

УДК 575.174:599.9

## МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС В ЭВОЛЮЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

© 2004 г. Б. А. Малярчук

*Институт биологических проблем Севера, Дальневосточное отделение РАН, Магадан*

Рассмотрена проблема возникновения мутаций в митохондриальном геноме человека. С помощью филогенетического анализа изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК) впервые реконструированы мутационные спектры ГВС1 и ГВС2. Обоснован методический подход к выявлению гипервариабельных позиций главной некодирующей области мтДНК, по вариабельности выделены классы нуклеотидных позиций. Методами контекстного анализа ДНК определены основные механизмы генерирования мутаций в “горячих” точках мтДНК. Впервые сформулированы представления о преобладании контекст-зависимых механизмов возникновения мутаций в митохондриальном геноме человека.

Митохондрии – исключительно важные органеллы клетки, отвечающие за производство энергии в форме АТФ. Помимо этого, согласно последним данным, они участвуют в апоптозе и играют ключевую роль в отборе половых клеток при оплодотворении [30, 43, 67]. Исследования генетических особенностей митохондрий и изменчивости мтДНК человека и животных, выполненные за последние десятилетия, продемонстрировали широкие возможности этой генетической системы для получения новой информации об эволюционной и популяционной истории видов. Исследования изменчивости митохондриального генома человека позволили существенно расширить наши представления об эволюции человека, происхождении народов, молекулярных основах ряда наследственных заболеваний и процессах старения.

В то время как хромосомные гены представлены двумя копиями на клетку и наследуются в соответствии с законами Менделя, митохондриальные гены находятся в цитоплазматических органеллах, присутствуют в сотнях и тысячах копий на клетку и наследуются строго по материнской линии [31]. Материнский тип наследования мтДНК и отсутствие рекомбинации между молекулами приводят к эволюции митохондриальных геномов посредством последовательного накопления мутаций из поколения в поколение и стохастическому распределению мутантных форм мтДНК в процессе клеточных делений [31, 84]. В связи с этим мтДНК представляет собой достаточно простую генетическую систему для изучения макро- и микроэволюционных процессов.

Важное свойство ДНК митохондрий – высокий уровень изменчивости. Известно, что митохондриальный геном накапливает соматические мутации в течение всей жизни человека [84]. По

мере старения в различных тканях (скелетных мышцах, мозге, сердце) наблюдается увеличение количества делеций и других мутаций мтДНК [85]. В среднем количество мутантной мтДНК в клетках довольно мало (<2%), однако, индивидуальные клетки могут содержать высокие уровни мутантной ДНК определенного типа [13]. Превышение критического уровня таких молекул мтДНК в клетках (обычно этот уровень составляет 50–60%), как правило, уже приводит к дефектам в системе окислительного фосфорилирования митохондрий [84].

Начиная с первых исследований изменчивости мтДНК в популяциях человека и животных, было обнаружено, что митохондриальные гены, кодирующие белки, характеризуются повышенной (в 5–10 раз) изменчивостью по сравнению с генами ядерного генома [15]. Между тем, популяционные данные об изменчивости нуклеотидных последовательностей полных митохондриальных геномов человека показывают, что минимальная вариабельность характерна для генов тРНК и рРНК, в то время как изменчивость нуклеотидов в третьих позициях кодонов и гипервариабельном сегменте 1 превышает таковую для генов РНК в 4 и 20 раз, соответственно [28]. По данным [39], изменчивость главной некодирующей области мтДНК человека в 20 раз выше, чем остальной части генома.

Скорость эволюции является функцией двух переменных – мутационной скорости и доли мутаций, зафиксированных в геноме [15], т.е. высокая скорость эволюции мтДНК может объясняться либо повышенной скоростью накопления мутаций, либо более высокой интенсивностью фиксации мутаций, либо (что более вероятно) взаимодействием обоих параметров. Предположение о повышенной скорости накопления мута-

ций в мтДНК возникло давно [14], остается в силе до настоящего времени и подтверждается новыми данными по изменчивости мтДНК у различных животных.

Мутационные процессы в мтДНК имеют некоторые особенности. Это, во-первых, выраженное смещение мутационного спектра мтДНК в сторону транзиций, что может свидетельствовать об усиленном мутационном давлении [81], во-вторых, существенное (в 4–6 раз) превышение скорости накопления молчащих замен по отношению к смысловым заменам в мтДНК, что может указывать на высокую скорость фиксации нейтральных мутаций в мтДНК [42].

Основными факторами, способствующими увеличению скорости накопления мутаций в митохондриальных геномах, принято считать влияние на мтДНК продуктов окислительно-восстановительных реакций, интенсивно проходящих в митохондриях, несовершенство процесса репликации мтДНК, приводящего к ошибкам и отсутствие эффективной системы репарации ДНК в митохондриях.

#### ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В МИТОХОНДРИЯХ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОСНОВАНИЯ ДНК И МУТАГЕНЕЗ

Высокий уровень мутагенеза мтДНК может быть обусловлен в значительной мере окислительно-восстановительными процессами, катализируемыми ферментами дыхательной цепи и системы окислительного фосфорилирования митохондрий. Экспериментально показано, что ряд химических соединений оказывает влияние преимущественно на митохондриальный геном, а не на ядерную ДНК. Так, воздействие на крыс этилнитрозомочевинной приводит к двукратному увеличению уровня  $O^6$ -этил гуанина в мтДНК [75]. Появление высокого уровня алкилированных оснований мтДНК млекопитающих является результатом воздействия таких реагентов как N-метил-N-нитрозомочевина и N-нитрозодиметиламин [62]. Ряд полициклических ароматических соединений бензопиренового ряда также влияет преимущественно на мтДНК [11]. Как ни странно, в экспериментальных системах (например, в клетках HeLa) химические мутагены практически не приводят к повышению уровня митохондриальных мутаций [60]. Напротив, согласно данным исследований индуцированного мутагенеза мтДНК эмбриональных клеток почек человека воздействие УФ-излучения индуцирует митохондриальные мутации (преимущественно транзиции  $G \rightarrow A$ ) [65].

Ранее была обнаружена высокая скорость накопления модифицированных оснований мтДНК, обусловленная воздействием перекиси водорода,

супероксидных и гидроксильных радикалов, появление которых связано с процессом аэробного метаболизма митохондрий [37, 72]. В этой связи основными источниками эндогенного мутагенеза мтДНК считаются окислительно-восстановительные реакции, спонтанный гидролиз и реакции дезаминирования и метилирования ДНК. Известно, что в митохондриях находится примерно 90% клеточного кислорода, из них 2% конвертируется в супероксидные радикалы [12]. Супероксиды вызывают появление в митохондриях окисленных форм пуриновых и пиримидиновых оснований ДНК. Наиболее распространенным является 8-оксо-7,8-дигидродеоксигуанин (8-ОН-dG). В ряде исследований показано, что 8-ОН-dG накапливается в мтДНК со скоростью от  $1 \times 10^{-7}$  до  $1.3 \times 10^{-4}$  аддуктов на пару нуклеотидов [58, 72]. Важно отметить, что 8-ОН-dG индуцирует в мтДНК преимущественно трансверсии  $G \rightarrow T$  [47]. В том случае, когда при репликации ДНК 8-ОН-dG используется в качестве нуклеотидного субстрата, генерируются трансверсии  $A \rightarrow C$  [18].

Другой возможный продукт окислительных реакций ДНК в митохондриях – 5-гидроксицитозин (5-ОН-dC). Показано *in vitro*, что в ДНК он индуцирует преимущественно транзиции  $G \rightarrow A$  [27], однако, наличие 5-ОН-dC в клетках человека точно не установлено.

Еще один потенциальный механизм мутагенеза мтДНК связан с дезаминированием цитозина [1, 16, 29]. Известно, что дезаминирование цитозина приводит к накоплению в ДНК урацила, вследствие чего при репликации во вновь синтезированных цепях ДНК происходит встраивание комплементарного основания аденина. Эволюция ДНК, входе которой происходит смещение нуклеотидного состава в сторону  $A + T$ , может быть следствием отсутствия механизмов репарации дезаминированного цитозина или особенностей ДНК-полимераз, более эффективно использующих при репликации  $A$  и  $T$  [40]. Превращение цитозина в урацил вследствие реакции дезаминирования приводит к транзициям  $C \rightarrow T$  и  $G \rightarrow A$ , что выявлено для различных ДНК-полимераз многих организмов [48]. Исследования [29] показали, что интенсивность дезаминирования остатков цитозина в урацил с последующим генерированием транзиций  $C \rightarrow T$  зависит от длительности пребывания участков Н-цепи в одноцепочечном состоянии на стадии репликации мтДНК и, соответственно, от расстояния до  $O_{\text{riH}}$ , и она тем выше, чем ближе участок мтДНК расположен к  $O_{\text{riH}}$ .

