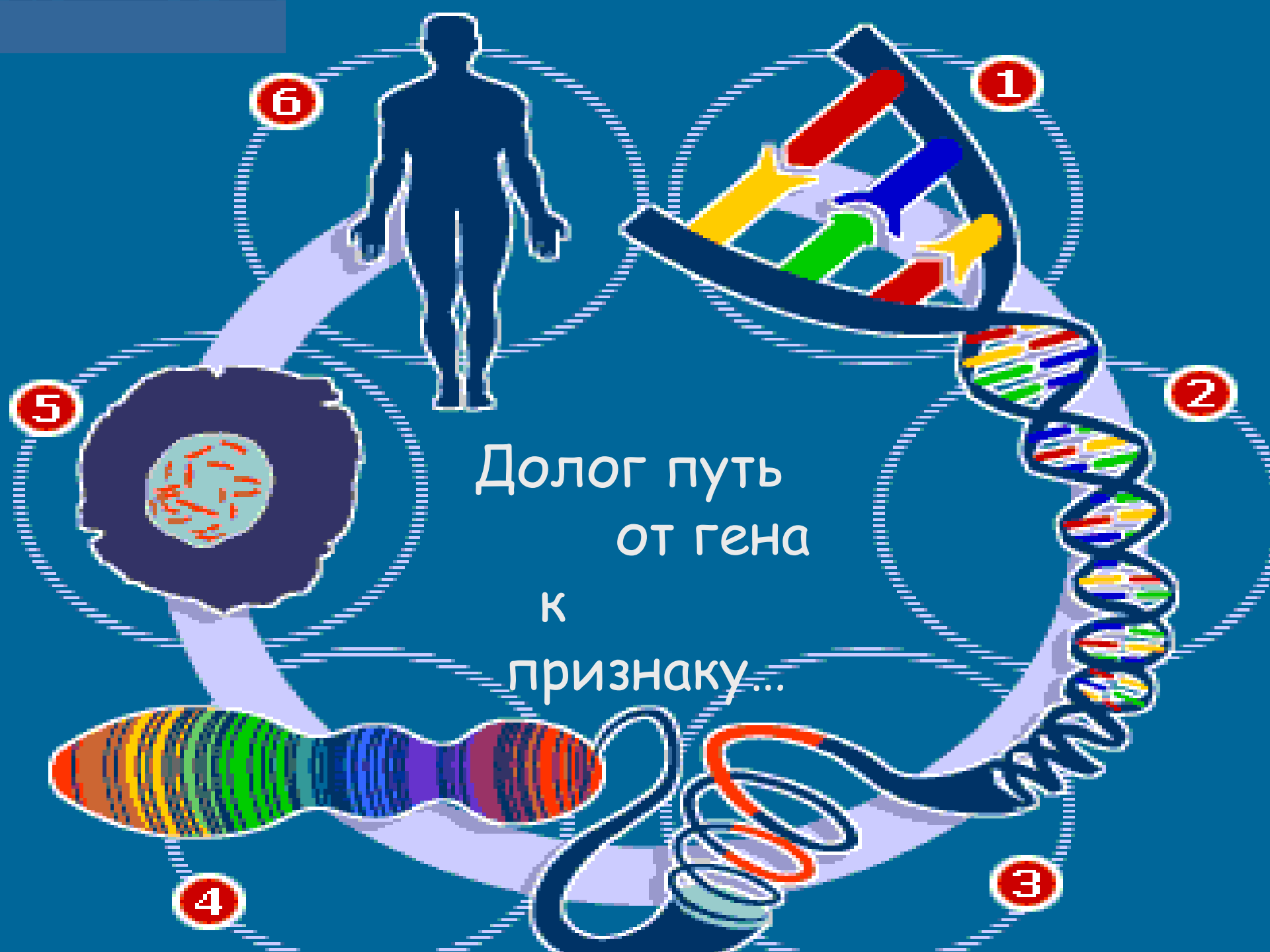


# Митохондриальный геном и болезни человека

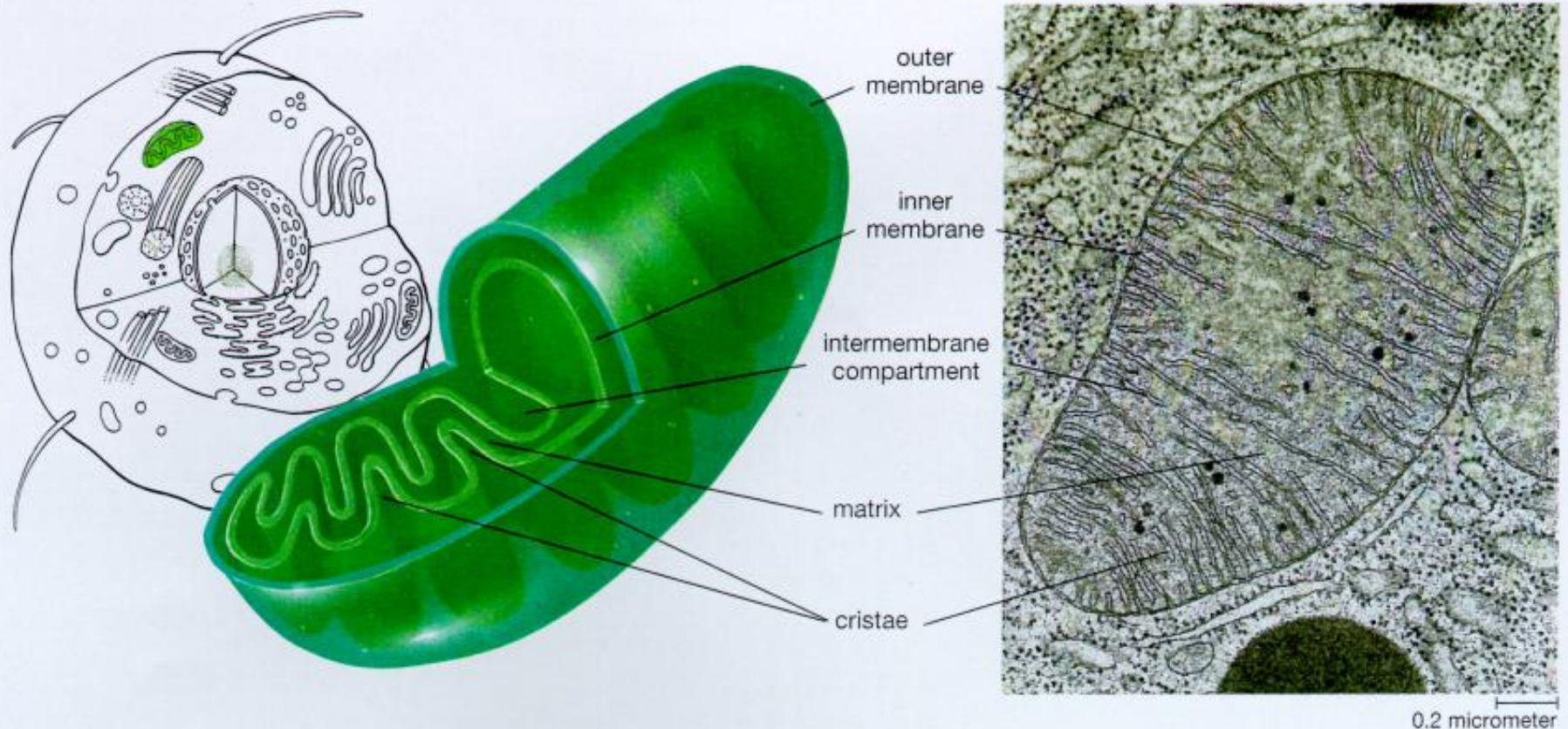
Лаборатория нехромосомной  
наследственности

Институт генетики и цитологии НАН Б

Долог путь  
от гена  
к  
признаку...



# Митохондрии в клетке, строение митохондрий



**Figure 5-17** The mitochondrion

Mitochondria consist of a pair of membranes enclosing two fluid compartments, the intermembrane compartment between the outer and inner membranes and the matrix within the inner membrane. The outer membrane is smooth, but the inner membrane loops back and forth to form deep folds called cristae. Mitochondria are the site of aerobic metabolism.



