



Paweł Golik  
Instytut Genetyki i Biotechnologii  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

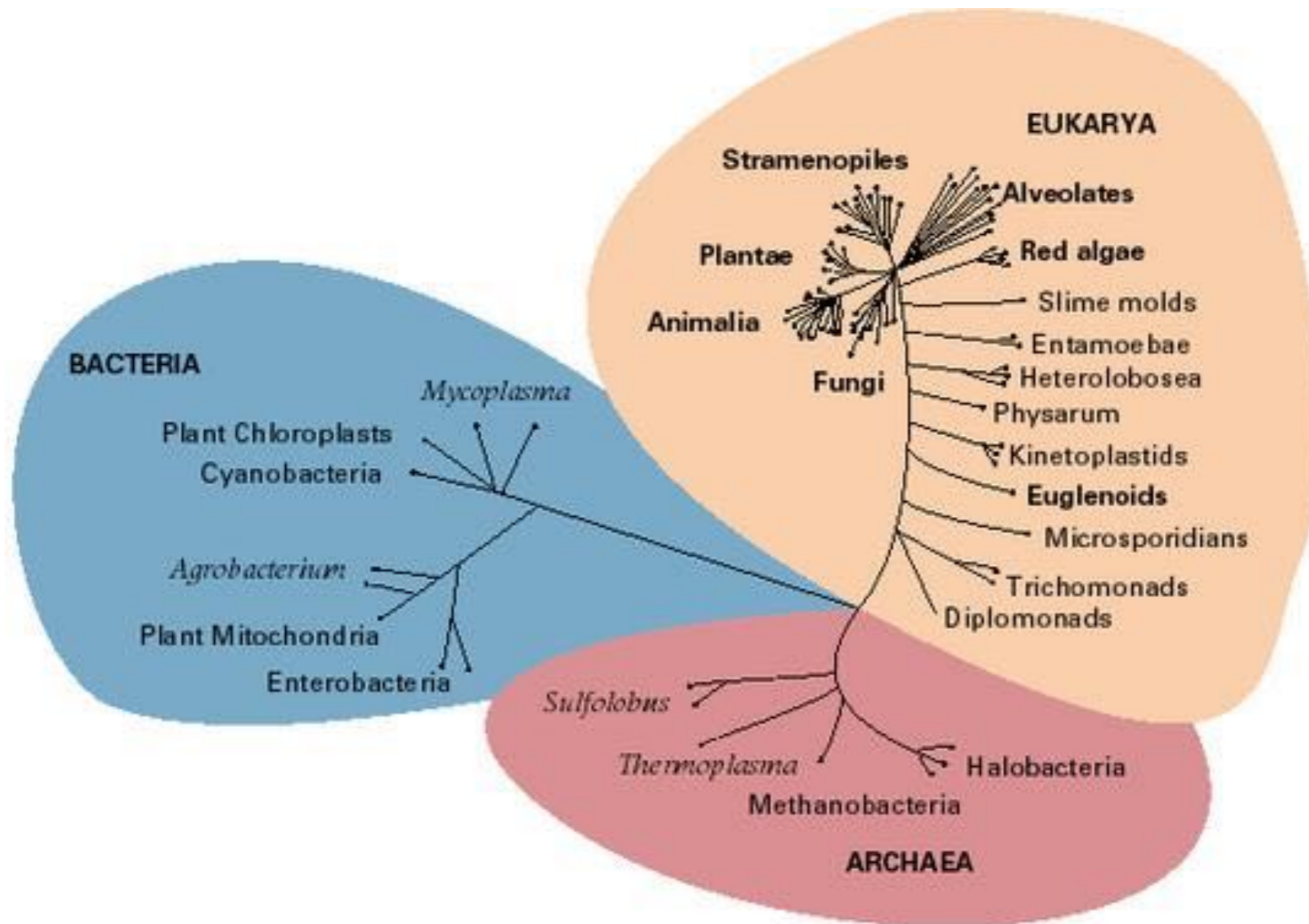


# Obcy w naszych komórkach

---

Krótką historia mitochondriów

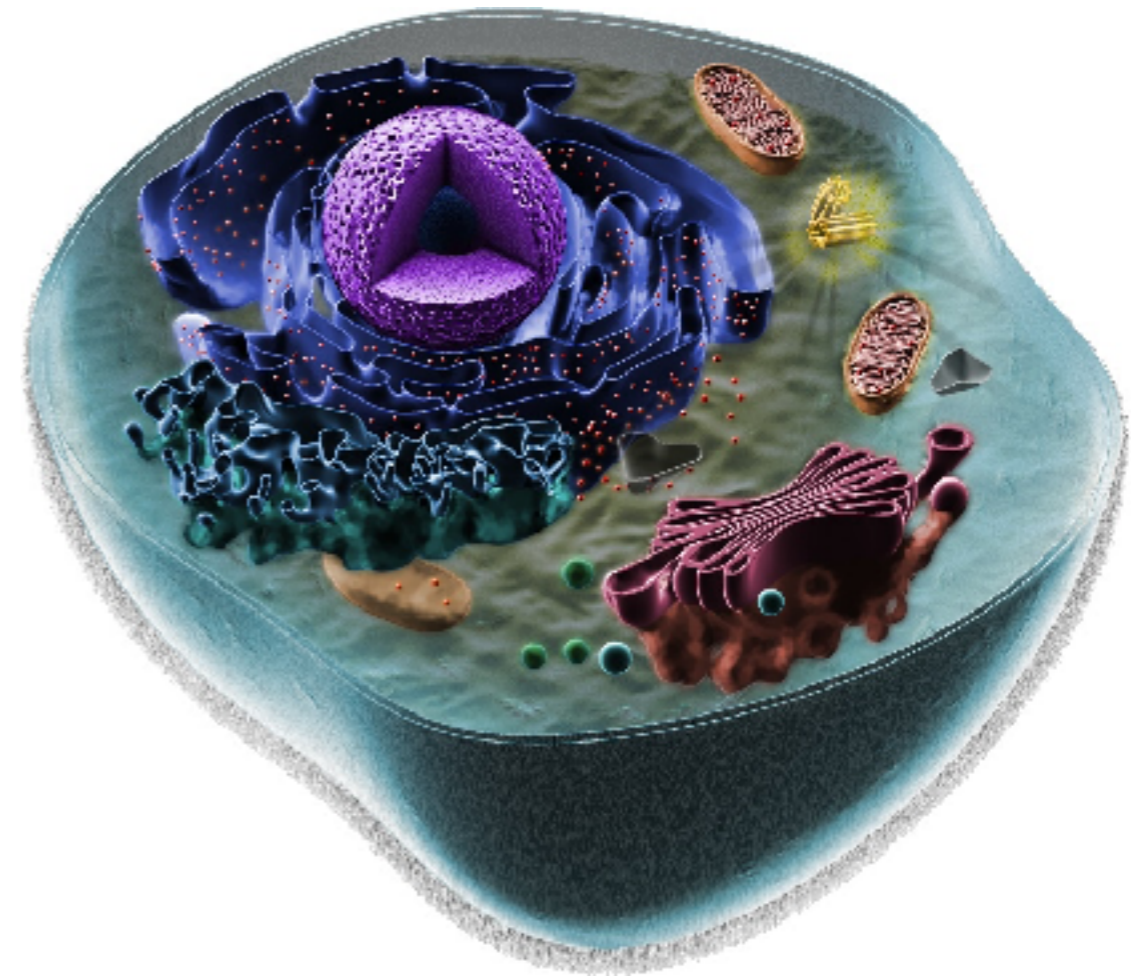
# Drzewo ewolucyjne życia



# Eukarionty - ewolucyjna mozaika

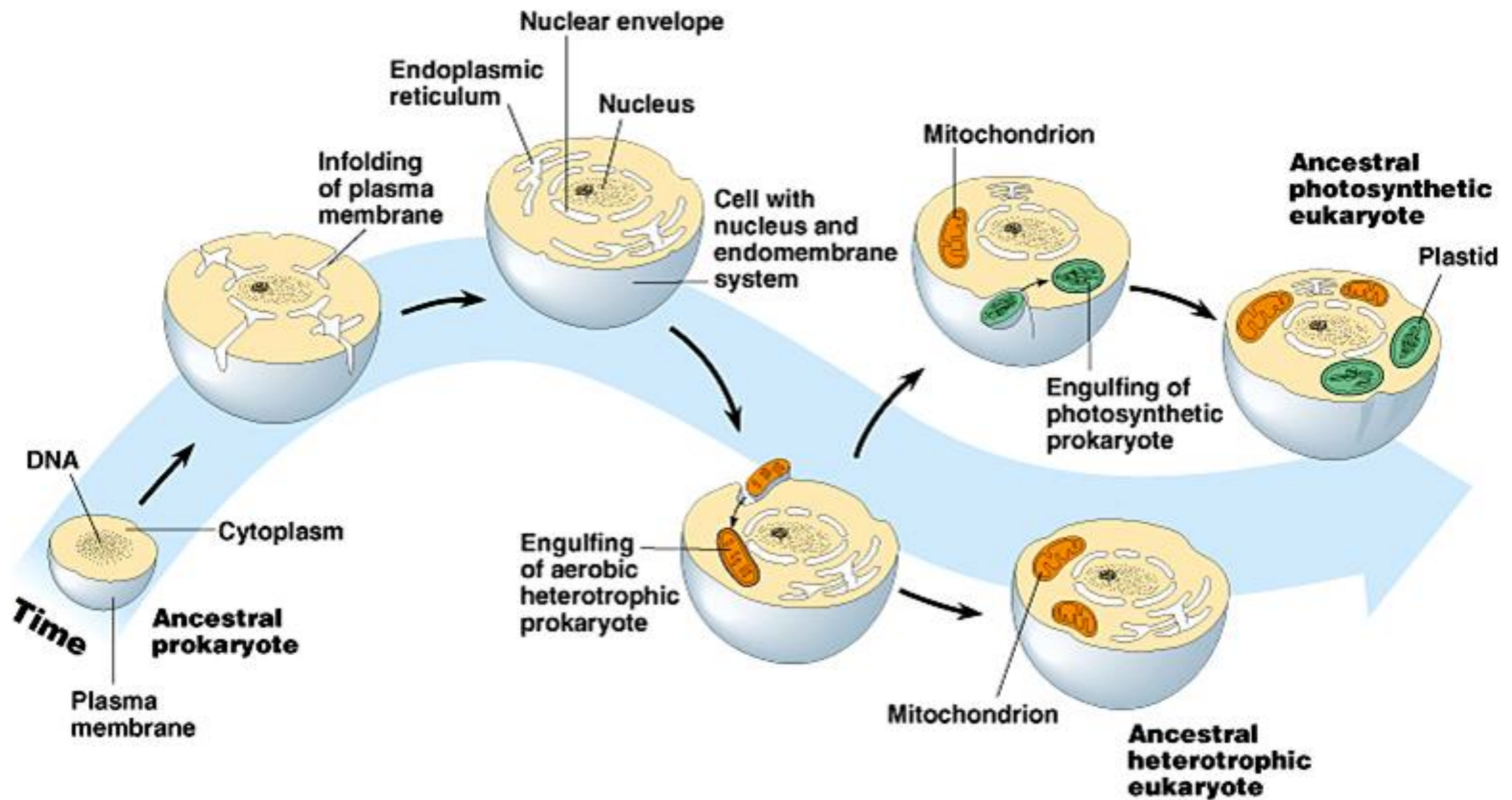
---

- Komórka eukariotyczna - labirynt i mozaika
- Mitochondria
  - oddychanie i produkcja ATP
  - wiele innych procesów metabolicznych i regulacyjnych