Другим источником транзиций  $C \rightarrow T/G \rightarrow A$  в мтДНК млекопитающих (грызунов, человека) является гидролитическое дезаминирование 5-метилцитозина [63]. В исследованиях [23] показано, что в мтДНК метилированы 0.6–6% остатков цитозина, а скорость дезаминирования 5-метилци-

тозина в 3–4 раза больше, чем цитозина. Скорость же дезаминирования аденина в гипоксантин и гуанин в ксантин (приводящих к транзициям А → G) составляет всего 2% от скорости дезаминирования цитозина [48].

Установлено также, что в митохондриях находятся и другие метилированные основания – например, N<sup>7</sup>-метилгуанин, N<sup>3</sup>-метиладенин, O<sup>6</sup>-метилгуанин. Первые два генерируются в мтДНК со скоростью 10<sup>-5</sup> на пару нуклеотидов и приводят к формированию апуриновых сайтов в мтДНК, “заполнение” которых осуществляется в процессе репликации [66]. O<sup>6</sup>-метилгуанин приводит к транзициям G → A, однако содержание таких оснований в ДНК митохондрий неизвестно [58].

Апуриновые/апиримидиновые сайты (AP сайты) – важный источник мутагенеза мтДНК – появляются в результате спонтанной утраты оснований или же под воздействием окислительного стресса, неэнзиматических (гидролиз метилированных оснований) или энзиматических (под действием ДНК-гликозилаз) процессов, приводящих к повреждению ДНК. Сообщалось, что скорость накопления AP сайтов в мтДНК крыс и свиней составляет ~2 × 10<sup>-6</sup> на пару нуклеотидов [35]. Наименее интенсивно проходят процессы депуринизации ДНК – скорость депуринизации составляет всего 5% от скорости депуринизации, а утрата пуриновых оснований происходит со скоростью от 1.7 × 10<sup>-6</sup> до 3.3 × 10<sup>-7</sup> на пару нуклеотидов [48]. AP сайты, как правило, блокируют синтез ДНК, однако некоторые полимеразы, в том числе и митохондриальная ДНК полимеразы γ, способны обходить повреждения ДНК и заполнять “бреши” преимущественно адениновыми основаниями [69]. В результате в зависимости от природы поврежденного сайта такой тип мутагенеза приводит к появлению трансверсий G → T и A → T, а также транзиций G → A [49].

#### РЕПЛИКАЦИЯ МТДНК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Исследования процесса репликации мтДНК у животных были начаты в середине 60-х годов прошлого века с использованием методов электронной микроскопии и радиоавтографии в изолированных препаратах митохондрий из печени крыс и L-клеток мыши. К настоящему времени установлено, что митохондриальный геном животных реплицируется асинхронно [19]. В соответствии с моделью асинхронной репликации мтДНК сначала иницируется репликация тяжелой Н-цепи посредством синтеза праймерной РНК в области промотора транскрипции легкой L-цепи (PL). В результате происходит формирование 7S-фрагмента, комплементарного L-цепи главной некодирующей области мтДНК [38]. На электронных микрофотографиях замкнутых

кольцевых форм мтДНК в этом участке образуется “петля смещения”, или D-петля – трехнитчатая структура, в которой вновь синтезированный фрагмент длиной примерно 680 нуклеотидов присоединен водородными связями к родительской L-цепи. Синтез мтДНК с помощью митохондриальной ДНК-полимеразы γ сопровождается раскручиванием двойной спирали, т.е. для инициации репликации мтДНК не требуются разрывы в одной из цепей ДНК. Инициация синтеза легкой цепи начинается только после того, как реплицируется примерно 67% дочерней тяжелой цепи. Таким образом, в процессе репликации мтДНК Н-цепь достаточно продолжительное время остается в одноцепочечном виде.

Исследования показали, что механизмы репликации и транскрипции мтДНК достаточно консервативны у всех эукариотических организмов [76] и основными факторами в процессинге мтРНК являются РНКазы MRP и РНКазы Р. Первый из этих факторов очень важен для формирования праймерной РНК, необходимой для инициации репликации Н-цепи мтДНК. Синтез РНК в митохондриях осуществляется с помощью мтРНК-полимеразы, гены которой у различных эукариотических организмов гомологичны таковым у бактериофагов E. coli.

В соответствии с моделью репликации мтДНК у позвоночных животных [77] ее инициация начинается с формирования праймерной РНК, синтезируемой с промотора PL. Этот процесс активируется с помощью специального транскрипционного фактора mtTFA. Несмотря на то, что анализ мтДНК различных видов позвоночных выявил видоспецифичные особенности организации главной некодирующей области, которая является основным регуляторным участком мтДНК, конфигурация расположения функциональных элементов в мтДНК позвоночных сходна, что предполагает консервативность транскрипционно-зависимого механизма инициации репликации мтДНК.

Нестабильность митохондриального генома более всего изучена у дрожжей. Показано, что дефекты многих генов, кодируемых ядерным геномом, приводят к нестабильным фенотипам [76]. Многие из этих ядерных генов участвуют в процессе транскрипционно-зависимой репликации мтДНК: например, гены ДНК-полимеразы γ, ген MTF1, кодирующий фактор инициации транскрипции, ген RIM1, кодирующий митохондриальный белок для связывания с одноцепочечной ДНК (mtSSB), и многие другие (не менее 30 генов) [76]. В случае митохондриальных геномов животных мутации в ядерных генах, во-видимому, также влияют на функционирование митохондрий – наиболее ярко об этом свидетельствуют данные о митохондриальных болезнях человека [85]. Круг

ядерных генов, вовлеченных в формирование патологических фенотипов митохондрий, постоянно расширяется. Из них наиболее известны гены, кодирующие каталитические субъединицы мтРНК-и мтДНК-полимераз, транскрипционного фактора *mtTFA*, *mtSSB*, ДНК-лигазы III.

В отличие от ядерного генома, молекулы мтДНК разрушаются в митохондриях независимо от стадии клеточного цикла, в связи с чем в репликации может участвовать лишь их часть, причем репликация мтДНК начинается в первую очередь в митохондриях перинуклеарного пространства [21]. Первоначально предполагалось, что делетированные молекулы мтДНК могут накапливаться в клетках, поскольку меньшие по размеру молекулы мтДНК должны реплицироваться быстрее, чем мтДНК дикого типа [84]. Однако дальнейшие исследования показали, что репликация мтДНК не лимитируется скоростью этого процесса (процесс репликации мтДНК завершается в течение <90 минут), в связи с чем более быстрая репликация делетированных молекул не должна оказывать существенного влияния на соотношение делетированных молекул и молекул ДНК дикого типа в митохондриях [77]. Более того, гипотеза о замещении мтДНК делетированными молекулами за счет более высокой скорости их репликации не может объяснить, каким образом происходит увеличение количества молекул мтДНК с точечными нуклетидными например, в тканях пациентов с митохондриальными болезнями. Другие гипотезы (их обзор см. в [25]) предполагают наличие селективных механизмов, с помощью которых мутантные молекулы мтДНК либо получают преимущество на стадии репликации, либо подвергаются элиминации с меньшей интенсивностью, чем молекулы мтДНК дикого типа. Эти гипотезы сложно проверить экспериментально: известно, что молекулы мтДНК характеризуются временем полураспада ( $T_{1/2}$ ), равным 10 дням, однако, существуют ли различия между значениями  $T_{1/2}$  для мтДНК мутантного и дикого типов пока неизвестно.

Наиболее вероятной к настоящему времени представляется модель случайного внутриклеточного дрейфа, объясняющая клональную экспансию мутаций мтДНК. Компьютерное моделирование процесса распространения патологических мутаций мтДНК в клетках выполнено в работе [25]. В качестве примера была выбрана делеция в гене цитохром-с-оксидазы (СОХ), присутствие которой более чем в 50–60% молекул мтДНК уже вызывает биохимические дефекты митохондрий, что проявляется в соответствующей клинической картине – СОХ-дефиците [34]. Показано, что модель “расслабленной” репликации мтДНК, в соответствии с которой в репликации участвует лишь часть молекул [77], в сочетании с дрейфом в популяции молекул мтДНК может объ-

яснить быстрое распространение мутантной молекулы мтДНК без допущений о репликативном преимуществе в синтезе “укороченных” молекул мтДНК. Моделирование распространения мутации в одной из молекул мтДНК на протяжении 80 лет жизни индивидуума выявило также, что наиболее критическим периодом жизни является детство и юность – например, 46% мутантных мтДНК наблюдается в клетках 15-ти летних индивидуумов. Мутации, возникшие в более позднем возрасте практически не имеют шанса достичь критического уровня (50–60%) своего содержания в клетках к старости (т.е. к 80 годам жизни согласно модели) [25]. Этот вывод не согласуется с гипотезой “порочного круга” [85], утверждающей, что все мутации мтДНК аккумулируются к старости (и в старости) вследствие возрастного ослабления эффективности дыхательных цепей митохондрий, приводящего к увеличению продукции свободных радикалов в митохондриях, повреждающих мтДНК и так далее. Между тем, результаты моделирования процессов распространения мутации в популяции мтДНК хорошо согласуются с экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что лишь менее 5% постмитотических клеток мозга и мышечной ткани у здоровых стареющих людей, достигших 80 лет, характеризуются признаками развития СОХ-дефицита [25].