# Функции митохондрий

- Синтез АТФ - «энергетический центр» клетки (95% синтезируется в мт)
- Участие в метаболизме аминокислот, липидов, холестерина, стероидов, нуклеотидов
- Инициация процессов апоптоза (программируемой клеточной смерти)
- Регуляция экспрессии ядерного генома
- Участие в собственном воспроизведении

# Митохондриальный геном человека – 37 генов, 16. 569 пар нуклеотидов

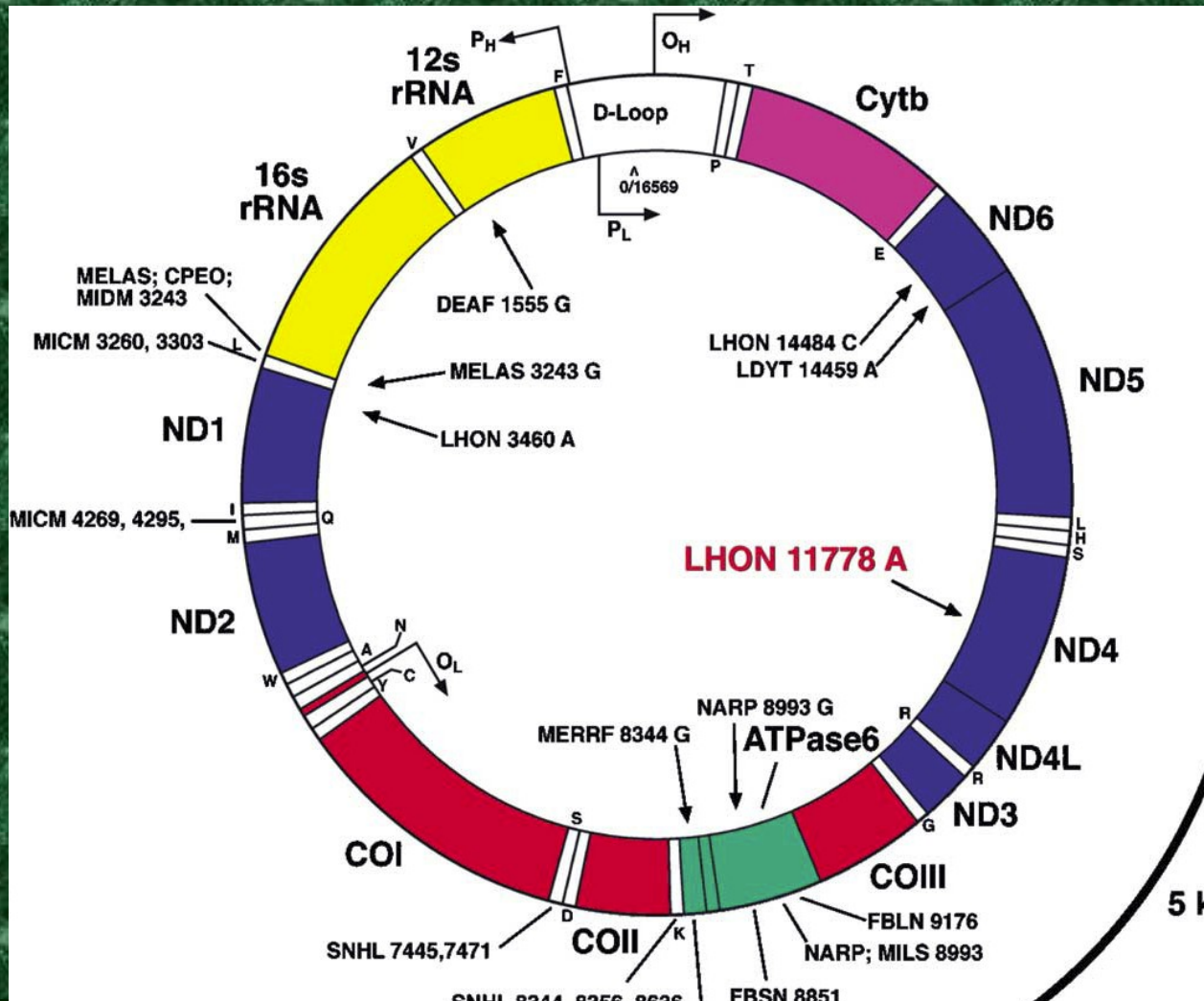
- 2 гена рибосомальной РНК
- 22 гена транспортной РНК
- 13 белок-кодирующих генов

Молекула ДНК замкнута в кольцо

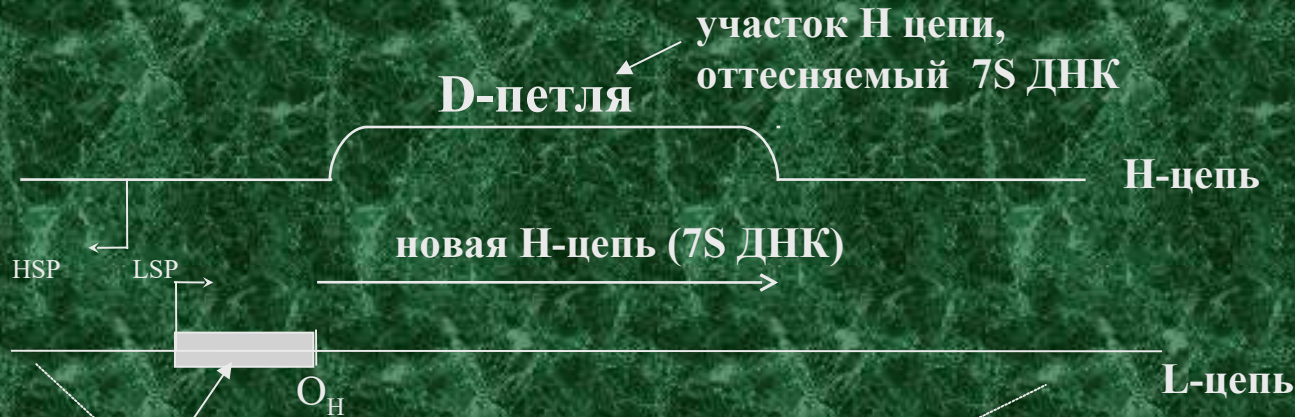
Гены расположены очень плотно, на обеих цепочках ДНК, иногда перекрываются



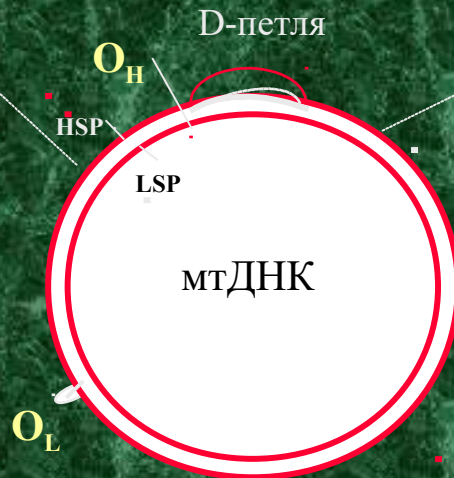
# Митохондриальный геном человека



# Репликация митохондриальной ДНК млекопитающих



Короткий РНК  
транскрипт с  
LSP –праймер  
для репликации  
H-цепи



- ДНК-репликация в митохондриях связана с транскрипцией;
- L- и H- цепи реплицируются с разных точек : O<sub>L</sub> и O<sub>H</sub>
- Молекула мтДНК в области D-петли трехнитчатая.