- Mitochondria i chloroplasty mają własny genom - relikw ewolucji

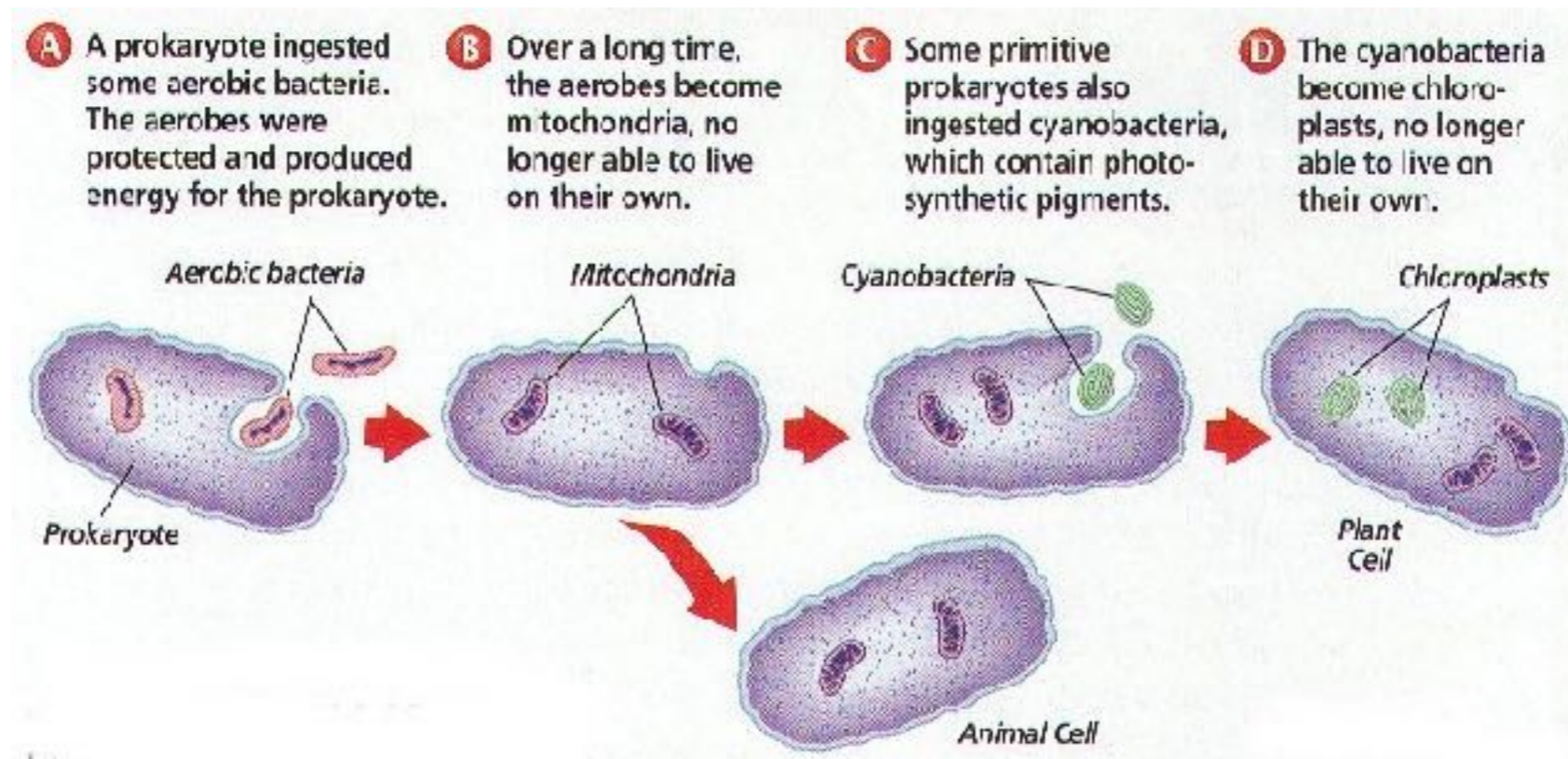


Zaldua I., Equisoain J.J., Zabalza A., Gonzalez E.M., Marzo A., Public University of Navarre  
From Wikimedia Commons, the free media repository

# Skąd wzięły się mitochondria?



# Powstanie komórki eukariotycznej- endosymbioza

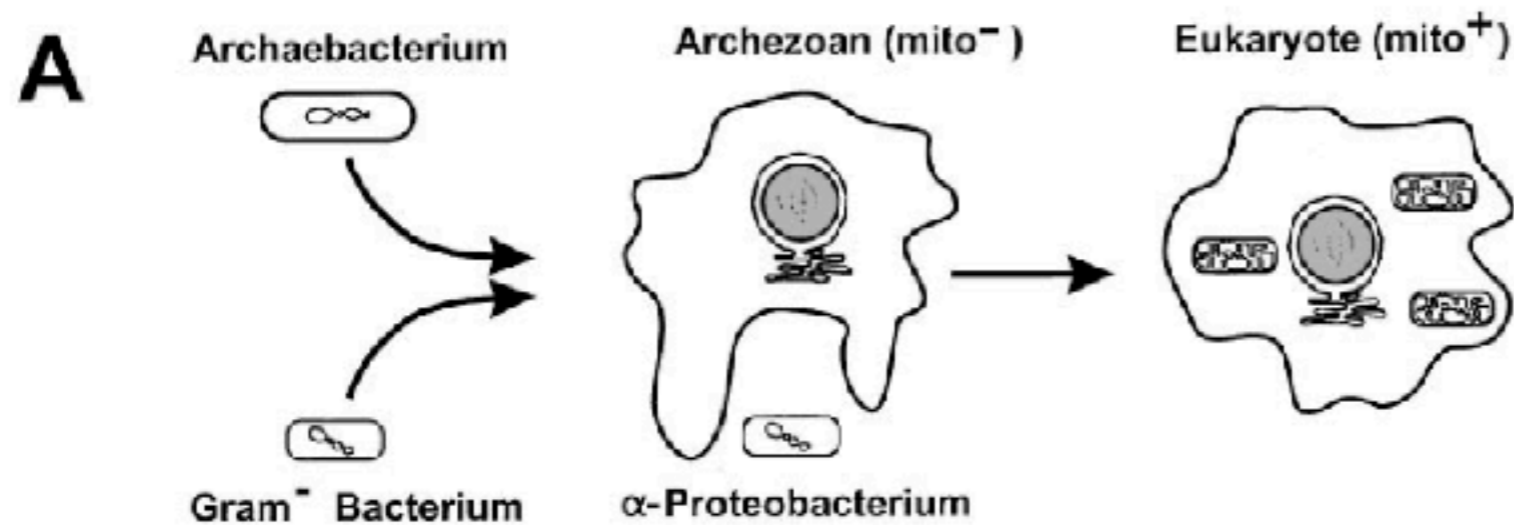


Konstanty Miereżkowski (1855-1921)

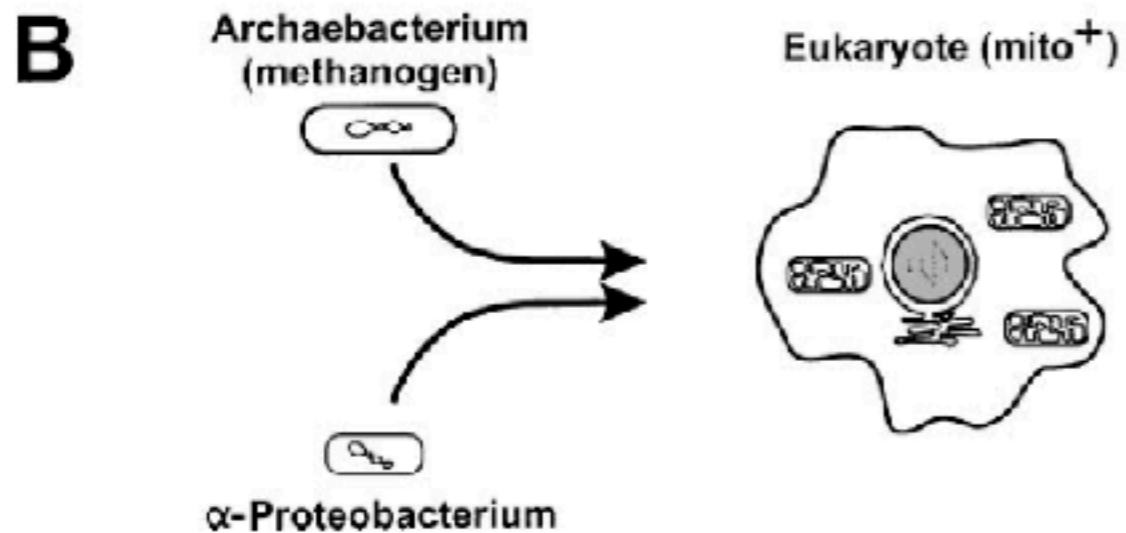


Lynn Margulis (1938-2011)