#### РЕПАРАЦИЯ МТДНК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

К числу причин, объясняющих быструю эволюцию мтДНК, часто относят низкую эффективность систем репарации митохондриального генома [20]. Между тем репарация нуклеотидных замен типа трансверсий, по всей видимости, осуществляется достаточно эффективно с учетом того, что трансверсии в спектрах мутаций мтДНК человека наблюдаются довольно редко – в среднем, на порядок реже, чем транзиции [17, 51].

Длительное время считалось, что в митохондриях животных отсутствуют ферменты, необходимые для узнавания повреждений нуклеотидов и выполнения точной репарации ДНК [20]. Поэтому предполагалось, что вследствие высокой копияности ДНК в митохондриях поврежденные молекулы просто элиминируются из популяции (клона) мтДНК [5, 41]. Однако к настоящему времени установлено, что митохондрии высших организмов содержат практически все компоненты, требуемые для репарации поврежденных оснований нуклеотидов [11, 41]. Одним из примеров репарации мтДНК являются результаты [22], авторы которого с помощью лигазной ПЦР показали полное удаление окисленных оснований мтДНК крысы за 8 часов. Обнаружено также, что комбинация ферментов, выделенных из митохондрий X.

laevis, способна эффективно репарировать апуриновые/апиримидиновые сайты (AP сайты) мтДНК [68].

Процессы спонтанной утраты оснований нуклеотидов или их модификации вследствие реакций окисления и алкилирования относятся к числу наиболее распространенных в митохондриях, что связано с основной функцией этих органелл клетки – работой электронно-транспортной системы [22, 48]. Наличие в митохондриях млекопитающих ДНК-гликозилаз (например, урацил-ДНК гликозилазы и 8-оксогуанин-ДНК гликозилазы) свидетельствует о том, что удаление поврежденных оснований в мтДНК осуществляется энзиматическим путем. Показано также, что репарационная система митохондрий включает и необходимые для репарации поврежденных оснований ДНК – AP-эндонуклеазу и AP-лиазу, обеспечивающие разрезание цепи ДНК и последующее удаление нуклеотидов с поврежденными основаниями [11]. Установлено, что лиазную активность проявляет каталитическая субъединица ДНК-полимеразы  $\gamma$ , с помощью которой осуществляется синтез ДНК в митохондриях [68]. ДНК-лигаза также была обнаружена в митохондриях [11, 68]. Таким образом, исследования показали, что в митохондриях может происходить репарация модифицированных нуклеотидных оснований, например, таких как 5-метилцитозин, продукт дезаминирования которого может быть репарирован с участием урацил-ДНК гликозилазы [48]. Интересно, что в митохондриях, геном которых составляет лишь 0.1% от клеточной ДНК, находится избыточное количество этого фермента, составляющее примерно 25% общей активности урацил-ДНК гликозилазы в клетке [11]. Известно, что в митохондриях возможно удаление и других метилированных оснований ДНК. Например, остатки O<sup>6</sup>-метил- или этилгуанина репарируются в митохондриях клеток печени крысы с помощью O<sup>6</sup>-метилгуанин метилтрансферазы, которая вероятно в случае необходимости может транспортироваться из ядра в митохондрии [62].

Однако другие репарационные системы, имеющиеся в клетке для репарации ядерной ДНК, в митохондриях, по-видимому, отсутствуют. В клетках млекопитающих до сих пор не обнаружены ферменты, участвующие в пострепликационной mismatch-репарации мтДНК (MMR-системы репарации). Лишь у дрожжей идентифицированы белковые гомологи бактериальных ферментов MutS и MSH1, которые могут быть транспортированы в митохондрии [70]. Таким образом, практически полное отсутствие в митохондриях ферментов системы mismatch-репарации позволяет считать, что мутационные спектры мтДНК в большой степени обусловлены репликационными ошибками ДНК-полимеразы  $\gamma$ .

Установлено, что в митохондриях не репарируются пиримидиновые димеры и продукты взаимодействия химических канцерогенов с мтДНК. Также не обнаружены пока компоненты системы, необходимой для репарации коротких делеций и инсерций [11]. Возможно, по этой причине делеции и инсерции имеют определенную распространенность в мутационных спектрах мтДНК. Так, делеции мтДНК часто наблюдаются при наследственных митохондриальных заболеваниях человека, а также сопровождают процессы старения [84, 85].

Отсутствие гистонов или негистоновых белков, способных защитить молекулы мтДНК от поражающего воздействия продуктов окислительно-восстановительных реакций, активно протекающих в митохондриях, также долгое время считалось одной из причин, объясняющих повышенную интенсивность накопления мутаций в мтДНК. Однако исследования последних лет убедительно доказали, что подобную защитную функцию первичной структуры мтДНК выполняет мультифункциональный белок TFAM (или mtTFA). Он неспецифически взаимодействует с различными участками молекулы мтДНК, покрывая ее в итоге всю целиком, и проявляет повышенное сродство с промоторным регионом мтДНК, поврежденными нуклеотидами и участками палиндромно-шпильчатых структур. Предполагается, что именно связывание белка TFAM с поврежденными основаниями (например, с 8-ОН-dG) инициирует механизм селективной деградации поврежденных молекул мтДНК [41].

#### ОСОБЕННОСТИ МУТАЦИОННОГО СПЕКТРА МТДНК ЧЕЛОВЕКА

Одной из особенностей мутационных спектров мтДНК животных и человека является преобладание транзиций над трансверсиями. Эта особенность характерна и для спектров мутаций бактериальной и ядерной ДНК [40], однако, лишь в случае спектров мтДНК преобладание транзиций над трансверсиями выражено в значительной степени – например, до 30 : 1 у человека. Другая особенность мутационного спектра мтДНК – гомоплазия мутаций, приводящая к многократному появлению идентичных, но независимых по происхождению, мутаций в определенных нуклеотидных позициях. Эта особенность обусловлена высокой скоростью накопления мутаций в мтДНК, особенно в ее некодирующей области [8].

Уже первые сравнительно-эволюционные исследования мтДНК животных [15] показали, что гомоплазия мутаций влияет на степень дивергенции между сравниваемыми видами, а множественные мутации, возникшие в процессе эволюции видов независимо и в разное время в идентичных нуклеотидных позициях, являются важной осо-

бенностью мутагенеза мтДНК и требуют всестороннего изучения [15]. Установлено также, что гомоплазия мутаций играет существенную роль в эволюционной динамике главной некодирующей области мтДНК [8], причем в этом случае эффект гомоплазии сказывается не только при сопоставлении мтДНК различных групп организмов, но и в пределах одного вида [80]. Полногеномный анализ изменчивости мтДНК человека показал, например, существование небольшого избытка гомоплазии мутаций – отношение наблюдаемого к ожидаемому числу параллельных мутаций составило 1.6 для  $n = 66$  геномов [24]. Однако кодирующие участки митохондриального генома человека и главная некодирующая область принципиально различаются по частоте появления параллельных мутаций – в главной некодирующей области частота гомоплазии в 31 раз выше, чем в кодирующей мтДНК по данным [28] и в 11 раз выше [52]. Следует отметить, что высокая частота гомоплазии в ГВС1 мтДНК человека предполагалась и ранее при исследовании рестрикционного полиморфизма кодирующих участков мтДНК и изменчивости нуклеотидных последовательностей ГВС1 [53, 55], а также в филогенетическом исследовании изменчивости нуклеотидных последовательностей ГВС1 мтДНК [26, 33, 59, 83].

С использованием методов филогенетического анализа к настоящему времени установлено, что в мтДНК существуют “горячие” точки – нуклеотидные позиции, которые характеризуются повышенной скоростью прямых и обратных мутаций [2, 3, 9, 26, 33, 55, 57, 59, 83]. Гипервариабельность нуклеотидных позиций приводит к появлению идентичных (параллельных) мутаций в филогенетически неродственных типах мтДНК, что может повлиять на оценки степени сходства между последовательностями мтДНК. Материалом для исследований распределения переменных позиций вдоль ГВС1 мтДНК служат, как правило, данные о нуклеотидных последовательностях этого участка генома в различных популяциях человека, объединенные в единую суммарную выборку [26, 33, 59, 83]. Однако такой подход не может дать реальную картину распределения гипервариабельных позиций в мтДНК, так как одной лишь информации об изменчивости нуклеотидных последовательностей ГВС1 недостаточно для выявления с помощью методов филогенетического анализа групп типов мтДНК, родственных по происхождению. Более точную оценку распределения “горячих” точек в ГВС1 мтДНК может дать сравнительный анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей ГВС1, объединенных в монофилетические кластеры мтДНК (группы мтДНК) на основании данных о рестрикционном полиморфизме кодирующих участков мтДНК [3, 57].