# ДНК-полимераза гамма( $\gamma$ )

состоит из двух субъединиц:

$\alpha$  - каталитической и  $\beta$  -дополнительной (accessory)

125 -140 kDa

35 - 54 kDa

Участвует в узнавании РНК-праймеров

Полимеразная активность

Экзонуклеазная активность  
**proofreading**: мутация в этой области уменьшает точность репликации

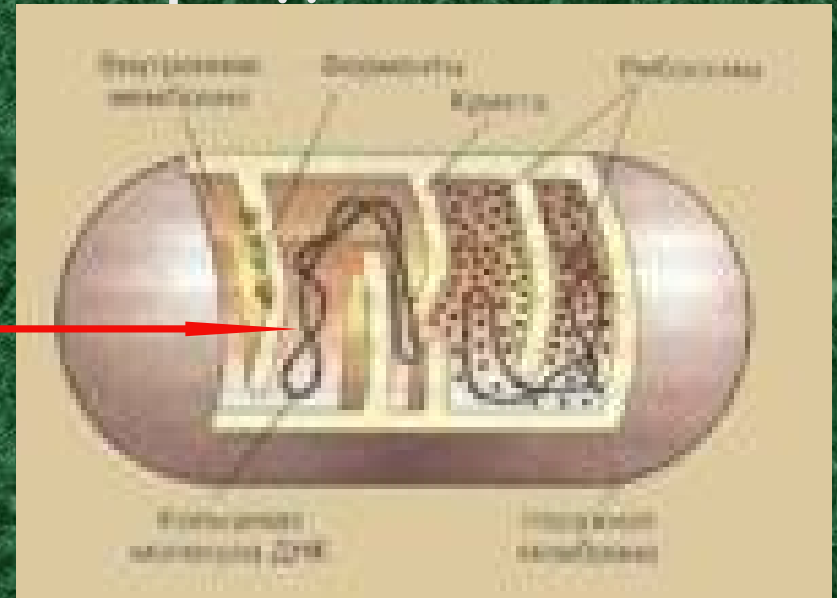


Первые митохондриальные заболевания были описаны раньше, чем открыта ДНК в митохондриях

**1958** - синдром Кернс-Сейра

**1962** Болезнь Люфта : не тироидальный гиперметаболизм  
(всего **2** случая за **40** лет)

**1963** Открыта ДНК в митохондриях



**1981** - расшифрован митохондриальный геном человека (Anderson et al)

**1988** - идентифицированы первые патогенные мутации мтДНК (Holt et al., Wallace et al).

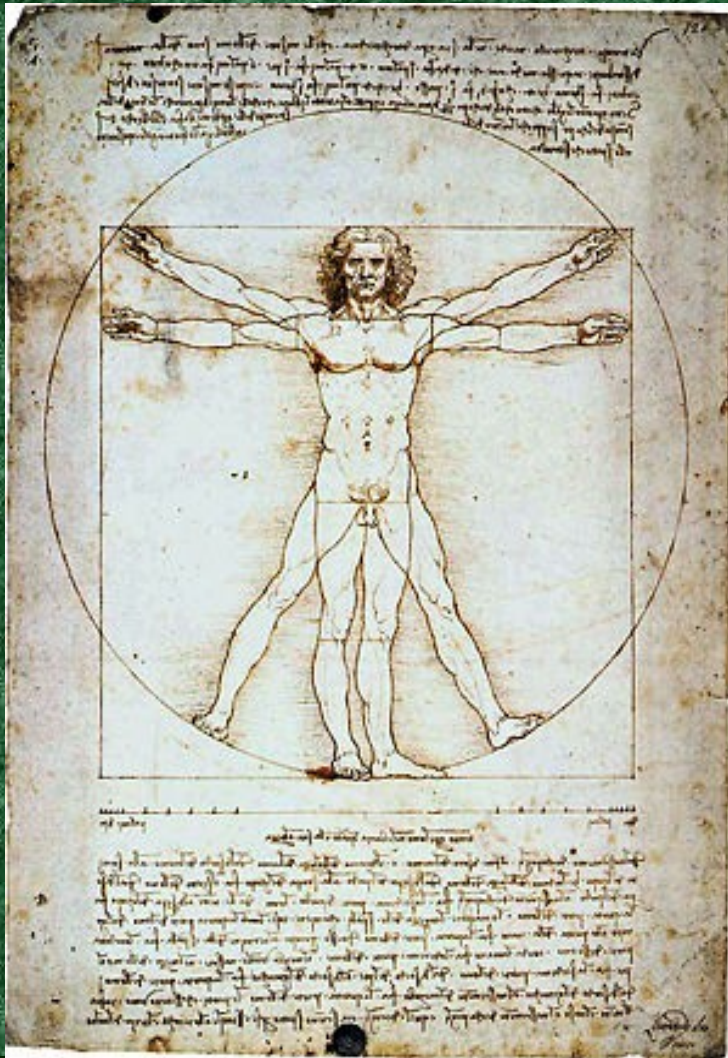
# Особенности митохондриальной наследственности

- Материнское наследование
- Мультикопийность геномов (сотни органелл, тысячи ДНК молекул)
- Гетероплазмия
- Митотическая сегрегация
- Пороговый эффект





# Ткани с низким порогом мутантной ДНК:



МОЗГ

сердце

скелетная мускулатура

сетчатка глаза

почечные канальцы

эндокринные железы

Клетки этих тканей  
наиболее метаболически  
активны, энергетически  
зависимы

В ядре  
~ **70 000** генов  
в двух копиях каждый

Гены составляют  
**менее 1%** от всей  
ядерной ДНК

В митохондриях  
**37** генов в  
тысячах копий  
каждый

Гены составляют **более  
92%** от всей  
митохондриальной ДНК





Мутации в митохондриальной ДНК человека происходят в пять раз чаще, чем в ядерной,

поскольку

Митохондрии поглощают более 90% клеточного кислорода;

Образуется большое количество ДНК-повреждающих свободных радикалов.

При этом

геном митохондрий не защищен гистоновыми белками;

- репарационные процессы в митохондриях менее совершенны, чем в ядре

В настоящее время описано

- более **190** патогенных точечных мутаций митохондриальной ДНК
- около **200** делеций, инсерций и других структурных реорганизаций мтДНК



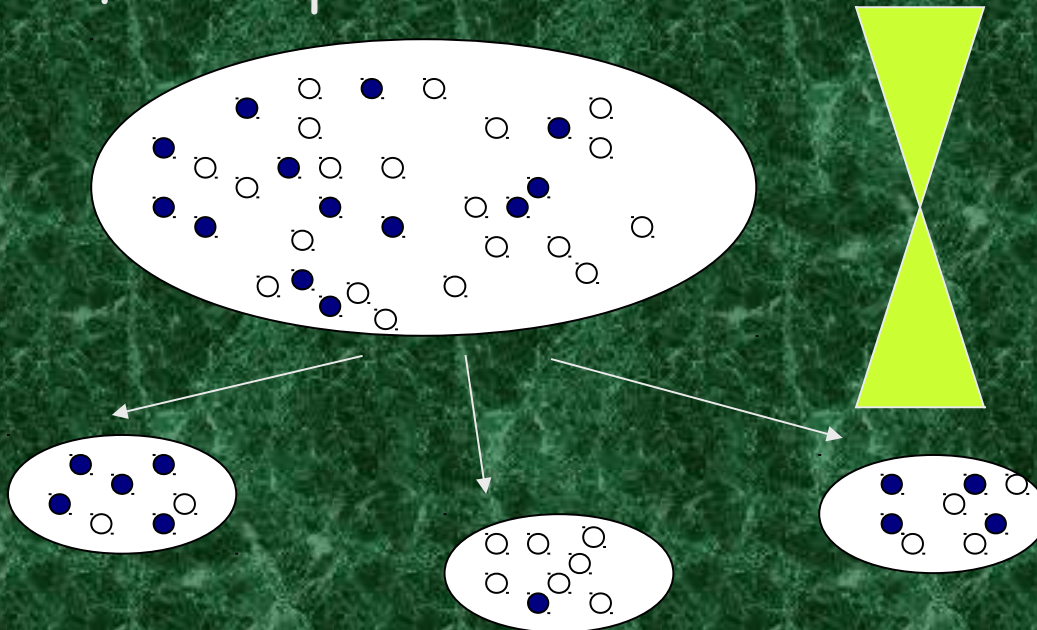
# Источники митохондриальных патологий:

- Изменения в генах **ядерного** кодирования (более 1000 генов кодируют мт белки)
- Изменения в генах **митохондриального** кодирования (37 генов)
- **Выпадения** участков мтДНК (делеции, множественные делеции)
- **Истощение** пула митохондриальной ДНК

# Особенности мутаций митохондриальных генов

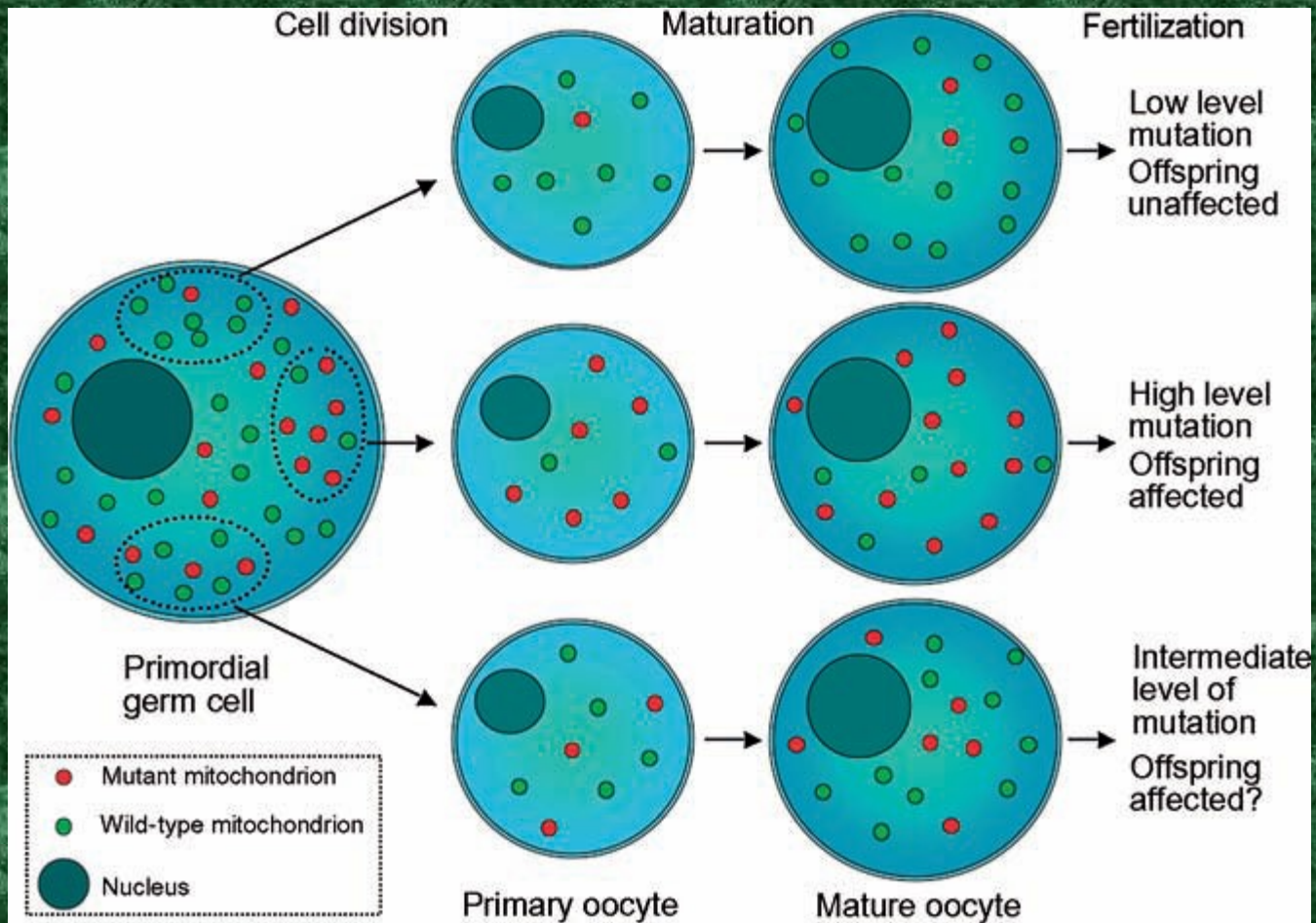
Одна из важнейших особенностей - **клиническое разнообразие сиблингов**.

Это - отражение **«эффекта бутылочного горлышка»**.  
Какое количество мутантных молекул попадет в ооцит на раннем этапе оогенеза - дело случая :





# Отсутствие механизма точного распределения митохондрий между отдельными клетками



# Особенности мутаций митохондриальных генов

Мутации могут затрагивать:

**специфические белки** – при точечных мутациях и малых делециях структурных генов,

а также **митохондриальный геном в целом**:

- большие делеции;
- мутации в генах тРНК;
- мутации в генах рРНК.

В результате мутаций наблюдается:

- Уменьшение синтеза **АТФ**
- Нарушение **кальциевого баланса** клетки
- Повышение количества **ROS** (reactive oxygen species)



Некоторые мутации ядерной ДНК могут приводить к мутациям митохондриальной ДНК:

ген ДНК-полимеразы гамма

(осуществляет синтез мтДНК);

ген тимидинфосфорилазы

(нарушает метаболизм тимидина);

ген *Twinkle* (участвует в поддержании целостности митохондриального

генома).

Информация о мутациях в этих генах накапливается стремительно

# Особенности мутации митохондриальных генов

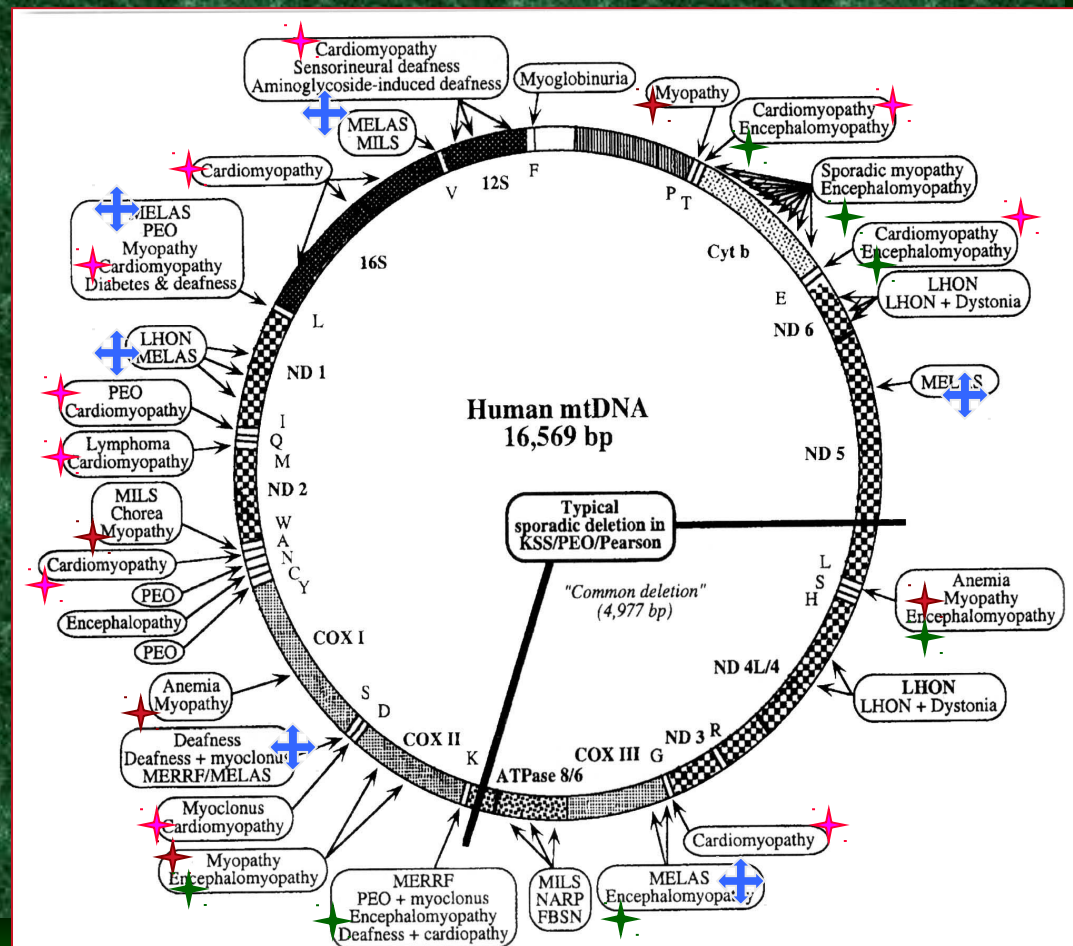
Строгая связь между сайтом мутации и клиническим фенотипом часто **отсутствует**:

Одна и та же мутация может вызывать **разные** симптомы.