# Scenariusze endosymbiozy

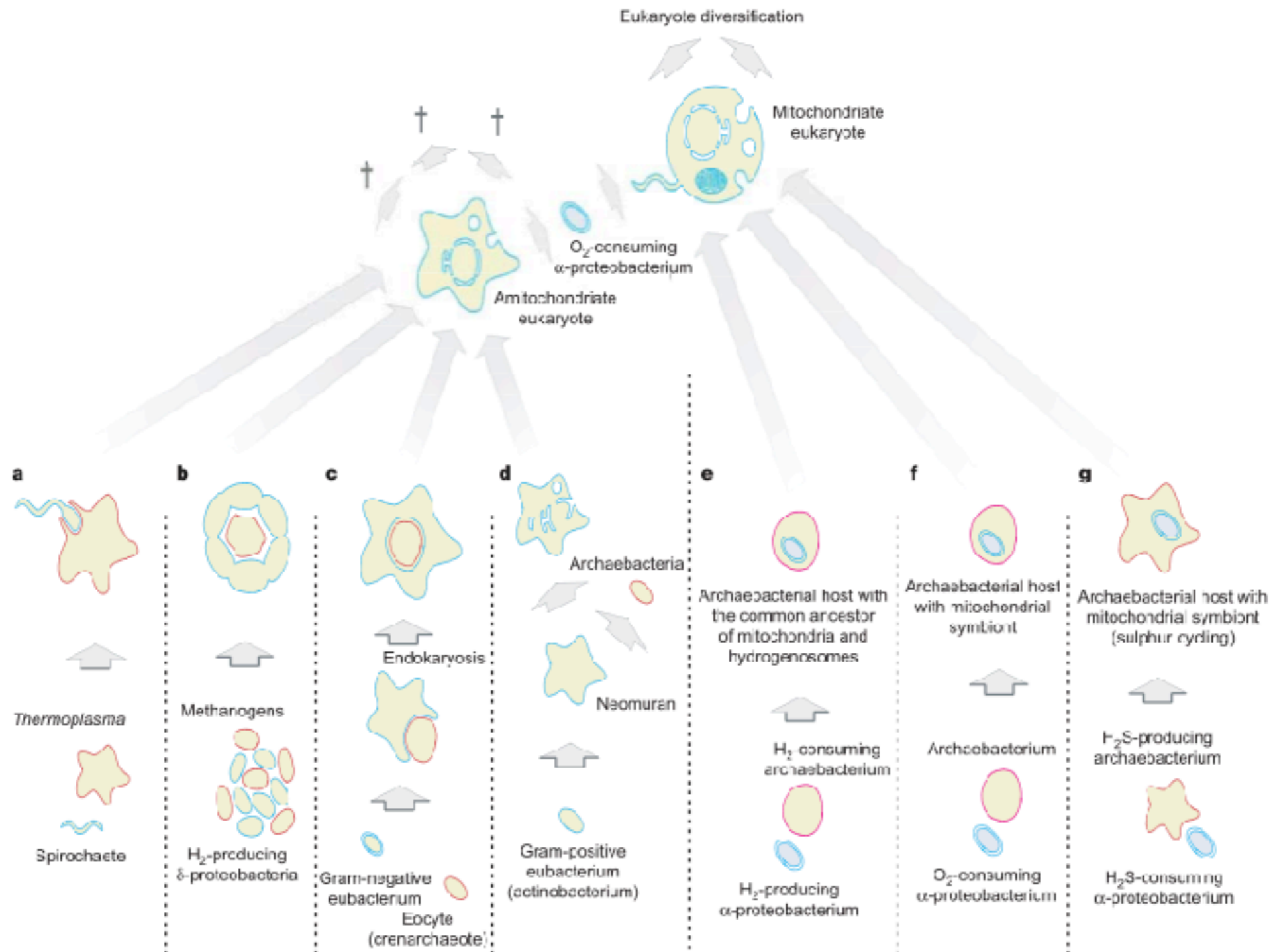


Seria endosymbioz, etap przejściowy – eukariont amitochondrialny

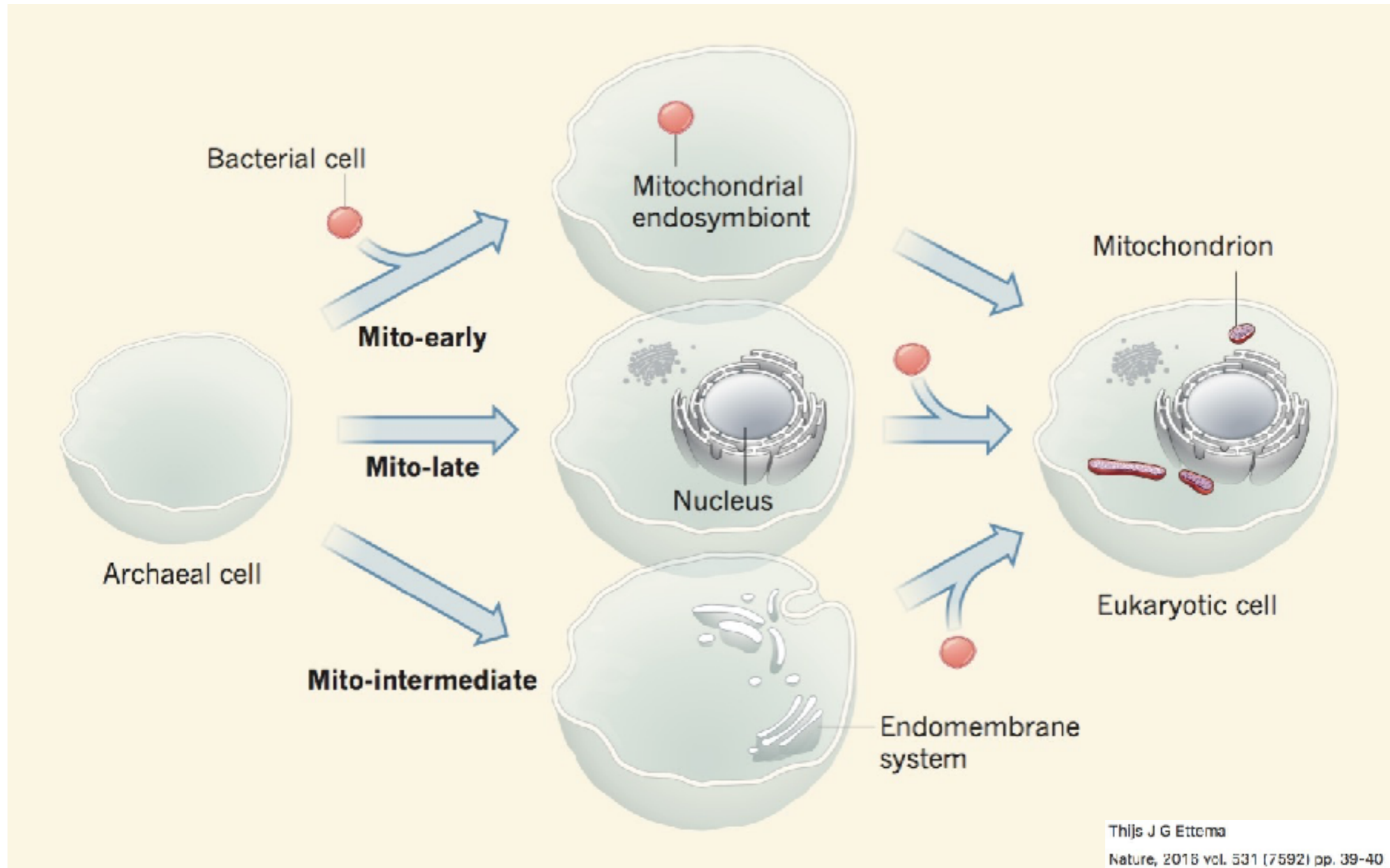


“Big bang” - spotkanie 2 (lub więcej) prokariotów, bez etapu przejściowego

# Scenariusze endosymbiozy



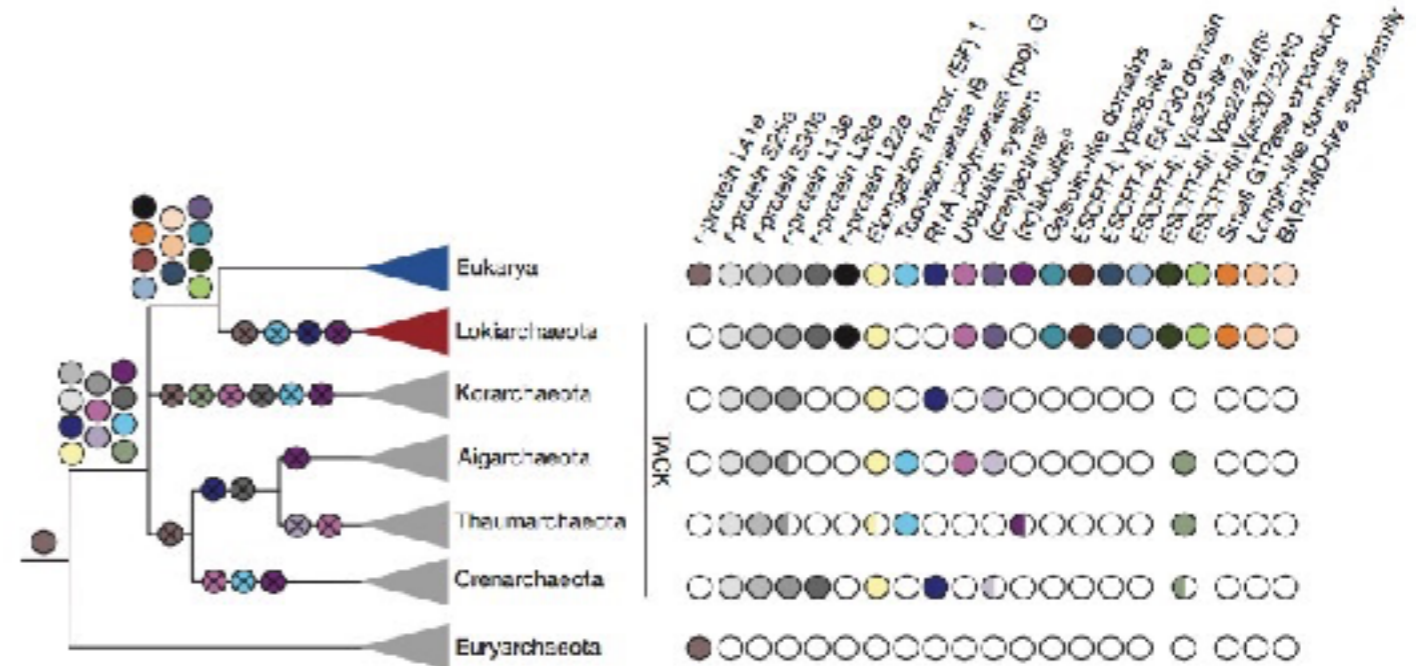
# Scenariusze endosymbiozy





# Gospodarz endosymbiozy był archeonem

- Lokiarcheota - monofiletyczna grupa Archaea, odkryta w badaniach metagenomicznych (2105 r.)
- Najbliżej spokrewniona z Eukaryota
- Posiada geny kodujące białka umożliwiające tworzenie złożonych struktur błonowych
- Tak mógł wyglądać gospodarz endosymbiozy, która dała początek Eukaryota



## ARTICLE

doi:10.1038/nature13447

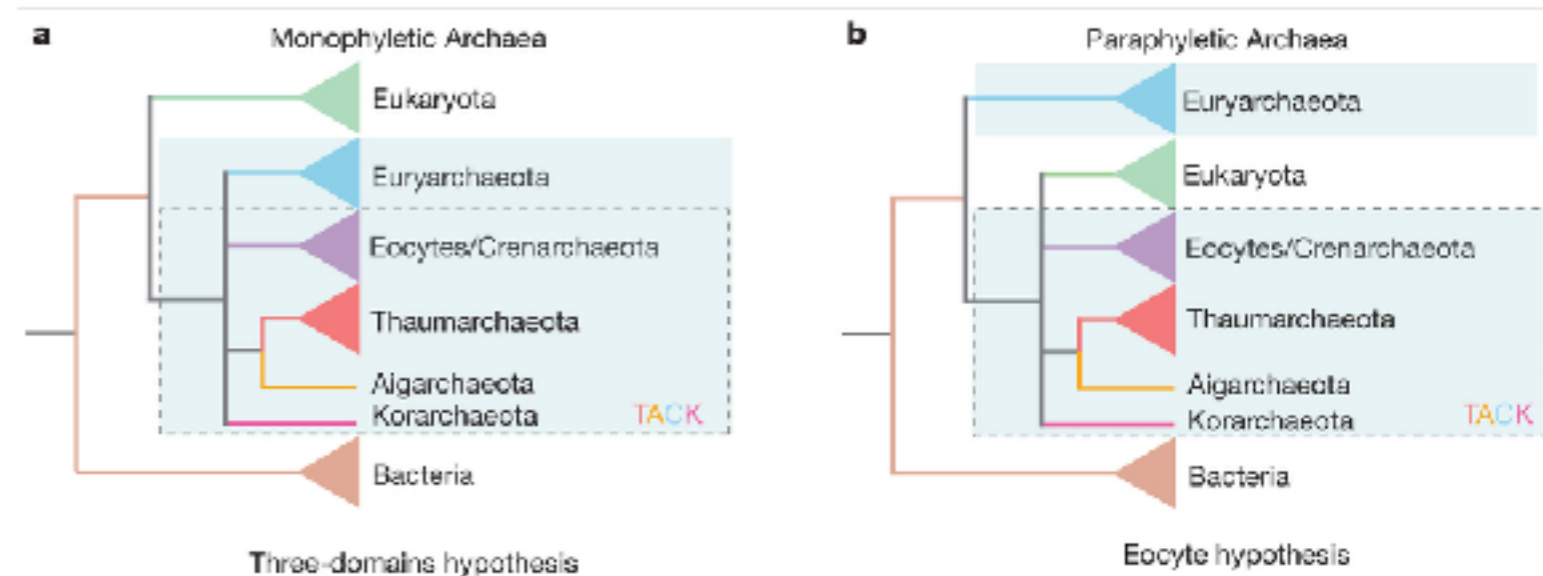
### Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes

Anja Sparž<sup>1\*</sup>, James H. Saw<sup>2\*</sup>, Soňa L. Jaganová<sup>3\*</sup>, Karolina Záruba-Nehrbabková<sup>4\*</sup>, Dean Mudge<sup>1</sup>, Anders E. Lind<sup>1</sup>, Paul van der Oost<sup>1</sup>, Charles Schlegel<sup>1</sup>, David Gray<sup>1</sup> & Tadhg G. O'Brien

©2015 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

# Hipoteza eocytów

- Być może Eukaryota (jądro) to jedna z gałęzi Archaea
- Dwie, a nie trzy domeny drzewa życia



## An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life

Tom A. Williams, Peter G. Foster, Cymon J. Cox & T. Martin Embley