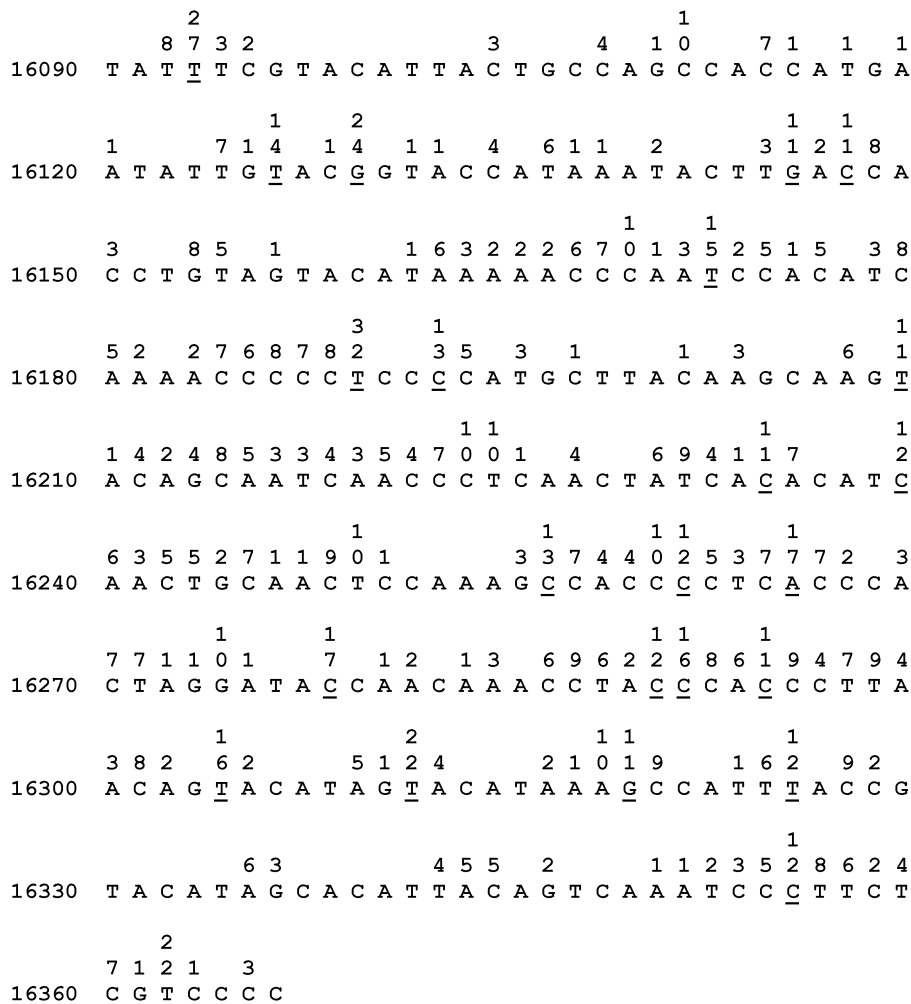
## АНАЛИЗ МУТАЦИОННЫХ СПЕКТРОВ ГЛАВНОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ МТДНК ЧЕЛОВЕКА

Анализ изменчивости и поиск “горячих” точек в гипервариабельных сегментах 1 и 2 (ГВС1 и 2) мтДНК состоял из следующих этапов: (1) кластеризация нуклеотидных последовательностей мтДНК в монофилетические кластеры (т.е. группы типов мтДНК, родственных по происхождению) на основании данных рестрикционного анализа кодирующих участков митохондриального генома; (2) поиск переменных позиций ГВС1 и 2 в пределах каждой из групп типов мтДНК; (3) оценка частоты встречаемости определенных переменных позиций ГВС1 в различных группах типов мтДНК.

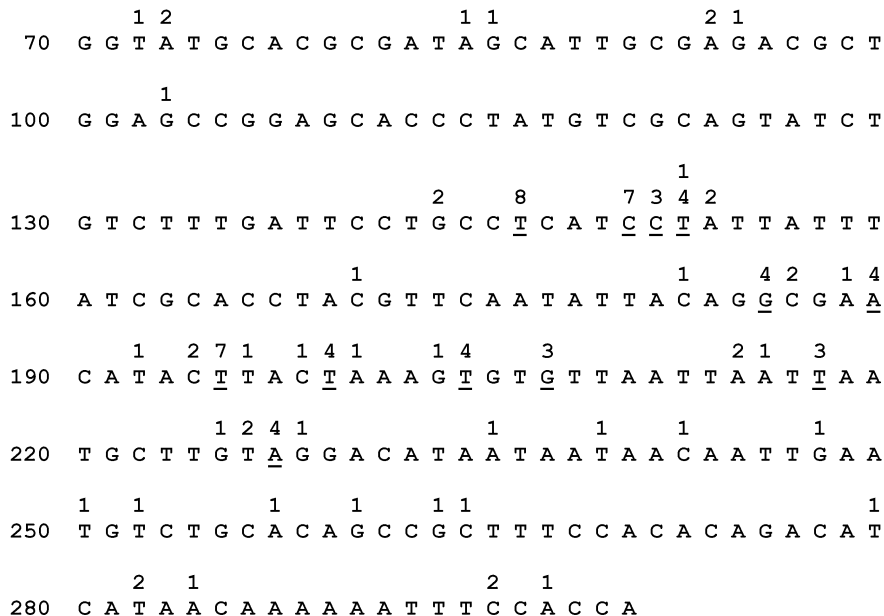
Проанализированы два набора популяционных данных. Изменчивость ГВС1 мтДНК изучена в выборке из 4072 нуклеотидных последовательностей (между позициями 16092 и 16365 в соответствии с нумерацией, предложенной в работе [7]), выявленных в популяциях Евразии и относящихся к 34 группам и подгруппам мтДНК согласно [71] – A, B, C, D, E, F, H, HV\*, I, J, K, M\*, M1, N1a, N1b, N1c, N\*, pre-HV, R\*, T, U\*, U1-U8, V, W, X, Y, Z. Изменчивость ГВС2 (между позициями 72 и 297) исследована в выборке из 735 индивидуальных последовательностей из популяций Европы и Южной Америки [6, 28, 36]. ГВС2-типы мтДНК относились к 22 группам и подгруппам мтДНК – H, pre-V, V, HV\*, J, T, X, I, W, K, U\*, U2, U4-U8, A, B, C, D, Z. Во всех случаях в анализе не учитывались точечные инсерции и делеции, а также трансверсии в нестабильном  $(A)_n(Py)_m$ -тракте, расположенном между позициями 16184 и 16193.

На рис. 1 и 2 показаны реконструированные мутационные спектры ГВС1 и ГВС2 мтДНК. Спектр ГВС1 представлен 1051 нуклеотидной заменой в 276 сайтах, а спектр ГВС2 – всего 115 мутациями в 231 сайте. Частоты мутаций в спектрах мтДНК оказались неравными (табл. 1), однако, оба спектра характеризуются выраженным смещением в сторону транзиций. Из транзиций в обоих спектрах мтДНК наиболее распространены пиримидиновые замены. Следует отметить, что полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований [51, 59, 79].

Анализ мутационного спектра ГВС1, проведенный с помощью программы CLUSTERM [32], позволил выявить четыре класса нуклеотидных сайтов. В первый класс входят очевидные “холодные” сайты, в которых наблюдается от 0 до 2 независимых (параллельных) мутаций на сайт. Второй класс включает сайты, в которых зарегистрировано от 0 до 10 мутаций на сайт, третий – от 5 до 17, а четвертый – от 16 до 32 параллельных мутаций на сайт. Во всех случаях различия между наблюдаемыми и ожидаемыми распределениями частот параллельных мутаций на сайт были недо-



**Рис. 1.** Спектр мутаций в GVC1 мтДНК человека. Числа над нуклеотидными основаниями показывают количество независимых мутаций, произошедших в филогенетических группах мтДНК. “Горячие” точки подчеркнуты.



**Рис. 2.** Спектр мутаций в GVC2 мтДНК человека. Обозначения – см. рис.1.

**Таблица 1.** Частоты транзиций и трансверсий в спектрах ГВС1 и ГВС2 мтДНК человека

Тип мутации	ГВС1	ГВС2
Транзиции (s)		
C → T	440	21
T → C	313	51
A → G	145	23
G → A	80	19
Pu → Pu : Pu → Pu	3.35 : 1	1.71 : 1
Трансверсии (v)		
A → C	20	1
T → G	2	0
A → T	15	0
T → A	0	0
G → T	0	0
C → A	19	0
G → C	4	0
C → G	13	0
Соотношение s/v	13.4 : 1	114 : 1

стоверными ( $P = 0.63$  для четырех распределений Пуассона).