Один и тот же клинический фенотип могут формировать **разные** мутации

Исключения:

**MERRF** синдром - мутации всегда в  $\text{TRNK}^{\text{Lys}}$  гене; **LHON** - мутации в генах **ND**



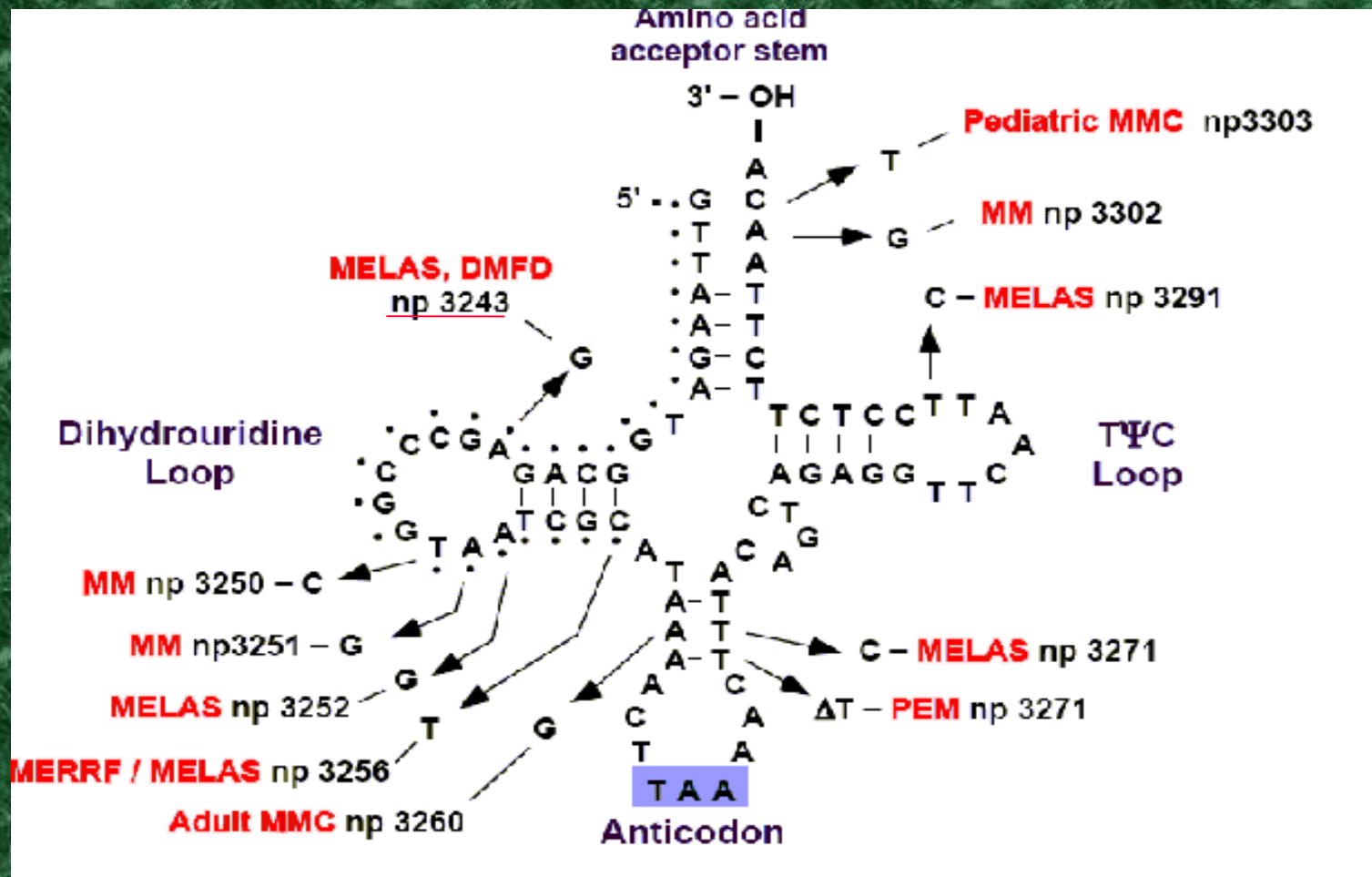


2/3 известных точечных мутаций  
мтДНК сосредоточены  
в тРНК генах (9% генома)



Больше всего мутантных точек  
выявлено в лейциновой тРНК

# Мутации лейциновой тРНК





## Примеры некоторых синдромов

Синдром Лебера: LHON (1871 г.)

- наследуемая по материнской линии потеря зрения происходит у людей 20-30 лет вследствие

- атрофии зрительного нерва и
- дегенерации ганглиозного слоя клеток ретины

Заболевание связано с передаваемой от матери мутацией митохондриальной ДНК в одном из ND генов (комплекс I).

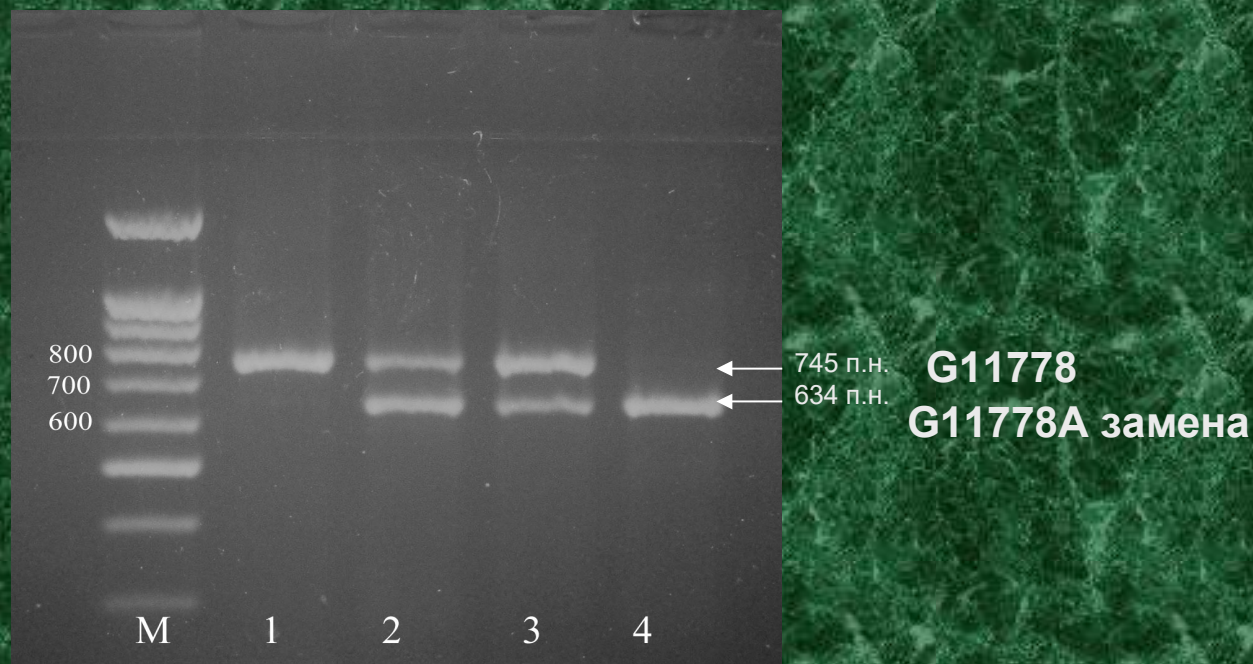
В 70% случаев это **G11778A** (ND4), а в Японии в 90%

в 13% случаев **G3460A** (ND1);

в 14% случаев **T14484C** (ND6)

Мутация находится в **ГОМОПЛАЗМАТИЧЕСКОМ** состоянии

ДНК-диагностика синдрома Лебера в семье N  
проведена нами впервые в 2006 году



здоровый  
человек

сестра  
пробанда

мать

пробанд с  
синдромом  
Лебера



## Загадки синдрома Лебера:

- ?? В 80-85% случаев поражаются мужчины  
(X хромосома несет какой-то локус чувствительности ?)  
Лишь у 50% мужчин и 10% женщин носителей патогенных мутаций комплекса I в действительности происходит потеря зрения
- ?? Чаще всего мутации, ведущие к синдрому Лебера, встречаются в мтДНК гаплогруппы J; эту группу несут около 15% европейцев
- ?? В формировании заболевания участвуют какие-то дополнительные факторы (???)