Affiliations | Contributions | Corresponding author

Nature 604, 281–286 (12 December 2013) | doi:10.1038/nature12779

Received 17 June 2013 | Accepted 14 October 2013 | Published online 11 December 2013

[Citation](#) | [Reprints](#) | [Rights & permissions](#) | [Article metrics](#)

The discovery of the Archaea and the proposal of the three domains 'universal' tree, based on ribosomal RNA and core genes mainly involved in protein translation, catalysed new ideas for cellular evolution and eukaryotic origins. However, accumulating evidence suggests that the three-domains tree may be incorrect: evolutionary trees made using newer methods place eukaryotic core genes within the Archaea, supporting hypotheses in which an archaeon participated in eukaryotic origins by founding the host lineage for the mitochondrial endosymbiont. These results provide support for only two primary domains of life—Archaea and Bacteria—because eukaryotes arose through partnership between them.

# Opłacalność symbiozy

---

- Symbiont dostarczał ATP, albo usuwał toksyczny tlen (“Ox-tox”)
- Hipoteza wodorowa
  - Gospodarz: wymagający wodoru
  - Symbiont: wytwarzający wodór

# Współczesne eukarionty bez mitochondriów

---

- Jednokomórkowe, pasożytnicze, beztlenowe
- Nie posiadają mitochondriów, peroksysomów
- Występują organella (hydrogenosomy, mitosomy) przypominające skrajnie zdegenerowane mitochondria, pozbawione funkcji oddechowej