Под “горячими” точками понимаются лишь те сайты, которые с вероятностью более 95% относятся к классам “горячих” точек, т.е. классам, в которых наблюдаются наиболее высокие частоты параллельных мутаций [32, 73]. Для класса 3 “горячими” точками являются позиции, характеризующиеся появлением более чем 10 параллельных мутаций на сайт ( $P \geq 0.95$ ), а пороговое значение для определения “горячих” точек в ГВС1 мтДНК составляет 11 мутаций. В табл. 2 приведены нуклеотидные позиции ГВС1 – “горячие” точки.

Аналогичный анализ мутационного спектра ГВС2 мтДНК позволил выявить три класса позиций. В этом случае различия между наблюдаемыми и ожидаемыми распределениями частот параллельных мутаций на сайт также были статистически недостоверными ( $P = 0.34$  для трех распределений Пуассона). Первый класс включает “холодные” сайты с числом мутаций от 0 до 2, второй – позиции с числом параллельных мутаций от 0 до 8; третий класс содержит лишь одну

позицию с 14 мутациями на сайт. Однако недостаток популяционных данных по изменчивости ГВС2 и ПДРФ мтДНК обусловил то, что второй класс оказался гетерогенным – наряду с позициями, в которых наблюдаются параллельные мутации, содержит и довольно консервативные сайты. Тем не менее, в ГВС2 имеется 12 нуклеотидных позиций с пороговым значением, равным 3 параллельным мутациям на сайт (рис. 2). Наиболее высокие частоты параллельных мутаций характерны для позиций 146, 150, 152, 185, 189, 195, 199, 204, 227.

Анализ филогенетически реконструированных спектров ГВС1 и 2 мтДНК позволил классифицировать нуклеотидные позиции в зависимости от скорости мутаций в них и выявить классы “горячих” точек, а также представить списки “горячих” точек мтДНК. Важно отметить, что участки ГВС1 и ГВС2 различаются по интенсивности возникновения параллельных мутаций – в ГВС1 наблюдается большее число параллельных мутаций, а ГВС2 в большей степени подвержен влиянию гомоплазии по числу параллельных мутаций на сайт, и сконцентрированы они лишь в нескольких “горячих” точках [56].

### МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГВС1 И ГВС2 МТДНК

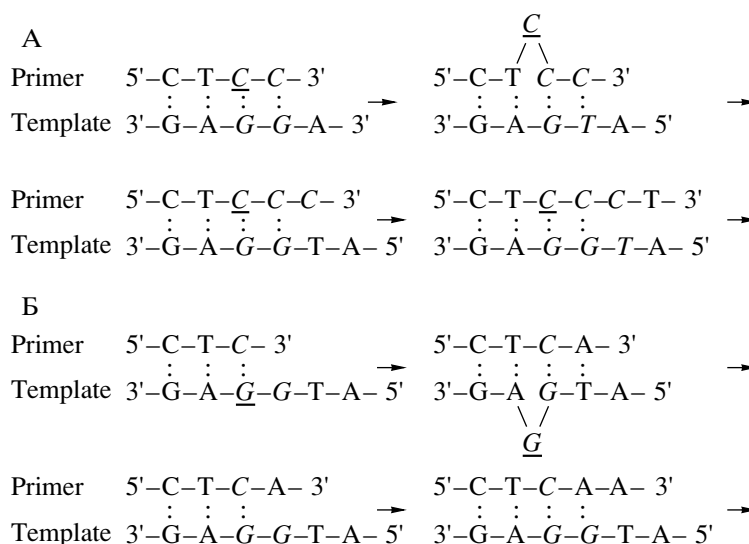
Один из наиболее значимых механизмов возникновения мутаций является смещение (дислокация) цепей ДНК на участках мононуклеотидных последовательностей или участках, способных к формированию вторичных структур типа шпильки и петель [45]. Этот механизм объясняет появление делеций и инсерций мтДНК. Однако известно, что смещение цепей ДНК может приводить и к нуклеотидным заменам. На рис. 3 представлена модель дислокационного мутагенеза, вследствие которого смещение нуклеотида в праймерной или матричной цепи может вызывать в процессе репликации ДНК введение следующего нуклеотида. Дальнейшее выпрямление цепи приводит к появлению неспаренной пары нуклеотидов и мутации в том случае, если не произойдет репарация нуклеотида [45].

Известно, что модель дислокационного мутагенеза может объяснять появление “горячих” точек ДНК в *in vitro* системах как с  $\beta$ -полимеразой [45], так и с митохондриальной  $\gamma$ -полимеразой [50]. Так, в исследованиях ДНК-полимеразы  $\beta$

**Таблица 2.** “Горячие” точки ГВС1 мтДНК человека

Число параллельных мутаций на сайт	Нуклеотидные позиции
22–32	16093, 16129, 16189, 16311, 16362
11–17	16126, 16145, 16147, 16172, 16192, 16209, 16234, 16239, 16256, 16261, 16265, 16278, 16290, 16291, 16294, 16304, 16319, 16325, 16355





**Рис. 3.** Модель дислокационного мутагенеза [45]: дислокация праймерной (А) и матричной (Б) цепи. Смещенные основания подчеркнуты, политракты показаны курсивом.

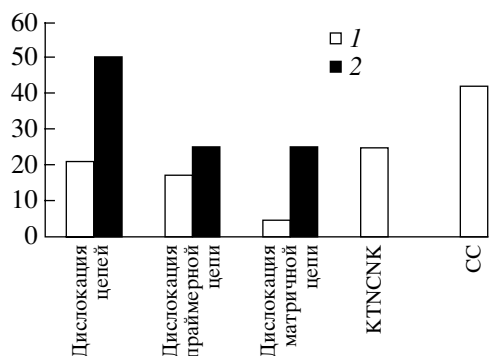
[45] показано, что модель смещения матричной цепи ДНК объясняет появление “горячей” точки Т → G в последовательности 5'-GTTTT-3' (“горячая” точка подчеркнута).

Анализ выявил, что появление многих мутаций в ГВС1 и ГВС2 согласуется с моделью дислокационного мутагенеза. Однако высокодостоверная статистическая поддержка ( $P = 0.012$  и  $0.006$  для ГВС1 и ГВС2, соответственно) обнаружена только для модели дислокации праймерной цепи мтДНК (табл. 3). Эта модель объясняет появление 20% “горячих” точек в ГВС1, а также появление всех наиболее “быстрых” позиций в ГВС2. Результаты показывают, что дислокация матричной цепи не вносит серьезного вклада в мутагенез мтДНК ( $P = 0.323$  и  $0.168$  соответственно для ГВС1 и 2), однако, нельзя исключить, что этот

тип мутагенеза может быть определяющим для АТ-обогащенных участков мтДНК.

Начиная с классических работ Бензера [10], известно, что мутационные “горячие” точки во многих случаях возникают вследствие влияния соседних нуклеотидов. По этой причине нами проведен контекстный анализ “горячих” точек с использованием биномиального теста [4], позволяющего реконструировать консенсусные последовательности, которые включают “горячие” точки и соответствующее нуклеотидное окружение. После исключения “горячих” точек, возникновение которых обусловлено дислокационным мутагенезом, нами анализировались отдельно “горячие” точки для четырех типов оснований А, G, C, T. Анализ ГВС1 позволил выявить два типа консенсусных последовательностей для нуклеотидов C и T. Последовательность первого типа имеет вид  $K\underline{T}NCNK$  (где  $K = G$  или  $T$ ; “горячая” точка подчеркнута) и объединяет 25% “горячих” точек. В данном случае на возникновение мутаций в нуклеотиде T влияют нуклеотиды K в позиции -1 и нуклеотиды C и K в позициях +2 и +4, соответственно вероятность этих нуклеотидов  $P(N_{II}, M, F_I)$  варьирует в диапазоне между 0.002 и 0.0007, что меньше вероятности случайного появления этих сайтов ( $P^* = 0.008$ ).

В другом случае обнаруживается влияние на нуклеотид C цитозина в положении +1. Такой консенсусный сайт имеет вид  $CC$  (вероятность  $P(N_{II}, M, F_I)$  для C в положении +1 равна 0.005). Консенсусный сайт  $CC$  объясняет происхождение 42% “горячих” точек. Таким образом, контекст-зависимые механизмы возникновения мутаций объясняют в целом происхождение 87% “горячих” точек в ГВС1 (рис. 4). Важно отметить, что



**Рис. 4.** Распределение (%) “горячих” точек в ГВС1 (1) и 2 (2) мтДНК, появление которых обусловлено механизмом дислокационного мутагенеза и другими контекст-зависимыми механизмами.

