфатной связи.

Для последующего обсуждения необходимо иметь в виду, что окислительное фосфорилиро-

вание — довольно токсичный процесс. Ведь электроны, путешествующие по электронно-транспортной цепи, могут взаимодействовать с молекулярным кислородом не только там, где это должно происходить (в комплексе IV). В этом месте созданы условия для полного и безопасного восстановления кислорода до воды. В других местах цепи электрон тоже изредка может оказаться захваченным кислородом (вместо того, чтобы, как положено, быть переданным на следующую ступень цепи). Такой захват неспаренного электрона приводит к образованию активных радикалов, способных реагировать с любыми органическими молекулами в клетке, включая ДНК, белки и жиры. Естественно, что эти опасные побочные реакции особенно легко происходят тогда, когда электронная цепь перегружена электронами, например если какой-нибудь нижестоящий фермент цепи инактивирован ингибитором или мутацией.

Происхождение и деградация митохондриального генома

По-видимому, митохондрии произошли от древних симбиотических бактерий, которые жили внутри примитивных одноклеточных эукариотов. Отсюда и двойная мембрана (симбионт, наверное, был окружен клеточной мембраной), и ДНК митохондрий. В ходе коэволюции, вероятно, оказалось, что многие процессы, необходимые симбионту, могут выполняться белками клетки хозяина, а соответствующие бактериальные гены за ненадобностью могут быть (и были) вырезаны. Другие гены, которых у клетки-хозяина не было, видимо, были перенесены из митохондриальной ДНК в ядерную. Постепенно генов в ДНК симбионта (теперь уже ставшего, конечно, органеллой) становилось все меньше и меньше. Почему клетке был выгоден такой перенос генов, точно не известно. Возможно (и мы обсудим это позже), что ДНК в митохондриях слишком подвержена мутациям (например, из-за кислородных радикалов электронно-транспортной цепи), так что заключенную в ней информацию надежнее хранить в ядре клетки. Казалось бы, митохондриальная ДНК должна была бы исчезнуть совсем, но процесс переноса генов в ядро остановился около 800 миллионов лет назад, когда в митохондриальной ДНК все еще оставалось чуть больше десятка белок-кодирующих генов. Интересно, что все 13 генов, оставшиеся в мтДНК животных (у растений и дрожжей все немного иначе), кодируют трансмембранные

субъединицы комплексов I, III, IV, и V, т.е. субъединицы, которые погружены в митохондриальную мембрану.

Почему же именно эти 13 генов остались в мтДНК? По-видимому, дело в том, что, будучи трансмембранными, эти белки содержат весьма гидрофобные (жирные) последовательности аминокислот, которые крайне неохотно вылезают из гидрофобного же окружения мембраны в водную среду. Если бы гены этих белков оказались в ядре, то соответствующие полипептиды приходилось бы протаскивать через наружную митохондриальную мембрану (в которой они, конечно же, пожелали бы накрепко застрять) и межмембранное пространство и дальше встраивать во внутреннюю мембрану. Вероятно, древние эукариоты из нашей эволюционной ветви не нашли способа решить эту (чрезвычайно сложную) задачу.

Как бы то ни было, раз внутри митохондрий остались гены, то нужен аппарат их экспрессии — транскрипция и трансляция. Все белки, осуществляющие митохондриальную транскрипцию и трансляцию, кодированы в ядре и импортируются в митохондрию. Однако, по-видимому, имеются трудности с доставкой в митохондрии РНК, так что все РНК-компоненты трансляции (транспортные и рибосомные РНК) тоже кодированы в мтДНК. В результате генетический код митохондрий оказался независимым от кода клетки. А так как структурных генов в мтДНК так мало, то не исключена возможность изменения кода (так как число необходимых поправок в случае изменения смысла кодона может быть невелико и не смертельно). И действительно, код митохондрий слегка отличается от универсального, причем разные ветви эволюционного дерева приобрели разные изменения. Скажем, у хордовых четыре кодона соответствуют другим аминокислотам/стоп сигналам, чем у иглокожих. У обеих групп по четыре отличия от универсального кода (два общих, произошедших еще до того как хордовые разошлись с иглокожими, и по два различных, произошедших после расхождения (Saccione *et al.*, 2002)).