**Figure 2.** An archamoeba, *Pelomyxa*.



**Figure 3.** A parabasalium, *Tritrichomonas*.

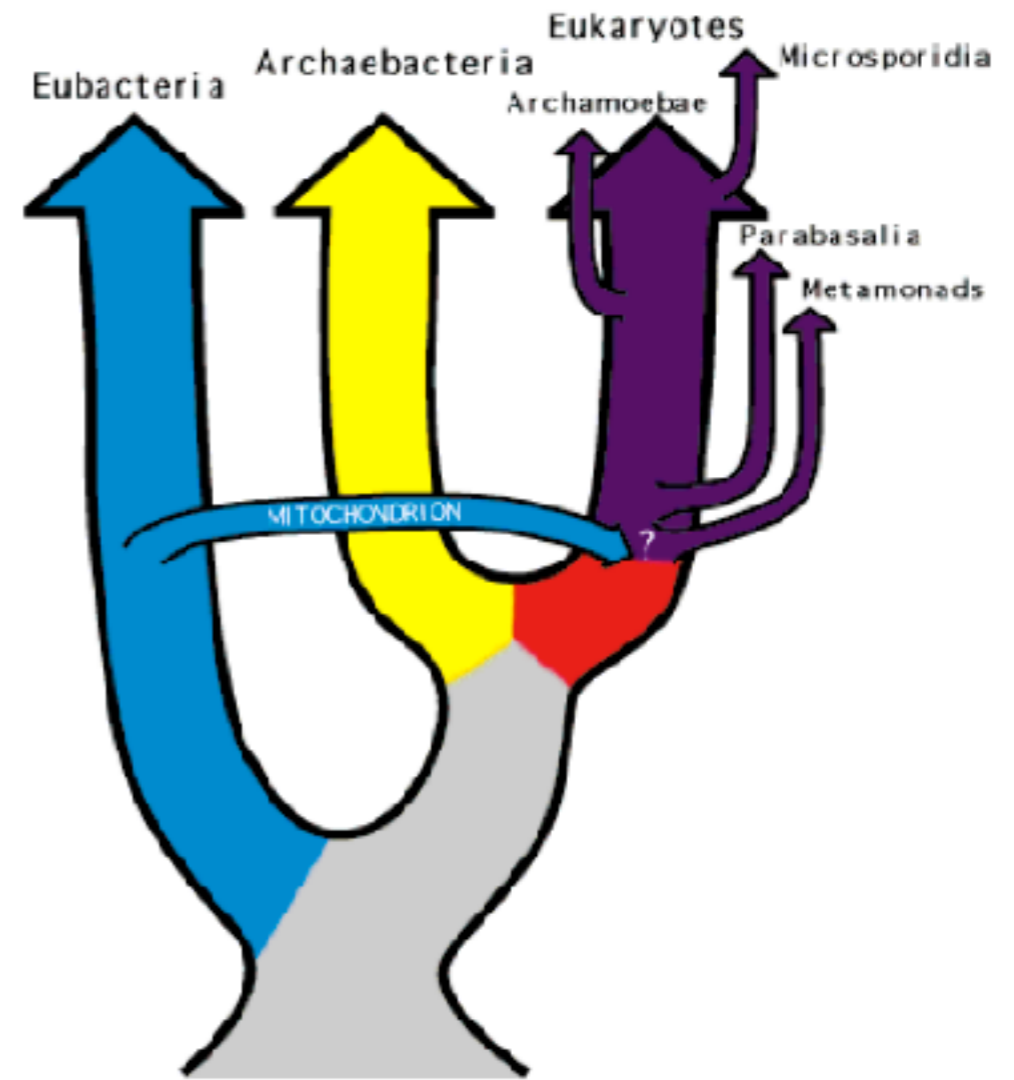
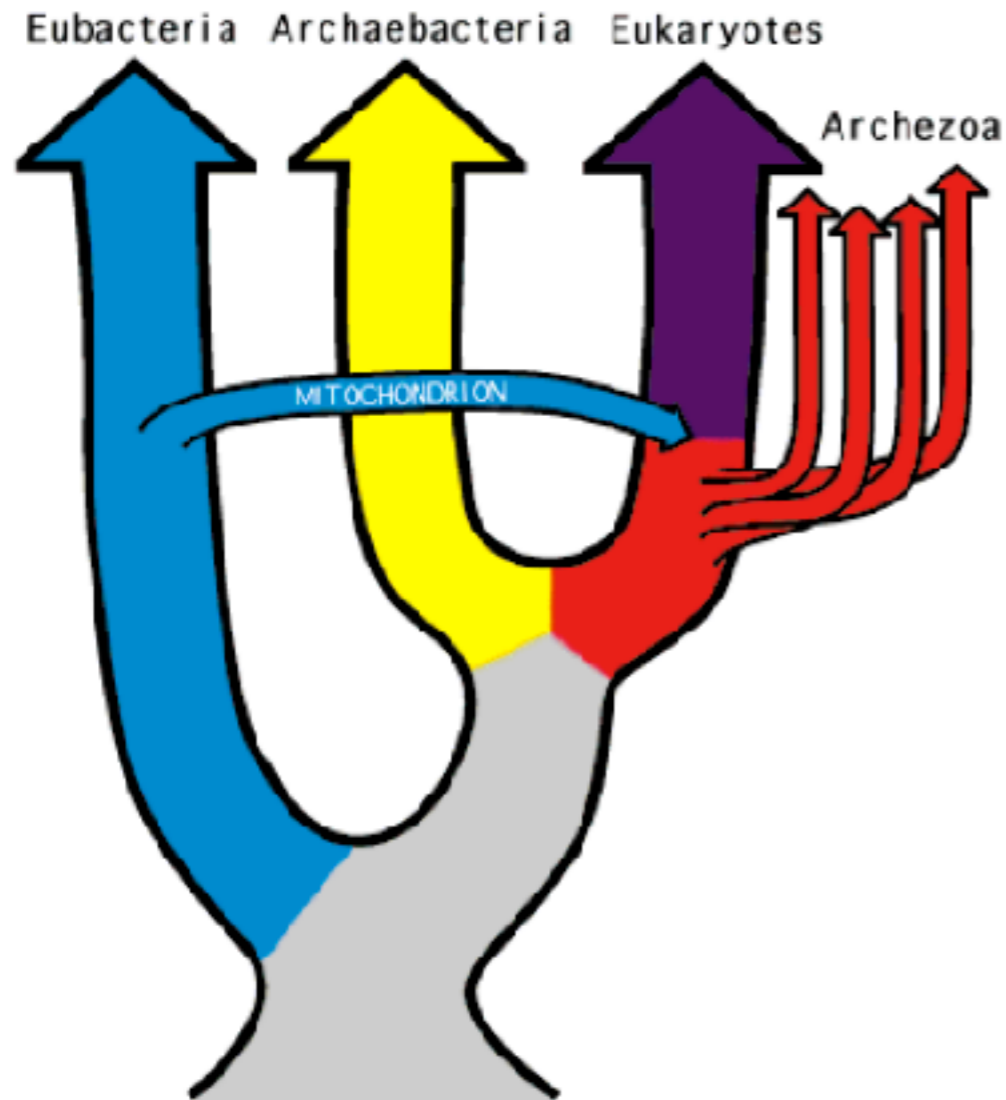