Таблица 3. “Горячие” точки в ГВС1 и ГВС2 мтДНК человека

Учас-ток	Позиция	Число мутаций	Контекст “горячей” точки	Смещенная цепь мтДНК	
ГВС1	ДИСЛОКАЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ				
	16189	32	CCCC T CCCCА	Праймерная	
	16362	22	TCTCG T CCCCА	Праймерная	
	16172	15	CCCAА T CCACA	Праймерная	
	16355	12	AATCC C TTCTC	Матричная/праймерная	
	16319	11	ATAAA G CCATT	Праймерная	
	ДРУГИЕ “ГОРЯЧИЕ” ТОЧКИ				
	16093	27	TGTAT T TCGTA		
	16311	22	CATAG T ACATA		
	16304	16	AACAG T ACATA		
	16126	14	TATTG T ACGGT		
	16325	12	CCATT T ACCGT		
	16209	11	GCAAG T ACAGC		
	Консенсус			K T NCNK	
	16294	11	ACCCA C CCTTA		
	16278	17	GGATA C CAACA		
	16291	16	CCTAC C CACCC		
	16256	13	CAAAG C CACCC		
	16192	13	CCTCC C CATGC		
	16261	12	CCACC C CTCAC		
	16290	12	ACCTA C CCACC		
	16239	12	CACAT C AACTG		
	16234	11	TATCA C ACATC		
	16147	11	CTTGA C CACCT		
	Консенсус			C C	
	16265	17	CCCTC A CCCAC		
	16129	24	TGTAC G GTACC		
16145	11	TACTT G ACCAC			
ГВС2	ДИСЛОКАЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ				
	152	14	CATCC T ATTAT	Праймерная	
	146	8	CTGCC T CATCC	Праймерная	
	195	7	CATAC T TACTA	Матричная	
	150	7	CTCAT C STATT	Матричная	
	227	4	CTTGT A GGACA	Праймерная	
	151	3	TCATC C TATTA	Матричная	
	ДРУГИЕ “ГОРЯЧИЕ” ТОЧКИ				
	189	4	GGCGA A CATAC		
	204	4	TAAAG T GTGTT		
	199	4	CTTAC T AAAGT		
	217	3	TTAAT T AATGC		
	185	4	TACAG G CGAAC		
	207	3	AGTGT G TTAAT		

Примечание. Мононуклеотидные тракты для дислокационных “горячих” точек показаны курсивом.

в большинстве случаев “горячими” точками являются пиримидиновые основания и поэтому существующий в мутационных спектрах мтДНК избыток пиримидиновых транзиций также может объясняться контекст-зависимыми механизмами генерирования мутаций.

Оба консенсусных сайта – короткие и поэтому часть повторяющиеся последовательности в ГВС1 мтДНК. Некоторые сайты СС и КТ<sub>1</sub>NCNK консервативны и поэтому вполне вероятно, что на частоту мутаций в них влияют еще какие-то дополнительные факторы. Так, регрессионный анализ показал, что проявления контекста в ГВС1 мтДНК достаточно сложные и не могут быть описаны только консенсусными сайтами СС and КТ<sub>1</sub>NCNK. Более того, не обнаружена достоверная корреляция между этими сайтами и распределением мутаций в ГВС2. Для проанализированного участка ГВС2 (табл. 3) пока не удалось выявить контекст-зависимых влияний на появления мутаций.

Следует отметить, что распространенный в ГВС1 мтДНК гипервариабельный нуклеотидный мотив GTACAT [2] является частным случаем консенсуса КТ<sub>1</sub>NCNK. Два других гипервариабельных мотива ACCC и CCTC [2] структурно связаны с консенсусом СС. Анализ показывает, что последовательность GTACAT может быть как гипервариабельной, так и консервативной. Так, в участках 16096–16101, 16156–16161 и 16329–16333 последовательность GTACAT практически мономорфна, в то время как участок 16303–16315 включает две высоковариабельные последовательности GTACAT, которые в обоих случаях имеют “горячую” точку в первом из двух остатков тимина. Интересно, что последовательность GTACAT распространена в виде прямых повторов не только в ГВС1 мтДНК человека, но и в главной некодирующей области мтДНК других млекопитающих [46]. Пониженная изменчивость участка 16154–16164, входящего в область терминации синтеза 7S ДНК (TAS), может объясняться важным значением TAS для функционирования митохондриального генома. Однако для других участков GTACAT данных об их влиянии на функционирование генома пока нет. Тем не менее, все они могут принимать участие в формировании вторичных структур, поскольку организованы в виде прямых повторов, частично инвертированы по отношению друг к другу и способны, таким образом, к формированию альтернативных палиндромно-шпилечных структур. Известно, например, что у грызунов ETAS-участки, включающие последовательности GTACAT и их производные, формируют очень стабильные вторичные структуры со стеблем из 11–17 нуклеотидов и петлей из 5–9 нуклеотидов [46]. Более того, повторяемость GTACAT-мономеров приводит к появлению разнообразных альтернативных вторичных

структур, различающихся как по числу шпилек, так и по числу мономеров в стеблях палиндромно-шпилечных структур. Очень вероятно, что подобная организация характерна и для главной некодирующей области мтДНК человека.

Между тем, более половины позиций в ГВС1 мтДНК относительно консервативны. Это обусловлено, по-видимому, в основном тем, что в главной некодирующей области (и в ГВС1, в частности) находятся функциональные элементы, необходимые для инициации и регуляции процессов репликации и транскрипции мтДНК. Пониженная изменчивость наблюдается, например, в контрольном элементе CE (между позициями 16194 и 16208), AP1-подобном элементе (между позициями 16064 и 16070), SP- (16104 и 16106) и других коротких участках ГВС1, возможно имеющих функциональное значение. Такая важная структура мтДНК как TAS, или область терминации синтеза 7S ДНК, расположенная между позициями 16157 и 16172, характеризуется неравномерным распределением полиморфных позиций – строго консервативной является лишь 5'-концевая область TAS между позициями 16157 и 16161.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По мере накопления данных об изменчивости мтДНК в популяциях человека подход, предложенный в настоящей работе, включающий анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей ГВС1 и 2, относящихся к определенным группам родственных по происхождению типов мтДНК, позволит оценить интенсивность мутационных процессов и особенности распределения гипервариабельных позиций в различных группах мтДНК человека. Использование данного подхода в совокупности с методами анализа структурно-функциональной организации некодирующих областей мтДНК обеспечит получение более полной информации о причинах гетерогенности скорости мутаций в различных позициях мтДНК. Все это необходимо для более полного понимания особенностей механизмов мутагенеза мтДНК и выяснения роли полинуклеотидного контекста в возникновении мутаций.

Результаты данной работы позволили впервые объяснить причины существования “горячих” точек в главной некодирующей области мтДНК. Получены доказательства того, что возникновение мутаций в ГВС1 мтДНК почти в 90% “горячих” точек обусловлено контекст-зависимыми механизмами мутагенеза.

Одним из механизмов генерирования мутаций является дислокационный мутагенез, наблюдаемый в исследованиях *in vitro* [45, 50]. Показано также, что появление точечных мутаций в ядерных генах человека может быть обусловлено

сходными механизмами [44]. Проведенное исследование продемонстрировало, что модель дислокационного мутагенеза имеет высокую статистическую поддержку для объяснения появления “горячих” точек в гипервариабельных сегментах мтДНК (в спектры мтДНК, реконструированные с использованием филогенетического подхода на основе популяционных данных об изменчивости мтДНК, т.е. *in vivo*). Тем не менее, появление значительной доли “горячих” точек мтДНК объясняется влиянием контекста ДНК вблизи гипервариабельных оснований.

Известно, что причиной дислокационного мутагенеза являются ошибки ДНК полимеразы, возникающие при репликации ДНК [50]. Таким образом, дислокационный мутагенез в ГВС1 и ГВС2 мтДНК может быть следствием ошибок, генерированных митохондриальной ДНК-полимеразой  $\gamma$  в процессе репликации мтДНК. Выявленные нами различия между моделями, учитывающими смещение праймерной и матричной цепей, могут быть обусловлены различиями в репликации цепей мтДНК и/или мутационной специфичностью полимеразы  $\gamma$  (например, некоторые дислокационные ошибки могут быть супрессированы ДНК-полимеразой с помощью редактирования, зависящего от контекста ДНК [50]). Модель, основанная на предположении о смещении праймерной цепи в процессе репликации, предсказывает повышенный мутагенез для политрактов [45, 50], и это условие полностью соблюдается для ГВС1 и ГВС2, характеризующихся высоким содержанием монотонных повторяющихся последовательностей. Например, поли-С тракты мтДНК часто подвержены дислокационному мутагенезу (табл. 3). Это свидетельствует о том, что смещение праймерной цепи в процессе репликации является важнейшим контекст-зависимым механизмом мутагенеза мтДНК человека.