# Мутации генов транспортной РНК

Самая часто встречающаяся точечная мутация:  
**A3243G** в лейциновой тРНК

Обнаружена у большинства больных с синдромом



Мутация встречается исключительно в  
**гетероплазматическом** состоянии

???

В одних семьях **A3243G** вызывает преимущественно кардиомиопатию, в других – диабет и глухоту, в третьих РЕО, в четвертых – энцефалопатию



Впервые ДНК-диагностика синдрома MELAS была проведена нами в 2007 году

**Мама:** фенотипически здоровая женщина очень маленького роста

I брак

1ый ребенок  
1988-2000

Кардиопатия,  
ЗГПР, ЗФР.

Умерла  
скоропостижно  
после травмы

2ой ребенок  
1991-2007

Менингоэнцефалит

Умер от  
ишемического  
инфаркта обоих  
полушарий  
мозжечка

II брак

3ий ребенок  
родился в 1998  
Прогрессирующая  
миопатия,  
миокардио-  
дистрофия

**Митохондриопатия??**

**Обнаружена мутация MELAS у сына (80% мутантных молекул в крови) у мамы (40%)**

## Мутации генов транспортной РНК (продолжение)

Мутация **A8344G** в гене **лизиновой тРНК** при уровне мутантных молекул  $> 85\%$  приводит к синдрому **MERRF**:

Миоклонус-эпилепсия;

«рванные» красные мышечные волокна;

задержка умственного развития;

атаксия; атрофия мышц и др.

Мутация резко снижает эффективность трансляции в мт и тем самым провоцирует дефицит дыхательной цепи

Матери больных обычно фенотипически здоровы или несут слабо выраженные симптомы



# Мутации генов рибосомальной РНК

Чаще всего встречается мутация гена  
12S рРНК A1555G



Вызывает **несиндромную потерю слуха** из-за чувствительности носителей мутации к **ототоксическим аминогликозидам**

Другие мутации генов 12S и 16S вызывают **кардиомиопатию, атаксию, MELAS, диабет mellitus, сенсорно-невральная потерю слуха**

## Примеры некоторых синдромов

**NARP** (neuropathy ataxia and retinitis pigmentosa)

Мутация в гене **ATPase6** - трансверсия Т - G

в нуклеотиде 8993 (70-90% мутантной ДНК)

**T8993G**: лейцин замещается на аргинин в **ATPase6**,

что приводит к нарушению синтеза АТФ

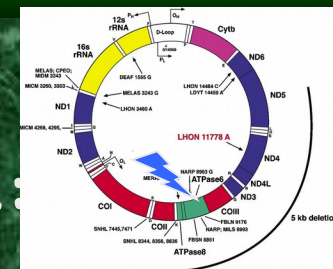
Если доля мтДНК больше 90%,

клиническое проявление наблюдается **раньше** и

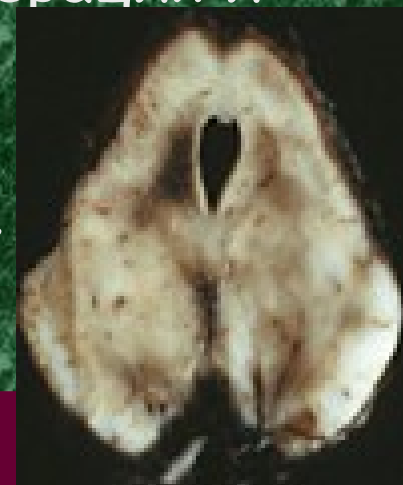
симптомы **более тяжелые**: подострая некротизирующая энцефалопатия с чертами **синдрома Лея (LS)**



# Синдром Лея – тяжелейшее нейродегенеративное заболевание:



- симметричные некротические повреждения в субкортикальных областях ЦНС – базальных ганглиях, таламусе, стволе мозга, спинном мозге;
- демиелинизация, сосудистая пролиферация и «глиозис»;
- моторная и умственная регрессия, атаксия, дистония, аномальное дыхание



Заболевание начинается в раннем  
детстве, редко во взрослом  
состоянии:

Смерть наступает обычно через два года после  
начала заболевания

2/10

случаев -  
мутации  
МИТОХОНДР.  
ДНК (MILS)

ATPase 6

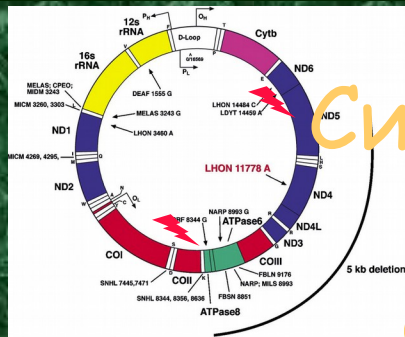
LS

1/10 случаев -  
мутации X-  
хромосомы

PDHC

7/10 случаев -  
рецессивные  
мутации **ядерных**  
**аутосомных** генов,  
кодирующих  
субъединицы  
дыхательной цепи  
или белки,  
участвующие в ее  
сборке





# Синдром Кернс-Сейра (KSS)


Причина - крупная делеция 5 т.п.н.  
 Утрачиваются 5 генов тРНК и 5 белковых генов

**KSS - фатальная мультисистемная патология,** проявляется в возрасте **4-18 лет:**

СРЕО, пигментный ретинит, атаксия, глухота, эндокринная дисфункция, атриовентрикулярная блокада сердца, повышение уровня белка в цереброспинальной жидкости выше 100 мг/дл, «рваные» волокна в скелетных мышцах

**Делеция не наследуется**

Та же делеция 5 т.п.н.  
вызывает еще 2 синдрома:



Синдром **PEO** -

Прогрессирующая  
наружная  
офтальмоплегия

Синдром Пирсона - **PS**

Гипопластическая анемия,  
нарушение экзокринной  
функции поджелудочной  
железы

Все три синдрома являются спорадическими,  
формируются в зависимости от сегрегации мутантных  
мтДНК с накоплением в разных тканях

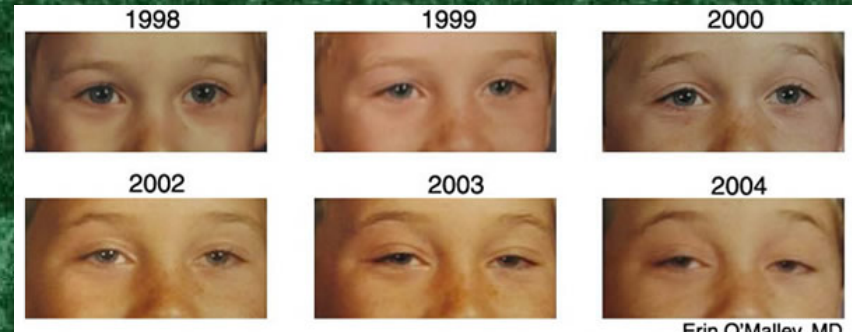


В случае этой же делеции в 5 тыс п.н. вместо фатального KSS может наблюдаться РЕО

↓  
Прогрессирующая наружная офтальмоплегия, птоз



Патология связана с параличом наружных глазодвигательных мышц



Процент мутантных молекул в этом случае меньше, чем при KSS синдроме, синдром не связан с угрозой для жизни больного

Биохимически в мышцах обнаруживаются дефекты ферментов дыхательной цепи, особенно **цитохромоксидазы**

# Синдром митохондриальной деплеции - MDS

В клетках остается **1 - 30%** от нормального количества мтДНК

Синдром проявляется в первые недели после рождения:  
фатальная гепатопатия;  
миопатия с генерализованной гипотонией;  
кардиомиопатия с судорогами (синдр. де-Тони-Дебре-Фанкони);  
атрофия проксимальных групп мышц;  
утрата сухожильных рефлексов.