**Figure 4.** A microsporidian, *Nosema*.

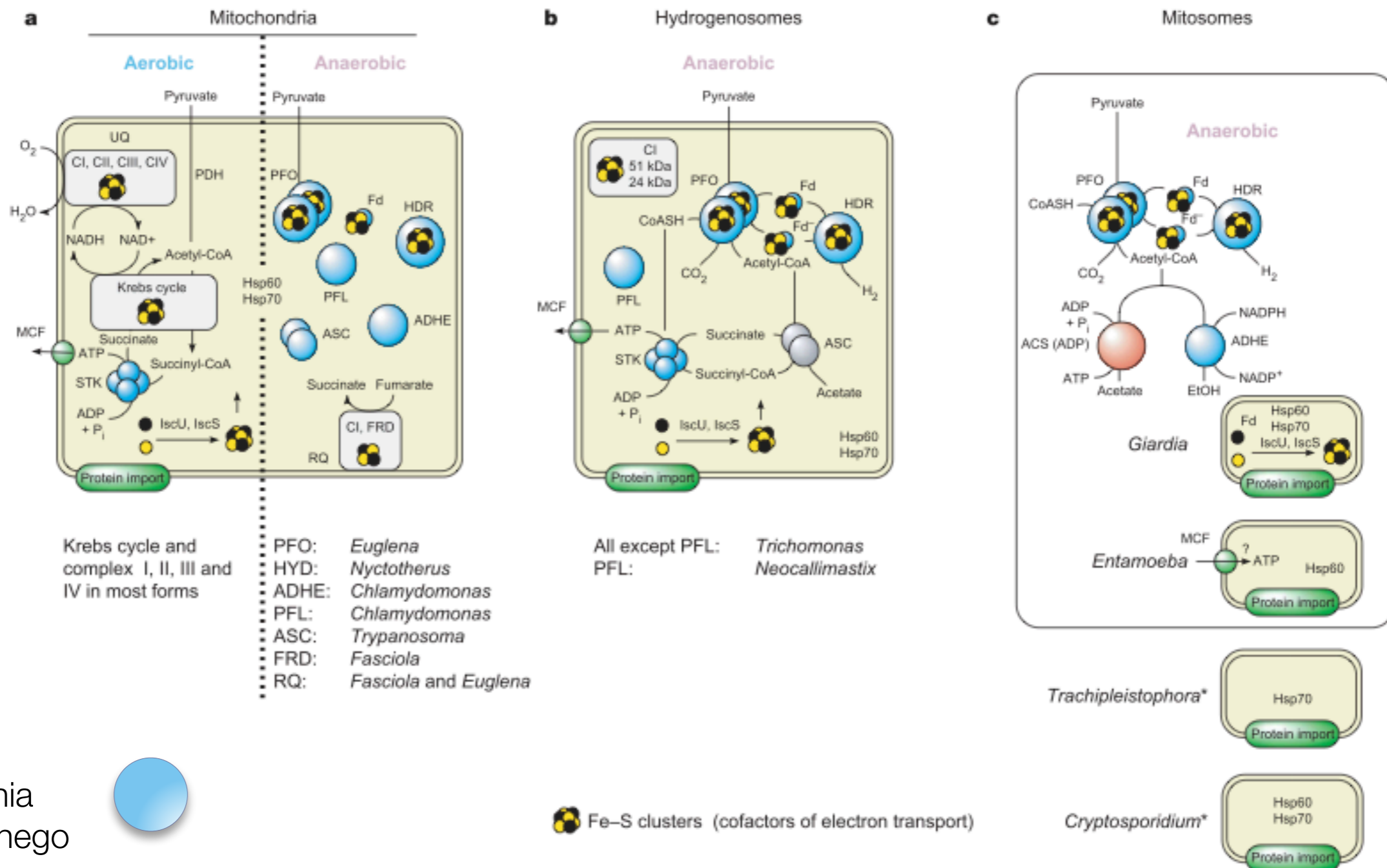


**Figure 5.** A metamonad, *Retortamonas*.

# “Archezoa”: brak mitochondriów pierwotny, czy wtórny?



# Przodkowie mieli mitochondria



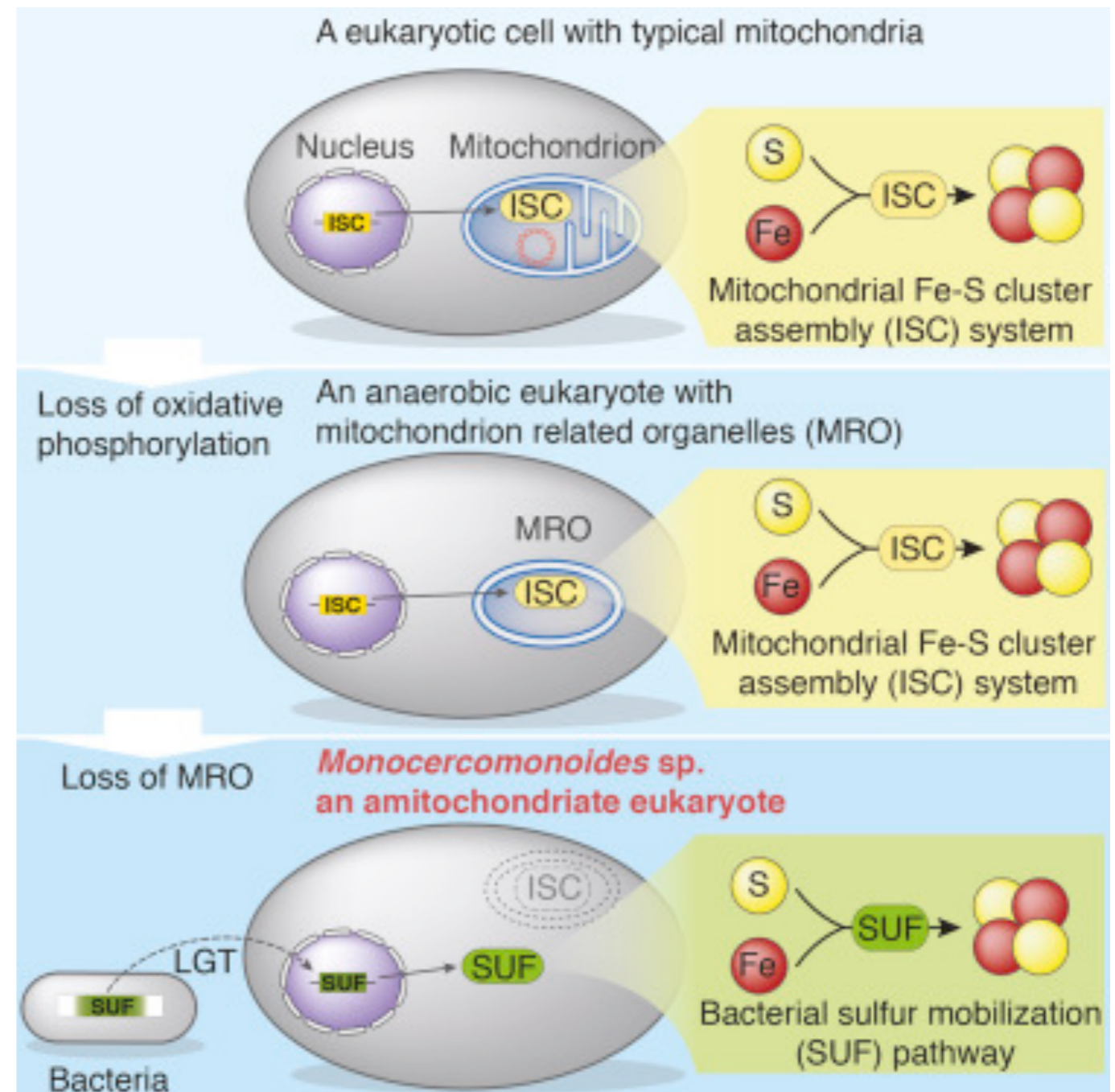
Białka pochodzenia eubakteryjnego



Fe-S clusters (cofactors of electron transport)

# Czego nie można stracić

- Większość funkcji mitochondriów nie jest niezbędna dla życia
  - np. oddychanie - potrzebne tylko u tlenowców
- Najbardziej podstawowa funkcja - synteza grup FeS
  - kofaktory niezbędnych enzymów
- U niedawno odkrytego eukarionta pozbawionego mitochondriów i podobnych organelli rolę tę przejął enzym pochodzący od bakterii



# Jak mitochondria traciły swój genom

---

Wolno żyjące bakterie - 1800-4500 genów



Endosymbiontyczne bakterie (*Rickettsia*) - 850 genów



Pierwotne mitochondria (*Reclinomonas*) - 100 genów



Mitochondria „współczesne” - 30-40 genów (w tym około 9-13 kodujących białka)



# Dlaczego mitochondria traciły geny?

---

- Zapadka Müllera: gdy nie zachodzi rekombinacja między różnymi genomami to dochodzi do nieodwracalnej akumulacji mutacji szkodliwych.
- Populacja aseksualna i izolowana gromadzi szkodliwe mutacje
- Wielokopiowość i heteroplazmia mogą utrudniać selekcję



**You can never turn back!**

# I jak się to odbywało

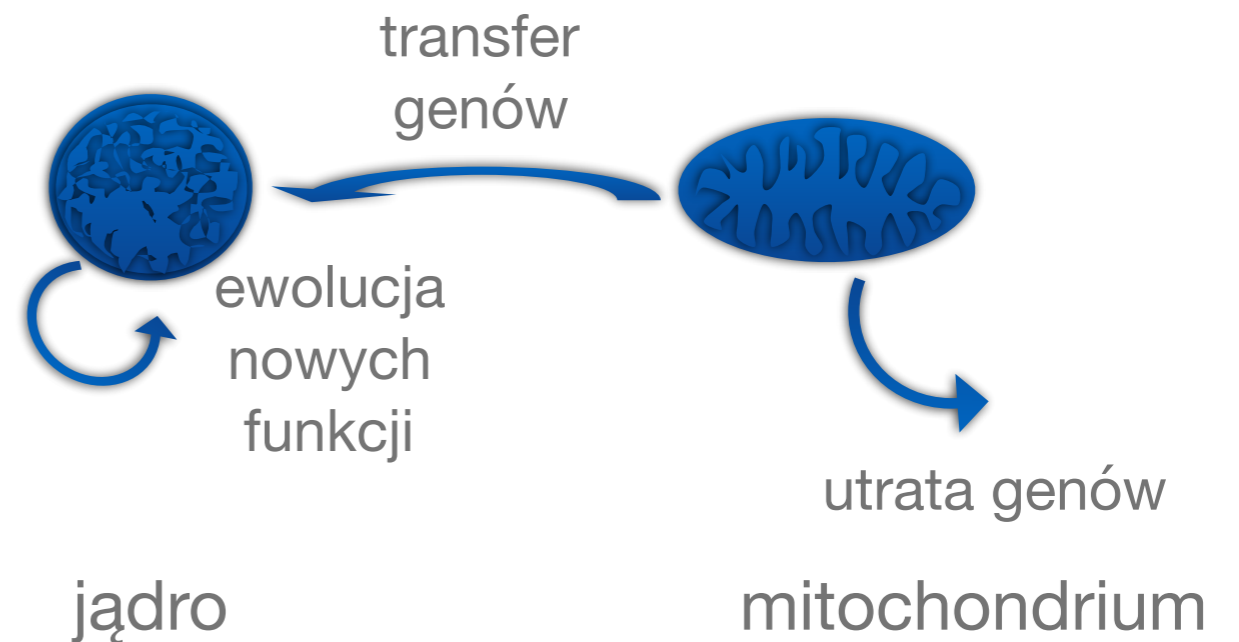
---

- Ucieczka DNA do jądra
- Przeniesienie genów do jądra za pośrednictwem RNA
- Zastąpienie funkcji przez gen pochodzący z genomu gospodarza
- Zastąpienie funkcji przez gen pochodzący z innej linii
  - polimeraza RNA, polimeraza DNA – pochodzenie fagowe

# Udomowienie endosymbionta

---

- Utrata sekwencji kodujących i mechanizmów regulacyjnych
  - Kilkanaście genów w policistronowych transkryptach, o zmiennym składzie i niepowiązanej funkcji
  - Uproszczona kontrola transkrypcyjna
- U gospodarza wyewoluowały nowe funkcje
  - dla utrzymania struktury (proteomu)
  - dla regulowania ekspresji.



# Oddziaływania jądro-mitochondrialne

---

- U drożdży *Saccharomyces cerevisiae*
  - proteom mitochondriów: ~500-800 białek
  - 8-9 kodowanych w mtDNA
  - Ponad 180 genów jądrowych, wymaganych do utrzymania i ekspresji genomu mitochondrialnego
    - polimerazy DNA i RNA, białka rybosomu itp.
- Sickmann, A. et al. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13207–12 (2003)

# Skąd się bierze proteom mitochondriów?

---

- Proteom mitochondrium to ok. 600 (drożdże)-1500 (ssaki) białek
- Geny kodowane w mtDNA: 2-67, większość 12-20 białek
- Geny kodowane w genomie jądrowym
  - Pochodzenia eubakteryjnego (symbiont)
  - Pochodzenia archaebakteryjnego (gospodarz)
  - Pochodzenia wirusowego (fagowego) – polimeraza RNA i DNA
  - Nieustalonego pochodzenia