Установлено, что соматический мутагенез в “горячих точках” генов ядерной ДНК (например, генов иммуноглобулинов), обусловлен в значительной мере ошибками синтеза, осуществляемого с помощью ДНК-полимеразы  $\eta$  [74]. Аналогично выявлено, что, несмотря на достаточно высокую точность синтеза ДНК с помощью митохондриальной ДНК-полимеразы  $\gamma$ , точность ее существенно понижается на гомополимерных трактах длиной более 4 нуклеотидов [50]. Показано также, что точечные замены и делеции в гомополимерных участках ДНК могут быть результатом ошибок полимеразы  $\gamma$  вследствие спонтанного проскальзывания цепей ДНК в процессе репликации. Полученные данные свидетельствуют, что гомополимерные тракты мтДНК могут быть подвержены *in vivo* мутациям типа “сдвига рамки” вследствие ошибок синтеза ДНК-полимеразой  $\gamma$  [50]. Учитывая существенное превышение числа транзиций над трансверсиями в спектрах мутаций мтДНК,

следует признать, что окислительные повреждения оснований (например, формирование 8-ОН-dG), приводящие, в основном, к трансверсиям, не являются основной причиной возникновения митохондриальных мутаций. Напротив, спонтанная потеря оснований, их дезаминирование и некоторые окислительные повреждения нуклеотидов, приводящие к появлению AP сайтов, могут высокую частоту в мутационных спектрах мтДНК транзиций (в частности, мутаций типа G  $\rightarrow$  A). Аналогичный тип мутаций может наблюдаться и в случае спонтанного дезаминирования цитозина. Другой распространенный в мутационных спектрах мтДНК тип мутаций – транзигция A  $\rightarrow$  G, может генерироваться в процессе репликативного дезаминирования аденина в гипоксантин. Таким образом, в настоящее время уже намечены гипотетические пути для разгадки причин высокого уровня мутагенеза мтДНК [50, 58], однако, требуются дальнейшие исследования в этом несомненно приоритетном направлении современной молекулярной генетики.

Весьма перспективными представляются исследования молекулярных основ самих механизмов генерирования мутаций. И если происхождение дислокационного мутагенеза может быть обусловлено дефектами генов митохондриальной ДНК-полимеразы, то другие контекст-зависимые механизмы пока не находят своего объяснения. Изучение механизмов мутагенеза мтДНК имеет важное значение не только в плане общего понимания особенностей мутационных процессов, но и для исследования наследственных митохондриальных болезней человека. Так, известно, что многие митохондриальные заболевания ассоциируются с определенными вариантами полиморфизма мтДНК. Более того, патологические мутации, как правило, появляются независимо в различных митохондриальных линиях, но в определенных нуклеотидных позициях мтДНК, т.е. в “горячих” точках. Одна из возможных причин возникновения подобных патологических мутаций – генетические дефекты ДНК-полимеразы или ядерных белковых факторов, участвующих в контроле репликации мтДНК. Так, ранее была установлена связь между мутациями в генах полимеразы  $\gamma$  (POLG) и множественными делециями мтДНК, которыми сопровождаются аутосомно-доминантная и аутосомно-рецессивная формы прогрессирующей наружной офтальмоплегии (PEO) [82]. Предполагается, что мутации в генах POLG приводят к изменению активности этого фермента, а наблюдаемая в ГВС1 мтДНК гетерогенность (в форме гетероплазмии на индивидуальном уровне) по длине поли-С участка, расположенного между позициями 16184 и 16193, обусловлена влиянием ядерных факторов, входящих в систему репликации мтДНК [54]. У больных PEO обнаружены также мутации в гене, кодирующем белок Twinkle, который прояв-

ляет высокое структурное сходство с праймазой/геликазой, кодируемой геном 4 фага T7 [78]. У этого фага праймаза/геликаза, наряду с ДНК- и РНК-полимеразой, белком SSB и ДНК-лигазой, входит в состав репликационной “машины”, обеспечивающей репликацию ДНК. Таким образом, и Twinkle может участвовать в репликации мтДНК человека в качестве праймазы/геликазы, т.е. любые генетические изменения этого белка могут привести к изменениям в процессе репликации мтДНК и даже к прекращению синтеза мтДНК полимеразой  $\gamma$  [61, 78]. Полученные данные о преимущественном влиянии контекста ДНК на возникновение мутаций в процессе эволюции мтДНК подтверждаются и результатами исследований спектров соматических мутаций в тканях и культивированных клетках больных митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефалопатией [64]. Так, было показано, что изменения нуклеозидного метаболизма у пациентов с дефицитом тимидин фосфорилазы приводят к множественным контекст-специфическим мутациям, наиболее вероятными причинами возникновения которых являются дислокационный мутагенез и влияние ближайшего нуклеотидного окружения. Результаты этого исследования позволили заключить, что продукты окислительно-восстановительных реакций в митохондриях (приводящих, например, к появлению 8-ОН-dG) не оказывают существенного влияния на генерирование точечных мутаций мтДНК [64].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о разнообразии молекулярных механизмов приводящих к появлению мутаций, однако, практически все они (особенно для “горячих” точек мтДНК) сводятся к влиянию контекста ДНК и обусловлены ошибками, возникающими при репликации мтДНК. Пока неизвестно, является ли повышенная изменчивость мтДНК следствием отсутствия эффективных систем репарации и относятся ли митохондриальные мутации в “горячих” точках к числу не или труднорепазируемых. Для этого, очевидно, необходимы эксперименты по репликации мтДНК в митохондриях в присутствии систем репарации ДНК, включающих компоненты, которые (как считается в настоящее время [11]) отсутствуют в органеллах. Тем не менее, выявление “горячих” точек мтДНК и объяснение причин их происхождения с помощью соответствующих моделей представляется важным итогом исследований изменчивости и эволюции мтДНК человека.

Автор искренне благодарен И.Б. Рогозину (ИЦиГ СО РАН) и М.В. Деренко (ИБПС ДВО РАН) за помощь в проведении данного исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Дальневосточного отделения Российской академии наук (грант 03-3-А-06-096).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Малярчук Б.А.* // Молекуляр. биология. 1995. Т. 29. Вып. 2. С. 281.
2. *Малярчук Б.А.* // Молекуляр. биология. 2002. Т. 36. № 3. С. 418.
3. *Малярчук Б.А., Деренко М.В.* // Генетика. 2001. Т. 37. № 7. С. 991.
4. *Поздняков М.А., Рогозин И.Б., Бабенко В.Н., Колчанов Н.А.* // Докл. РАН. 1997. Т. 356. № 4. С. 566.
5. *Сэдджер Р.* Цитоплазматические гены и органеллы. М.: Мир, 1975. 423 с.
6. *Alves-Silva J., da Silva Santos M., Guimaraes P.E.M., Ferreira A.C.S., Bandelt H.-J., Pena S.D.J., Prado V.F.* // Am. J. Hum. Genet. 2000. V. 67. № 2. P. 444.
7. *Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.M., Staden R., Young I.G.* // Nature. 1981. V. 290. № 5806. P. 457.
8. *Aquadro C.F., Greenberg B.D.* // Genetics. 1983. V. 103. № 2. P. 287.
9. *Bandelt H.-J., Quintana-Murci L., Salas A., Macaulay V.* // Am. J. Hum. Genet. 2002. V. 71. № 5. P. 1150.
10. *Benzer S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1961. V. 47. № 2. P. 403.
11. *Bogenhagen D.F.* // Am. J. Hum. Genet. 1999. V. 64. № 5. P. 1276.
12. *Boveris A., Oshino N., Chance B.* // J. Biochem. 1972. V. 128. № 3. P. 617.
13. *Brierley E.J., Johnson M.A., Lightowers R.N., James O.F., Turnbull D.M.* // Ann. Neurol. 1998. V. 43. № 2. P. 217.
14. *Brown W.M., George M.Jr., Wilson A.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 4. P. 1967.
15. *Brown W.M., Prager E.M., Wang A., Wilson A.C.* // J. Mol. Evol. 1982. V. 18. № 4. P. 225.
16. *Brown G.G., Simpson M.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 10. P. 3246.
17. *Cantatore P., Saccone C.* // Internatl. Rev. Cytol. 1987. V. 108. P. 149.
18. *Cheng K.C., Cahill D.S., Kasai H., Nishimura S., Loeb L.A.* // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 1. P. 166.
19. *Clayton D.A.* // Cell. 1982. V. 28. № 4. P. 693.
20. *Clayton D.A., Doda J.N., Friedberg E.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. № 2. P. 2777.
21. *Davis A.F., Clayton D.A.* // J. Cell Biol. 1996. V. 135. № 4. P. 883.
22. *Driggers W.J., Holmquist G.P., LeDoux S.P., Wilson G.L.* // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 21. P. 4362.
23. *Ehrlich M., Zhang X.Y., Inamdar N.M.* // Mutat. Res. 1990. V. 238. № 3. P. 277.
24. *Elson J.L., Andrews R.M., Chinnery P.F., Lightowers R.N., Turnbull D.M., Howell N.* // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 68. № 1. P. 145.
25. *Elson J.L., Samuels D.C., Turnbull D.M., Chinnery P.F.* // Am. J. Hum. Genet. 2001. V. 68. № 3. P. 802.