Итак, митохондриальная ДНК кодирует (используя нестандартный код) 13 белков, 2 рибосомальные и 22 транспортные РНК. мтДНК чрезвычайно компактна: все это умещается на 16 000 парах оснований кольцевой молекулы. Кодированные последовательности расположены одна за другой без некодирующих пропусков. Имеется всего одна небольшая (около 1000 оснований) регуляторная область, отвечающая за репликацию и транскрипцию всей мтДНК.

В некоторых типах клеток мутации мтДНК имеются в избытке

Как и всякая ДНК, митохондриальная ДНК подвержена мутациям. Вообще-то, мутации могут происходить или из-за самопроизвольных ошибок ДНК-полимеразы (этот фермент копирует ДНК, имеет ограниченную точность), или из-за того, что копируемая ДНК подверглась химической модификации, так что полимеразы не знает, как копировать модифицированный нуклеотид, и совершает ошибку как бы не по своей вине. Впрочем, ошибки не ограничиваются неправильно скопированными нуклеотидами (точечными мутациями). ДНК-полимераза может в процессе синтеза пропускать участки ДНК, что приводит к делециям. Делеции также могут быть результатом другого процесса — рекомбинации. Как и точечные мутации, делеции могут происходить самопроизвольно, или быть обусловлены модификациями ДНК.

Митохондриальная ДНК находится в непосредственной близости от электронно-транспортной цепи, которая, как мы обсуждали выше, является источником химически активных радикалов. Кроме того, в отличие от ядерной ДНК, мтДНК не защищена гистонами и значительную часть времени при репликации находится в одноцепочечной форме. Все это (и не только это) приводит к тому, что количество химических модификаций в мтДНК значительно выше, чем в ядерной. Это, в свою очередь, приводит к тому, что скорость накопления мутаций в мтДНК существенно выше, чем в ДНК ядра клетки.

Рассмотрим, например, статистику по мутациям, вызывающим наследственные болезни. Митохондриальная ДНК по числу пар оснований составляет всего около 0.001% генома клетки, но доля болезней, вызываемых мутациями мтДНК, составляет примерно 1% от всех наследственных болезней. Таким образом, в каком-то смысле оказывается, что пара оснований мтДНК примерно в 1000 раз важнее для здоровья, чем пара оснований ядерной ДНК! Такая огромная разница вызвана отчасти компактностью мтДНК: плотность кодирующих последовательностей в ней примерно в 100 раз больше, чем в ядерной ДНК, а отчасти тем, что скорость накопления наследуемых мутаций в расчете на пару оснований в мтДНК примерно в 10 раз выше, чем в ядерной.

Подавляющее число мутаций, происходящих в ДНК, конечно, не передаются по наследству. Это соматические мутации, которые случаются в ДНК соматических (т.е. неполовых) клеток. Такие мутации могут быть крайне опасными: например, соматические мутации ядерной ДНК

могут вызывать рак. Соматические мутации обычно накапливаются с возрастом, поэтому естественно подозревать, что они могут быть как-то связаны со старением. По некоторым оценкам, скорость накопления соматических мутаций в мтДНК в 100–1000 выше, чем в ядерной ДНК. Это означает (вспомним: ядерный геном в 100 000 раз больше, а митохондриальный в 100 раз компактнее; нужно только все эти числа правильно перемножить/поделить), что общее число мутаций в мтДНК может быть сравнимо (точнее говоря, примерно составляет от 1/10 до равного количества) с общим числом мутаций в ядерной ДНК. Эти оценки очень грубы, но интуитивно, сбалансированное соотношение представляется оправданным. Логика примерно такая: скорости накопления соматических мутаций в мтДНК и ядерной ДНК изменяются практически независимо. И те, и другие мутации приводят к необратимым дефектам в клетках. Поскольку эти дефекты представляют опасность для организма в целом, эволюция будет стремиться снизить скорость накопления мутаций. Однако, если главная проблема — это, скажем, мутации ядерной ДНК, то давление отбора будет улучшать ферменты, ответственные за сохранность ядерной ДНК, а митохондриальные ферменты улучшаться не будут, и наоборот. Так постепенно то одна, то другая система будет подвергаться улучшению, поддерживая приблизительный баланс. Впрочем, я вставил эти рассуждения главным образом для красного словца, они, конечно, слишком неопределенны, чтобы помочь понять, имеют ли митохондриальные мутации отношение к старению.