# Genom mitochondrialny teraz

---



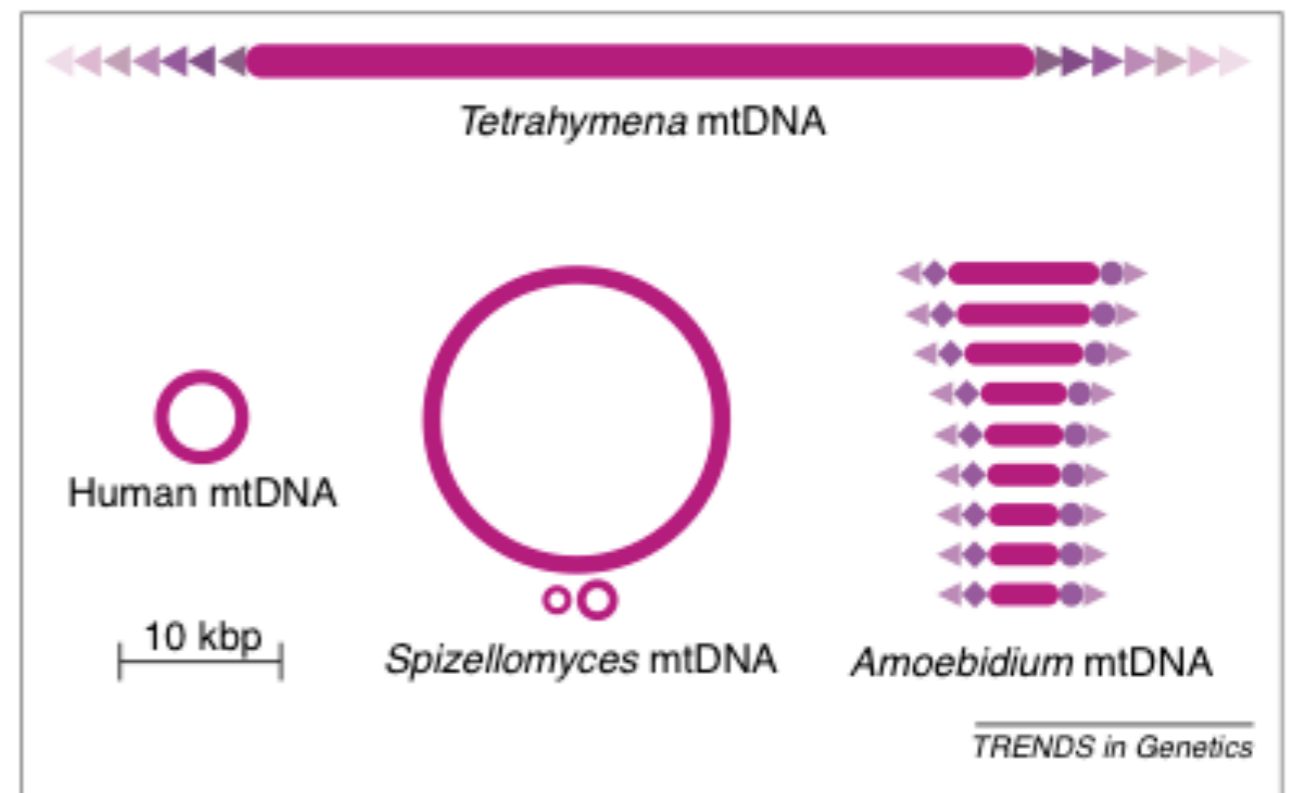
# Różnorodność mtDNA

---

- Przy zbliżonym zestawie funkcji genomu mitochondrialne wykazują ogromną różnorodność organizacji fizycznej i genetycznej
- Specyficzne mechanizmy ekspresji
  - Redagowanie (editing) – rośliny, niektóre Protista
  - Niestandardowe kody genetyczne – zwierzęta, grzyby, niektóre Protista
  - Introny grupy I i II – rośliny, grzyby, Protista
  - Policistronowe transkrypty
  - itp.

# Fizyczna organizacja mtDNA

- Liniowa monomeryczna
- Kolistą monomeryczna
- Liniowa w postaci konkatamerów (daje kolistą mapę genetyczną)
- Częściowo w postaci RNA



Burger et al., *TRENDS in Genetics* Vol.19 No.12 December 2003

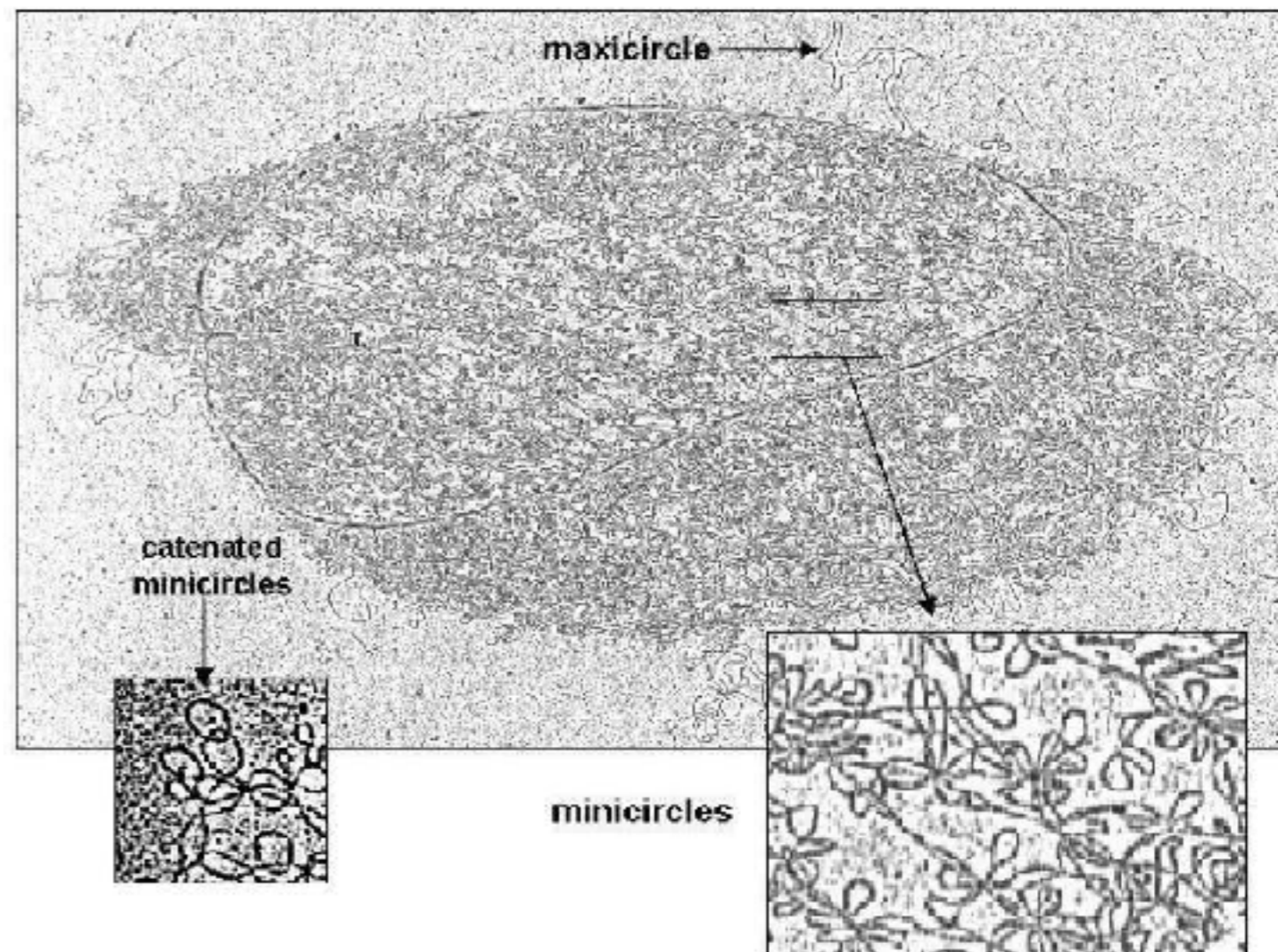


# kDNA Kinetoplastida

---

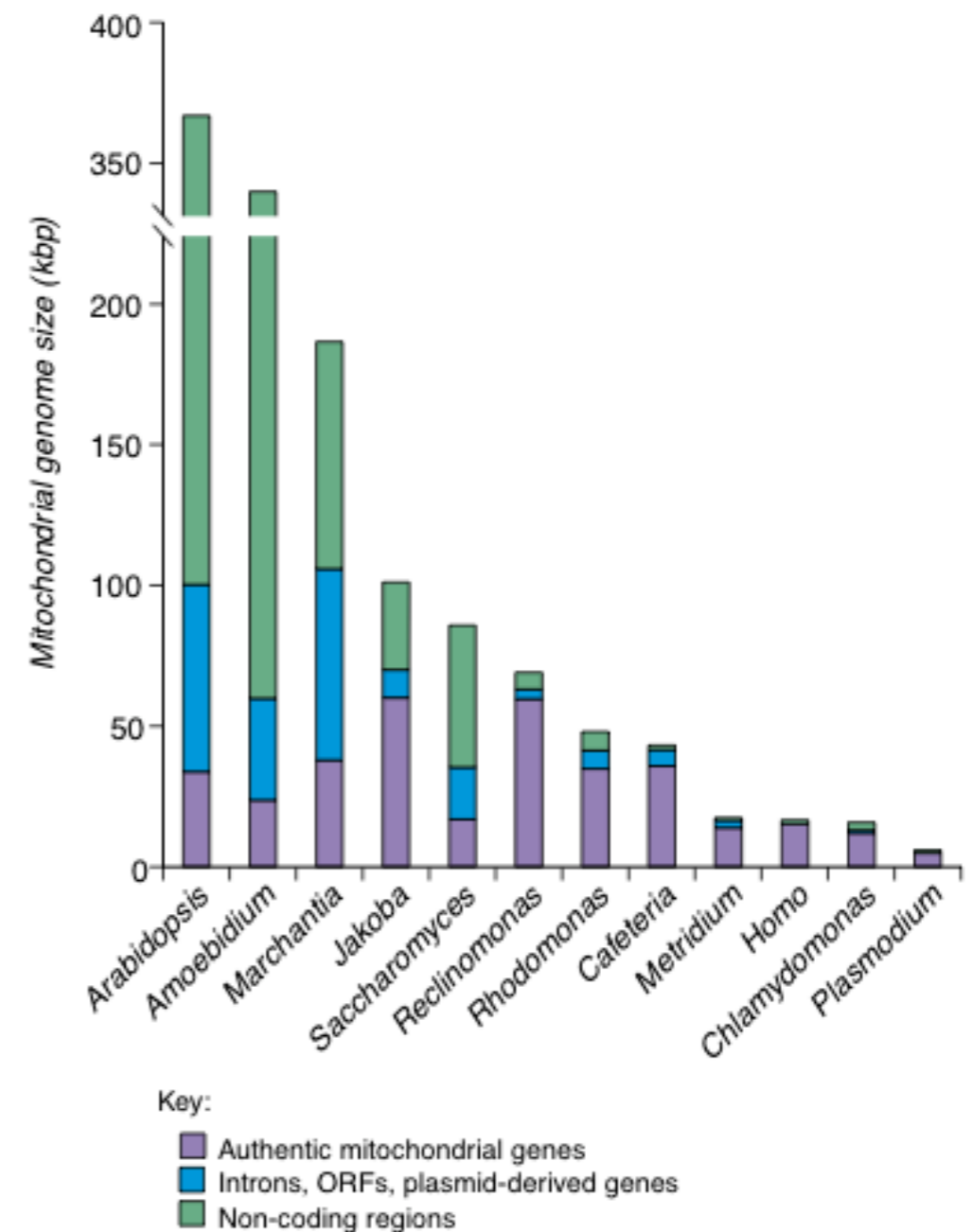
- Sieć splecionych cząsteczek kolistych
- Maxicircle – geny struktury, rRNA, tRNA
- Minicircle – gRNA kierujące redagowaniem (insercje U)