26. *Excoffier L., Yang Z.* // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 10. P. 1357.
27. *Feig D.I., Sowers L.C., Loeb L.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 14. P. 6609.
28. *Finnila S., Lehtonen M.S., Majamaa K.* // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 68. № 6. P. 1475.
29. *Fuku N., Oshida Y., Takeyasu T., Guo L.J., Kurata M., Yamada Y., Sato Y., Tanaka M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 290. № 4. P. 1199.
30. *Giannelli F.* // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 68. № 6. P. 1535.
31. *Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. № 11. P. 6715.
32. *Glazko G.V., Milanese L., Rogozin I.B.* // *J. Theor. Biol.* 1998. V. 192. № 4. P. 475.
33. *Hasegawa M., Di Rienzo A., Kocher T., Wilson A.* // *J. Mol. Evol.* 1993. V. 37. № 4. P. 347.
34. *Hayashi J., Ohta S., Kikuchi A., Takemitsu M., Goto Y., Nonaka I.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 23. P. 10614.
35. *Hegler J., Bittner D., Boiteux S., Epe B.* // *Carcinogenesis.* 1993. V. 14. № 11. P. 2309.
36. *Helgason A., Sigurdardottir S., Gulcher J.R., Ward R., Stefansson K.* // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 66. № 3. P. 999.
37. *Hruszkewycz A.M., Bergtold D.S.* // *Mutat. Res.* 1990. V. 244. № 2. P. 123.
38. *Hudson B., Upholt W.B., Devinny J., Vinograd J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 1969. V. 62. № 3. P. 813.
39. *Ingman M., Kaessmann H., Paabo S., Gyllensten U.* // *Nature.* 2000. V. 408. № 6813. P. 708.
40. *Jukes T.H., Bhushan V.* // *J. Mol. Evol.* 1986. V. 24. № 1. P. 39.
41. *Kang D., Hamasaki N.* // *Curr. Genet.* 2002. V. 41. № 6. P. 311.
42. *Kimura M.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 10. P. 5773.
43. *Krakauer D.C., Mira A.* // *Nature.* 1999. V. 400. № 6740. P. 125.
44. *Krawczak M., Ball E.V., Cooper D.N.* // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 63. № 2. P. 474.
45. *Kunkel T.A.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 9. P. 5787.
46. *Larizza A., Pesole G., Reyes A., Sbisà E., Saccone C.* // *J. Mol. Evol.* 2002. V. 54. № 2. P. 145.
47. *Le Page F., Guy A., Cadet J., Sarasin A., Gentil A.* // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. № 5. P. 1276.
48. *Lindahl T.* // *Nature.* 1993. V. 362. № 6448. P. 709.
49. *Loeb L.A., Preston B.D.* // *Annu. Rev. Genet.* 1986. V. 20. P. 201.
50. *Longley M.J., Nguyen D., Kunkel T.A., Copeland W.C.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 42. P. 38555.
51. *Lutz S., Weisser H.-J., Heizmann J., Pollak S.* // *Int. J. Legal Med.* 1998. V. 111. № 2. P. 67.
52. *Maca-Meyer N., Gonzalez A.M., Larruga J.M., Flores C., Cabrera V.M.* // *BMC Genetics* 2001. V. 2. № 1. P. 13.
53. *Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Guida V., Scozzari R., Bonne-Tamir B., Sykes B., Torroni A.* // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 64. № 2. P. 232.
54. *Malik S., Sudoyo H., Pramoonyago P., Suryadi H., Sukarna T., Njunting M., Sahiratmadja E., Marzuki S.* // *Hum. Genet.* 2002. V. 110. № 5. P. 402.
55. *Malyarchuk B.A., Derenko M.V.* // *Ann. Hum. Genet.* 1999. V. 63. Pt. 6. P. 489.
56. *Malyarchuk B.A., Grzybowski T., Derenko M.V., Czarny J., Wozniak M., Miscicka-Sliwka D.* // *Ann. Hum. Genet.* 2002. V. 66. Pt. 4. P. 261.
57. *Malyarchuk B.A., Rogozin I.B., Berikov V.B., Derenko M.V.* // *Hum. Genet.* 2002. V. 111. № 1. P. 46.
58. *Marcelino L.A., Thilly W.G.* // *Mutat. Res.* 1999. V. 434. № 3. P. 177.
59. *Meyer S., Weiss G., von Haeseler A.* // *Genetics.* 1999. V. 152. № 3. P. 1103.
60. *Mita S., Monnat Jr. R.J., Loeb L.A.* // *Cancer Res.* 1988. V. 48. № 16. P. 4578.
61. *Moraes C.T.* // *Nat. Genet.* 2001. V. 28. № 6. P. 200.
62. *Myers K.A., Saffhill R., O'Connor P.J.* // *Carcinogenesis.* 1988. V. 9. № 2. P. 285.
63. *Nass M.M.* // *J. Mol. Biol.* 1973. V. 80. № 1. P. 155.
64. *Nishigaki Y., Marti R., Copeland W., Hirano M.* // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 111. № 12. P. 1913.
65. *Parcucci B., Versteegh A., van Hoffen A., van Zeeland A.A., Mullenders L.H., Dogliotti E.* // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. № 2. P. 417.
66. *Park J.W., Ames B.N.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 20. P. 7467.
67. *Perez G.I., Trbovich A.M., Gosden R.G., Tilly J.L.* // *Nature.* 2000. V. 403. № 6769. P. 500.
68. *Pinz K.G., Bogenhagen D.F.* // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. № 3. P. 1257.
69. *Pinz K.G., Shibusaki S., Bogenhagen D.F.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 16. P. 9202.
70. *Reenan R.A., Kolodner R.D.* // *Genetics.* 1992. V. 132. № 4. P. 963.
71. *Richards M., Macaulay V., Hickey E., Vega E., Sykes B., Guida V., Rengo C., Sellito D., Cruciani F., Kivisild T., Villems R., Thomas M., Rychkov S., Rychkov O., Rychkov Yu., Golge M., Dimitrov D., Hill E., Bradley D., Romano V., Cali F., Vona G., Demaine A., Papiha S., Triantaphyllidis C., Stefanescu G., Hatina J., Belledi M., Di Rienzo A., Novelletto A., Oppenheim A., Norby S., Al-Zaheri N., Santachiara-Benerecetti S., Scozzari R., Torroni A., Bandelt H.-J.* // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. № 11. P. 1251.
72. *Richter C., Park J.-W., Ames B.N.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 17. P. 6465.
73. *Rogozin I.B., Kondrashov F.A., Glazko G.V.* // *Hum. Mut.* 2001. V. 17. № 2. P. 83.
74. *Rogozin I.B., Pavlov Y.I., Bebenek K., Matsuda T., Kunkel T.* // *Nat. Immunol.* 2001. V. 2. № 6. P. 530.
75. *Satoh M.S., Huh N., Rajewsky M.F., Kuroki T.* // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 14. P. 6854.
76. *Shadel G.S.* // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 65. № 5. P. 1230.
77. *Shadel G.S., Clayton D.A.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1997. V. 66. P. 409.
78. *Spelbrink J.N., Li F.-Y., Tiranti V., Nikali K., Yuan Q.-P., Tariq M., Wanrooij S., Garrido N., Comi G., Morandi L., Santoro L., Toscano A., Fabrizi G.-M., Somer H.,*

- Croxen R., Beeson D., Poulton J., Suomalainen A., Jacobs H.T., Zeviani M., Larsson C. // *Nat. Genet.* 2001. V. 28. № 6. P. 223.
79. Tamura K. // *Gene.* 2000. V. 259. № 1. P. 189.
80. Tamura K., Nei M. // *Mol. Biol. Evol.* 1993. V. 10. № 3. P. 512.
81. Topal M.D., Fresco J.R. // *Nature.* 1976. V. 263. № 5575. P. 285.
82. Van Goethem G., Dermaut B., Lofgren A., Martin J.J., Van Broeckhoven C. // *Nat. Genet.* 2001. V. 28. № 6. P. 211.
83. Wakeley J. // *J. Mol. Evol.* 1993. V. 37. № 6. P. 613.
84. Wallace D.C. // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. N.2. P. 201.
85. Wallace D.C. // *Science.* 1999. V. 283. № 5407. P. 1482.

## Mutation Process in Evolution of Human Mitochondrial Genome

D. A. Malyarchuk

*Institute for Biological Problems of the North, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia*

A problem of initiating mutations in human mitochondrial genome is considered in the light of the recent data. Mutation spectra of the hypervariable segments 1 and 2 (HVS1 and HVS2) were reconstructed using the phylogenetic analysis of mtDNA variation for the first time. An approach that reveals hypervariable positions of the major noncoding mtDNA region is substantiated. Classes of nucleotide positions are specified by their variation. The main mechanisms for generating mutation in the mtDNA hotspots were determined using the DNA context analysis. The first presentation on the predominance of context-specific mechanisms for initiation mutation in the human mitochondrial genome is suggested.