Более информативен тот факт, что абсолютная частота точечных мутаций митохондриальной ДНК, по крайней мере в некоторых тканях, весьма велика, например в мозге, каждая молекула мтДНК содержит, по некоторым сообщениям, в среднем около двух (!) точечных мутаций, хотя не исключено, что это преувеличение (Kharko *et al.*, 2006). Учитывая то, что больше половины всех возможных точечных мутаций в мтДНК приводят по крайней мере к замене аминокислоты, это наводит на мысль, что мутации должны играть хоть какую-то роль в состоянии хотя бы некоторых соматических тканей. Впрочем, имеется одно важное обстоятельство, которое необходимо обсудить.

МтДНК мультиплоидна; вредной мутацией стать непросто

В отличие от ядерной ДНК, которая обычно присутствует в двух копиях (диплоидные клет-

ки), мтДНК, как правило, находится в количестве от нескольких сотен до нескольких тысяч на клетку (в этом смысле мтДНА мультиплоидна). Это естественно: в клетке содержится множество митохондрий, а каждая митохондрия обычно содержит несколько копий ДНК. Митохондриальная ДНК, как и ядерная, периодически реплицируется: ведь когда клетка делится, ее митохондрии распределяются, видимо, случайным образом между дочерними клетками, поэтому репликация мтДНК и деление митохондрий (подобно делению бактерий) необходимо для поддержания постоянного числа митохондрий в делящихся клетках. Впрочем, в неделящихся клетках, например нейронах, тоже происходит репликация мтДНК и деление митохондрий. Дело в том, что митохондрии довольно быстро приходят в негодность (видимо, из-за обилия в них кислородных радикалов), после чего их заглатывают и переваривают лизосомы. Как именно это происходит, не совсем понятно, но точно известно, что время жизни митохондрий и мтДНК довольно ограничено (порядка нескольких недель). Поэтому даже в неделящихся клетках митохондриям приходится расти и делиться, чтобы поддерживать постоянную численность.

Таким образом, молекулы мтДНК в клетке можно рассматривать как популяцию, особи которой рождаются, умирают и, конечно, мутируют. Но мутагенез — случайный процесс, и естественно ожидать, что на разных копиях происходят разные мутации. Казалось бы, со временем в клетке образуется невероятно сложная смесь всевозможных мутаций, случайно распределенных по молекулам ДНК.

Интересно, что если бы так было на самом деле, то мутации, несмотря на их огромное количество, были бы совершенно безопасными для клетки. Дело в том, что разные мутации приводят к дефектам разных генов митохондрии. А поскольку разные мтДНК содержат разные мутации, то в то время как некий ген дефектен на одной мтДНК молекуле, в той же клетке находится огромное количество мтДНК, в которых тот же ген не дефектен, а мутации угодили в другие гены. В результате в клетке в целом всегда достаточно недефектных продуктов каждого митохондриального гена, а т.к. митохондрии в клетке обмениваются своими компонентами, то хватает на всех. Вообще говоря, было показано, что именно благодаря такому обмену продуктами между митохондриями (защитный механизм?) мутации мтДНК начинают оказывать влияние на самочувствие клетки только, когда их среднее содержание в клетке превышает 60–90%, в зависимости от типа мутации. Очевидно, что нако-

пление в клетке случайных мутаций не способно обеспечить столь высокий уровень какой-то отдельно взятой мутации (или группы мутаций, инактивирующих один и тот же ген). Такое было бы возможно, если бы мутации определенного типа возникали гораздо чаще остальных («горячие точки»), но в мтДНК мутации распределены более-менее равномерно. Так что же, соматические мутации мтДНК безопасны для клеток и, следовательно, отношения к старению не имеют?