**Смерть наступает в тяжелых случаях в первый год жизни**



# Патологии, вызванные изменением генов дыхательной цепи

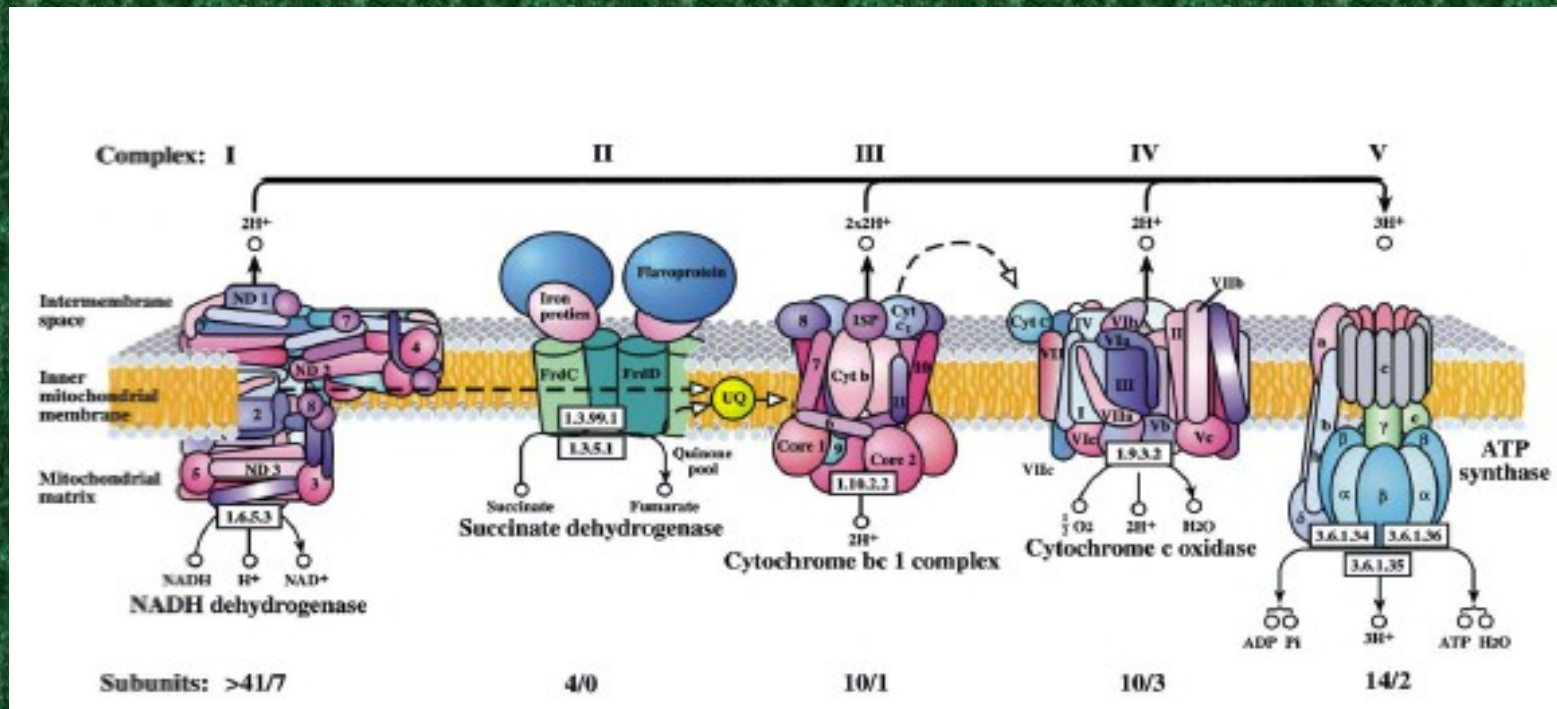
LHON  
 LHON+дистония  
 Sporadicкая миопатия

Спорадическая  
 миопатия

Спорадическая  
 миопатия  
 Энцефаломиопатия

NARP  
 MILS  
 FBSN

М

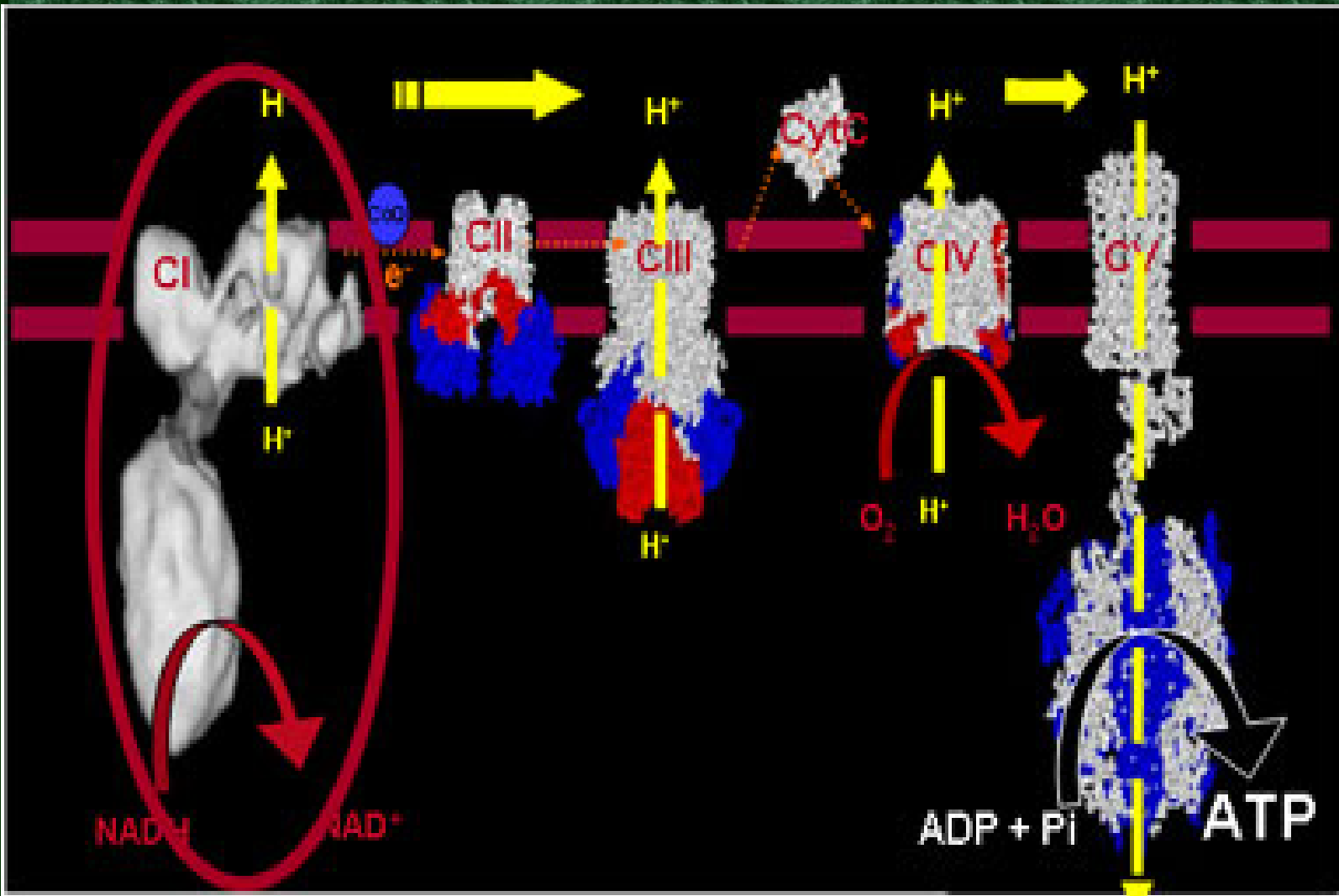


Я

Синдром Лея  
 Лейкодистрофия

Синдром Лея  
 Параганглиома

Синдром Лея  
 Кардиоэнцефалопатия  
 Лейкодистрофия/тубулопатия



OUT

Membrane

IN

NADH → NAD<sup>+</sup>

ADP + Pi → ATP

H<sup>+</sup>



# Как диагностировать митохондриальную аномалию?

При ясных симптомах - выделить кровь из вены и сделать ПЦР-анализ на точечные мутации или делеции