Внутриклеточная популяционная генетика мтДНК: клональные экспансии позволяют мутациям становиться вредными вопреки мультиплоидности

Как это ни удивительно, но если заглянуть в клетку и посчитать находящиеся там мутантные молекулы, то вместо ожидаемой сложнейшей смеси всевозможных случайных мутаций окажется, что почти все молекулы клетки содержат одну и ту же мутацию или группу мутаций, причем молекулы одной клетки содержат один тип мутаций, а молекулы другой клетки — другой (а иногда и никакой). Неужели в одной клетке происходит только один тип мутаций, а в другой — только другой? Это совершенно невероятно. К счастью, имеется более приемлемое (хотя и не очень простое) объяснение.

Позволим себе небольшое отступление: на уединенных северных островах, где небольшие изолированные деревеньки существуют в течение нескольких столетий, можно иногда наблюдать удивительное явление: все жители деревни имеют одну и ту же фамилию. Как же так могло получиться, неужели вся деревня произошла от одного праотца? Скорее всего — нет. Рассмотрим это явление подробнее. Пусть, наоборот, деревня с самого начала была заселена большим числом семей, и все они имели разные фамилии. Если со временем число жителей почти не меняется (деревни эти не разрастались), то в каждой семье в среднем было по два ребенка. Если рождаются две девочки (а это происходит в каждой четвертой семье), то фамилия семьи исчезает, так что в первом же поколении четверть фамилий в деревне исчезнет. В каждом последующем поколении фамилии будут исчезать по тому же механизму, пока не останется только одна. Математический анализ показывает, что чем меньше семей в деревне и чем больше различия в числе детей между семьями, тем быстрее (т.е. за тем меньшее число поколений) одна фамилия захватит всю деревню.

Кстати, подобный процесс лежит в основе важнейшего явления — нейтральной эволюции. Большинство мутаций, которые приобретают живые существа, — нейтральны, они не приводят ни к каким селективным преимуществам и распространяются в популяции не благодаря естественному отбору, а в результате случайного процесса, аналогичного распространению фамилий в деревне.

Вернемся к митохондриям. Поскольку число органелл в клетке примерно постоянно, каждая молекула мтДНК за время между клеточными делениями удваивается в среднем один раз. Но на самом деле удвоение мтДНК — процесс случайный, и некоторым молекулам удается удвоиться несколько раз, а другие не успевают удвоиться и одного раза. Но, как мы знаем, разные молекулы мтДНК содержат разные случайные мутации, совершенно как жители деревни первоначально имеют разные фамилии. Если какая-то мтДНК не успела удвоиться, прежде чем несущая ее митохондрия отправится в сестринскую клетку, то мутация, находившаяся на такой молекуле ДНК, исчезает из митохондриальной популяции данной клетки, подобно тому, как исчезает фамилия семьи, где родились одни девочки. Так что через достаточное число клеточных делений (или через достаточное число полужизней мтДНК, если речь идет о неделящейся клетке) в клетке останется только один тип мтДНК, что и требовалось объяснить.

Заметим, что процесс захвата клетки мутантной ДНК есть не что иное, как чрезмерное разрастание одного клона ДНК (т.е. потомства одной молекулы), поэтому это явление получило название «клональная экспансия» (clonal expansion). Клональная экспансия в том виде, как она описана здесь, не требует какого-либо преимущества одной мутации над другими. Но наличие преимущества (например, мутации в регуляторной области, которые могли бы способствовать более эффективной репликации), конечно, может сильно облегчить экспансию. Предложено несколько механизмов, которые бы могли обеспечить преимущества определенным типам мутаций. Более строгие рассуждения на темы этого раздела, а также литературные ссылки можно найти в (Coller *et al.*, 2002).

Каковы бы ни были механизмы клональной экспансии, наиболее важен для нас тот вывод, что множественность митохондриальных геномов не обязательно защищает клетку от митохондриальных мутаций или что эта защита временная, пока мутация находится в процессе экспансии.

Итак, согласно нашим рассуждениям, в некоторых тканях пожилых людей можно ожи-

дать большого количества клеток, пораженных клональными мутациями митохондриальной ДНК. Что же наблюдается на самом деле? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо провести анализ мутаций индивидуальных клеток. Для этого нужно изолировать отдельные клетки и выделить их ДНК. Все это весьма непросто, и до сих пор лишь небольшое количество тканей было проанализировано таким образом.

Митохондриальные мутации в пигментных нейронах и сенильный паркинсонизм — причина и следствие?

Наиболее интересные результаты получены в результате исследования небольшой области мозга, называемой черной субстанцией (*substantia nigra*). В этой области находится скопление характерных пигментированных нейронов, вырабатывающих нейротрансмиттер дофамин. Их функции лучше всего иллюстрируются тем, что происходит, когда эти нейроны дегенерируют, — при болезни Паркинсона. Типичные симптомы этого заболевания — замедленные движения, тремор, скованность, неустойчивое равновесие. Однако эти признаки характерны не только для болезни Паркинсона: в легкой форме они проявляются у многих пожилых людей, и их встречаемость быстро увеличивается с возрастом и ассоциирована с существенно худшим прогнозом (Bennett *et al.*, 1996). Причины сенильного (старческого) паркинсонизма неизвестны; по-видимому, они могут быть не связаны с причинами классической болезни Паркинсона.

У нас были основания интересоваться митохондриальными мутациями именно в черной субстанции. Во-первых, уже около 10 лет назад было обнаружено, что среди пигментных нейронов черной субстанции с возрастом накапливается много клеток (до 30%), в которых отсутствует или существенно снижено количество по крайней мере одного белка, кодированного в мтДНК, а именно субъединицы комплекса IV. Такой дефект мог быть вызван митохондриальными мутациями. Число людей с повышенной частотой дефектных нейронов сравнимо с числом страдающих сенильным паркинсонизмом (Itoh *et al.*, 1996). Во-вторых, еще раньше было показано, что в черной субстанции содержится больше мутаций мтДНК (делений определенного типа), чем во многих других областях мозга. Но абсолютное содержание делений выглядело слишком низким, чтобы объяснить какие бы то ни было дефекты митохондриального метаболизма в пигментных нейронах (Soong *et al.*, 1992).

Естественно, напрашивается гипотеза о том, что, с одной стороны, сенильный паркинсонизм вызывается, хотя бы отчасти, митохондриальными дефектами в пигментных нейронах, а с другой стороны, что дефекты нейронов, в свою очередь, вызываются накоплением делеций в митохондриальной ДНК.

Мы решили для начала проверить вторую часть этой гипотезы, т.е. продемонстрировать, что, во-первых, пигментные нейроны с дефектами митохондриального метаболизма, и только они, содержат высокий уровень делеций митохондриальной ДНК, а во-вторых, что содержание делеций в дефектных клетках достаточно высокое, чтобы вызвать такие дефекты (принято считать, что делеции вызывают проблемы, когда их содержание превышает 60%).

Проверка гипотезы: делеции мтДНК — дефектные нейроны

В первую очередь необходимо было различить нормальные и дефектные нейроны. Это достигается гистологическим окрашиванием, основанным на активности одного из ферментов электронно-транспортной цепи (комплекса IV). Нейроны с высокой активностью этого фермента окрашиваются в коричневый цвет, а те нейроны, где фермент менее активен (предположительно из-за клональной делеции мтДНК), остаются почти бесцветными. Чтобы увидеть дефектные клетки, срез ткани дополнительно обрабатывают красителем, который окрашивает все нейроны в фиолетовый цвет (но фиолетовый не может перебить коричневой окраски, поэтому активные нейроны остаются коричневыми). Пример ткани, окрашенной таким образом, приведен на рисунке 1а. Обратите внимание на то, что нейроны разделяются на два класса: «коричневые» (нормальные) и «фиолетовые» (дефектные).