Если результат анализа крови отрицательный, это еще не значит отсутствия заболевания (гетероплазмия!)



Нужно взять биопсию: мышечную или кожную пробу

у взрослых

у детей

Для неинвазивного тестирования используют седимент мочи, соскоб внутренней поверхности щеки, реже волосяные фолликулы



# Как диагностировать митохондриальную аномалию? (2)

**Свежую мышцу** анализируют гистологически и гистохимически



«Рваные» мышечные волокна выявляются при окраске на сукцинатдегидрогеназную активность или с помощью Гомори "trichrome stain"

Проводятся измерения активности отдельных звеньев комплексов дыхательной цепи



свежая мышца

культура фибробластов

Если обнаруживается дефект в одном звене, это указывает на мутацию соответствующей субъединицы (я или м), если дефекты множественные – возможен дефект мт тРНК либо ядерных генов, участвующих в работе митохондрий



## Как диагностировать митохондриальную аномалию? (3)

Иногда дефект проявляется **при нагрузке** (NARP синдром при мутации гена ATPase6) - нужно клиническое тестирование:



физические нагрузки с замерами лактата, магнитно-резонансной или инфракрасной спектроскопией

Наконец, в случае еще не описанных, редких «private» мутаций проводят **прямое секвенирование мтДНК**

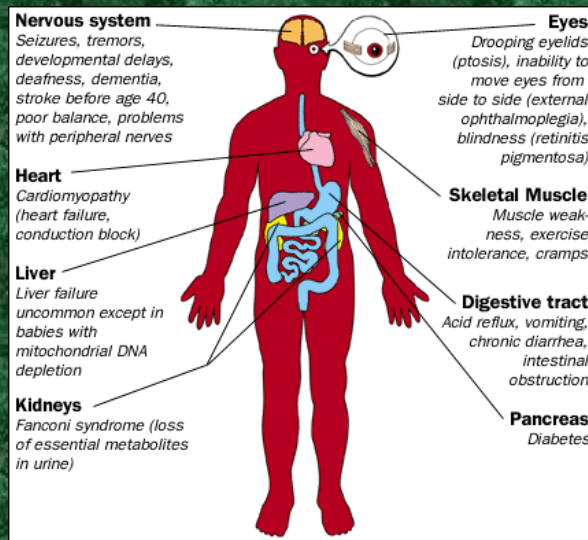
Типичны для митохондриальных заболеваний  
вовлеченность разных органов и одновременное  
проявление внешне не связанных между собой аномалий

Мигрени с  
мышечной  
слабостью

Наружная офтальмоплегия с  
нарушением проводимости  
сердечной мышцы и  
мозжечковой атаксией

Энцефало-  
миопатия с  
диабетом

Тошнота, рвота  
с оптической  
атрофией и  
кардиомиопатией



Диабет с  
глухотой

Низкорослость с  
миопатией и  
инсультподобными  
эпизодами

Глухота с наружной  
офтальмоплегией,  
птозом и  
ретинопатией

Эзокринная дисфункция  
поджелудочной железы  
с сидеробластной  
анемией

Задержка развития  
или потеря навыков  
и офтальмоплегия,  
офтальмопарез



Насколько часты митохондриальные болезни?

Частота митохондриальных энцефалопатий определяется примерно как 1 : 11.000

Общая частота митохондриальных заболеваний – как 1 : 8.000

Возраст манифестации митохондриальных заболеваний сильно варьирует



~ 50% - до 5 лет

~ 50 % после 5 лет

Смертность от митохондриальных заболеваний составляет 5-20% в год от даты манифестации

Если у больного митохондриопатия, то



после перенесенных инфекционных заболеваний его состояние может резко ухудшиться

также отягощают состояние

стресс,  
голодание,  
переохлаждение,  
продолжительная обездвиженность,  
прием седативных средств



Осторожно применять местную и общую анестезию!



# Лечение митохондриальных болезней - насколько это реально?

## Фармакологический подход

Витамины, кофакторы,  
«ловцы» свободных  
радикалов - для  
предотвращения  
повреждения  
дыхательной цепи

Наиболее успешный  
пример - **дихлорацетат**,  
применяемый для  
уменьшения лактоацидоза  
у пациентов с **MELAS**

**Успех частичный и  
временный, чаще  
терапия неэффективна**

## Лечение митохондриальных болезней (2)

Другой подход - уменьшить соотношение  
мутантная:нормальная мтДНК

**I. Увеличить** количество немутантных молекул путем  
«сдвига генов»

У некоторых больных с  
миопатией % мутантной  
мтДНК в сателлитных  
клетках ниже, чем в в  
скелетной мышце

← Обычно сателлитные  
клетки пролиферируют и  
сливаются со скелетными  
миофибриллами в ответ  
на стресс или упражнение

↓  
Индуцируется пролиферация  
сателлитных клеток в  
скелетных мышцах

→ Пропорция нормальных  
мтДНК молекул в  
мышце увеличивалась,  
дефект корректировался



## II. Уменьшить количество мутантных молекул мтДНК

Разработка синтетических молекул, **избирательно связывающихся** с мутантными ДНК и **блокирующих их репликацию**

Введение в митохондрии фермента **рестриктазы**, избирательно разрушающего мутантную ДНК

Успех достигнут пока только *in vitro*

## Лечение митохондриальных болезней (4)

### «Молекулярно-внутриклеточная реконструкция»

Импорт из цитоплазмы нормальных тРНК вместо дефектных митохондриальных

Замена дефектного комплекса дых. цепи на нормальный, полученный из другого организма (дрожжей)

Пересадка ядра яйцеклетки из мутантной цитоплазмы в нормальную

Все эти подходы - в стадии экспериментальной разработки



# Лечение митохондриальных болезней - насколько это реально?

Вылечить от митохондриального заболевания сегодня невозможно

Применяется **симптоматическое** лечение:

**Физическое** → Физиотерапия, аэробная гимнастика, умеренные и легкие нагрузки

**Фармакологическое** → Анти-эпилептические препараты, гормоны, витамины, метаболиты, кофакторы

**Хирургическое** → Блефаропластика, имплантация cochlear, трансплантация сердца, почек, печени, подкожная эндоскопическая гастротомия, cricopharyngeal миотомия



## Ряд препаратов провоцирует митохондриальные заболевания или отягощает их течение

Вальпроат: увеличивает частоту судорог при MELAS, гепатотоксичен

Аспирин, фенobarбитал

Кортикостероиды

Тетрациклин, хлорамфеникол

Аминогликозиды стрептомицин, гентамицин, амикацин, неомицин, канамицин - ототоксичны

Этамбутол ( провоцирует проявление LHON)

Статин ( провоцирует проявление MELAS)

Антиретровирусные препараты: AZT - zidovudine, doxorubicin вызывают деплецию мтДНК

Список далеко не полный!





Митохондриальные болезни еще предстоит научиться предупреждать и лечить