Далее было необходимо изолировать индивидуальные нейроны, нормальные и дефектные. Для этого использовалась лазерная микроскопия. Микроскоп соединен с мощным лазером, а препарат ткани находится на подвижном предметном столике с микроприводом, управляемым компьютером. Выбрав клетку, вы очерчиваете ее на компьютере линией, по которой хотите ее вырезать, дальше включается лазер, и столик движется таким образом, что неподвижный луч лазера обходит клетку по начерченной линии, разрезая всё на своем пути. Клетки оказываются отделенными от остальной ткани узкой прожженной полоской. Затем лазер дает короткий импульс по центру

клетки, и давление света катапультирует ее и забрасывает в подставленную пробирку. Рисунок 1б показывает срез ткани после того, как были катапультированы 7 нейронов.

Наконец, чтобы оценить содержание делеций в каждой из клеток, был использован метод мономолекулярной полимеразной цепной реакции, разработанный специально для этого случая. ДНК каждой клетки сильно разбавлялась, настолько, что в каждую реакцию попадало не более одной молекулы мтДНК. Если попавшая молекула оказывалась полноразмерной, то амплификации подвергались два фрагмента ДНК, а если с делецией — то только один (матрица для второго фрагмента была нарушена делецией). Далее простой подсчет реакций с одним и двумя фрагментами дает оценку доли мутантных мтДНК в клетке. Результат такого эксперимента показан на рисунке 1в.

Как видно на рисунке, дефектные нейроны действительно содержат больше делеций мтДНК. Впрочем, похоже, что практически все пигментные нейроны у пожилых людей содержат какое-то количество делеций, но только в

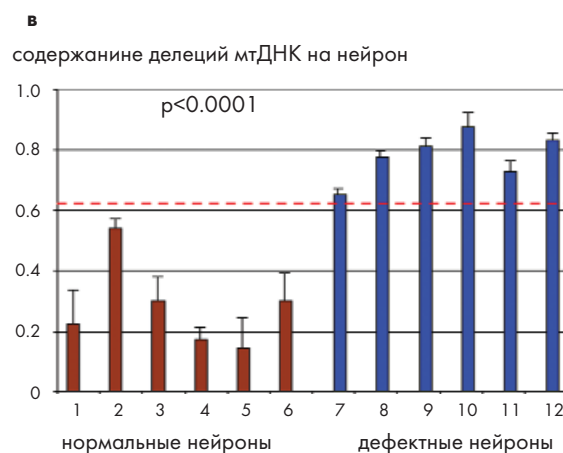
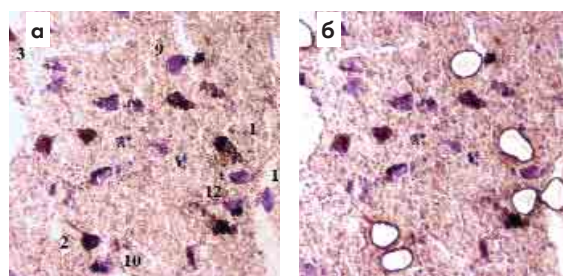


Рисунок 1. Что вызывает дефекты митохондриального метаболизма в пигментных нейронах?

(а) — Срез черной субстанции был окрашен, чтобы выявить клетки с нормальным (коричневые) и дефектным (фиолетовые) митохондриальным метаболизмом. (б) — Клетки были изолированы при помощи лазерной микроскопии. (в) — В каждой из клеток было определено содержание делеций мтДНК. Легко видеть, что дефектные нейроны содержат больше делеций, чем нормальные. Подробности в тексте.

дефектных клетках их содержание достигает критического уровня (60%). Видимо, как мы и предполагали, делеции мтДНК действительно приводят к митохондриальным дефектам в нейронах. Учитывая, что делеции присутствуют практически во всех клетках, можно ожидать, что со временем большее число клеток набирают критическую массу делеций и становятся дефектными. Кстати говоря (результат независимого эксперимента), как и ожидалось, делеции в пигментных нейронах клональны (каждый нейрон содержит главным образом делецию определенного типа, и разные нейроны содержат разные делеции), так что накопление делеций — это прогрессивный процесс экспансии клонов.

Эта работа была сделана при активном участии Лены Кудрявцевой (5-й выпуск биокласса). Более подробное описание можно найти в статье (Kraytsberg *et al.*, 2006).

Вопросы на будущее

Естественно, что эксперименты, описанные выше, — это только начало работы по выяснению роли мутаций митохондриальной ДНК в старении, в частности старении мозга. Следующий вопрос — действительно ли дефекты митохондриального метаболизма в пигментных нейронах имеют отношение к сенильному паркинсонизму? Мы собираемся сравнить частоту дефектов/мутаций в мозге индивидуумов, страдавших и не страдавших паркинсонизмом (соответствующие коллекции тканей уже собраны и доступны для исследований). Далее, желательно было бы узнать, в чем именно заключается механизм действия митохондриальных мутаций. Что собственно происходит, когда в клетке образовался клон мутантных митохондриальных ДНК? Видимо, электронная цепь в такой клетке остановится и перестанет производить АТФ. Как ни странно, многие типы клеток от этого не умирают. Более того, зачастую распознать такую клетку можно, только используя специальное гистологическое окрашивание: без него клетка выглядит совершенно нормальной. Дело в том, что есть другой способ получать АТФ, называемый гликолизом, который вполне удовлетворяет базовые нужды клеток. Может быть, нейронам недостаточно удовлетворения только базовых нужд, и гликолиз для них недостаточен, а может быть, механизм совсем другой: например, остановка электронной цепи усиливает производство радикалов и, таким образом, приводит

к интоксикации или нарушению регуляции самих дефектных нейронов или соседних клеток.

Возможно, конечно, что накопление митохондриальных мутаций — это вторичный процесс, непосредственного отношения к старению не имеющий. Впрочем, чтобы закончить наше повествование на оптимистичной ноте (оптимистичной? ... смотря как на это посмотреть...), отметим, что недавно было обнаружено, что в митохондриальной ДНК долгоживущих видов млекопитающих содержится меньше повторов (повтор — это когда одна и та же последовательность ДНК встречается в разных местах генома), чем у короткоживущих. Известно, что именно на повторах в основном и образуются делеции мтДНК, так что это наблюдение наводит на мысль, что делеции все-таки должны иметь отношение к ограничению продолжительности жизни, и, следовательно, старению. Так что не исключено, что вышеописанные исследования имеют смысл.

Литература

С удовольствием пошлю желающим любые из перечисленных ниже статей по электронной почте.

- Bennett D.A., Beckett L.A., Murray A.M., Shannon K.M., Goetz C.G., Pilgrim D.M., Evans D.A.** 1996. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people // *N. Engl. J. Med.*, 334: 71–76.
- Coller H.A., Bodyak N.D., Khrapko K.** 2002. Frequent Intracellular Clonal Expansions of Somatic mtDNA Mutations: Significance and Mechanisms // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 959: 434–447.
- Itoh K., Weis S., Mehraein P., Muller-Hocker J.** 1996. Cytochrome c oxidase defects of the human substantia nigra in normal aging // *Neurobiol. Aging*, 17: 843–848.
- Khrapko K., Kraytsberg Y., de Grey A.D., Vijg J., Schon E.A.** 2006. Does premature aging of the mtDNA mutator mouse prove that mtDNA mutations are involved in natural aging? // *Aging Cell*, 5: 279–282.
- Kraytsberg Y., Kudryavtseva E., McKee A.C., Geula C., Kowall N.W., Khrapko K.** 2006. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons // *Nat. Genet.*, 38: 518–520.
- Saccone C., Gissi C., Reyes A., Larizza A., Sbisà E., Pesole G.** 2002. Mitochondrial DNA in metazoa: degree of freedom in a frozen event // *Gene*, 286: 3–12.
- Soong N.W., Hinton D.R., Cortopassi G., Arnheim N.** 1992. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain // *Nat. Genet.*, 2: 318–323.