## kDNA network from *L. tarentolae*



# Rozmiary mtDNA

- Od 6 kb (*Plasmodium*) do ~500kb (rośliny), a nawet >2000 kb (dyniowate)
- Najczęściej 15-60 kb
- Brak wyraźnej korelacji między rozmiarem genomu a ilością genów – obszary niekodujące, rekombinacja, duplikacje



TRENDS in Genetics

# Organizacja mtDNA

---

- Zwarta
  - Np. Metazoa (~16 kb u ssaków)
  - Brak długich sekwencji niekodujących
  - Brak intronów, krótkie (lub nieobecne) sekwencje UTR
  - Niewiele (2-3) policistronowych transkryptów, krótki obszar regulatorowy
- Luźna
  - Np. *S. cerevisiae* (~80 kb), rośliny (~500, a nawet >2000 kb)
  - Długie sekwencje niekodujące
  - Introny, długie sekwencje UTR
  - Transkrypty mono- lub policistronowe, ale bardziej liczne (~13 u *S. cerevisiae*)
- Nie ma korelacji między zwartością genomu jądrowego i mitochondrialnego (np. *S. cerevisiae* vs. ssaki)

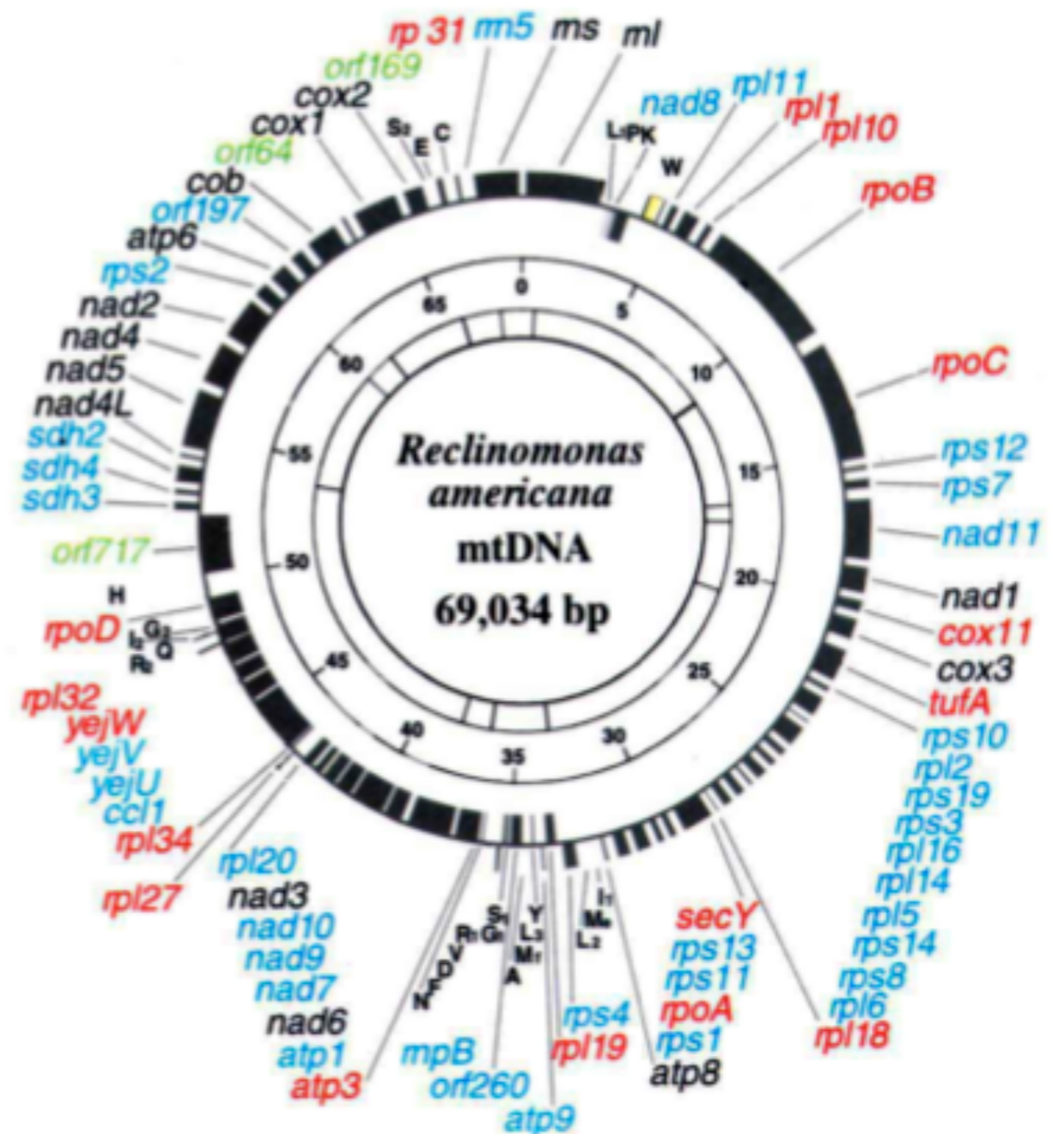
# Różnorodność mtDNA - ekspresja

---

- Niestandardowy kod genetyczny (Metazoa, grzyby, niektóre Protista)
- Introny (grupa I i II), niekiedy zawierają ORF (np. maturazy)
- Redagowanie (editing)
- Fuzje genów (*COX1* i *COX2* *Amoebozoa*) i geny chimeryczne, geny nakładające się
- Geny podzielone
- Gen rozbity między jądro i mtDNA (*COX2* *Scenedesmus*, *rpl2* roślin)

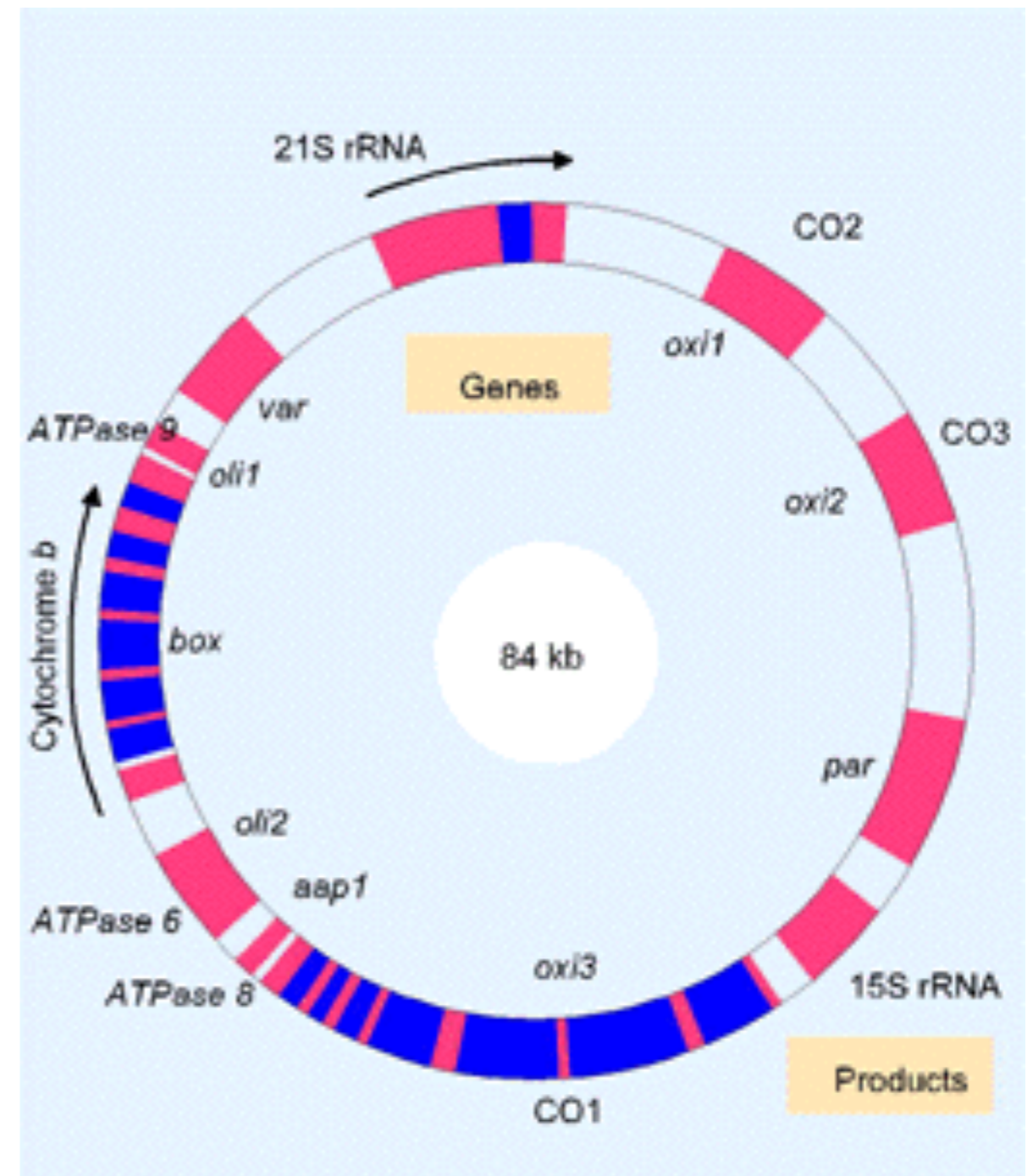
# *Reclinomonas* – archaiczny mtDNA

- 70 kb
- 98 genów, z tego 67 koduje białka, 18 z nich występuje w mtDNA jedynie u Jakobidae
- polimeraza RNA typu bakteryjnego ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ) kodowana w mtDNA (rpoA-D)
- rybosomy zawierają 5S rRNA kodowany w mtDNA
- W mRNA występuje sekwencja Shine-Dalgarno
- Organizacja genów białek rybosomalnych wykazuje ślady konserwacji organizacji operonów bakteryjnych



# Genom mitochondrialny *S. cerevisiae*

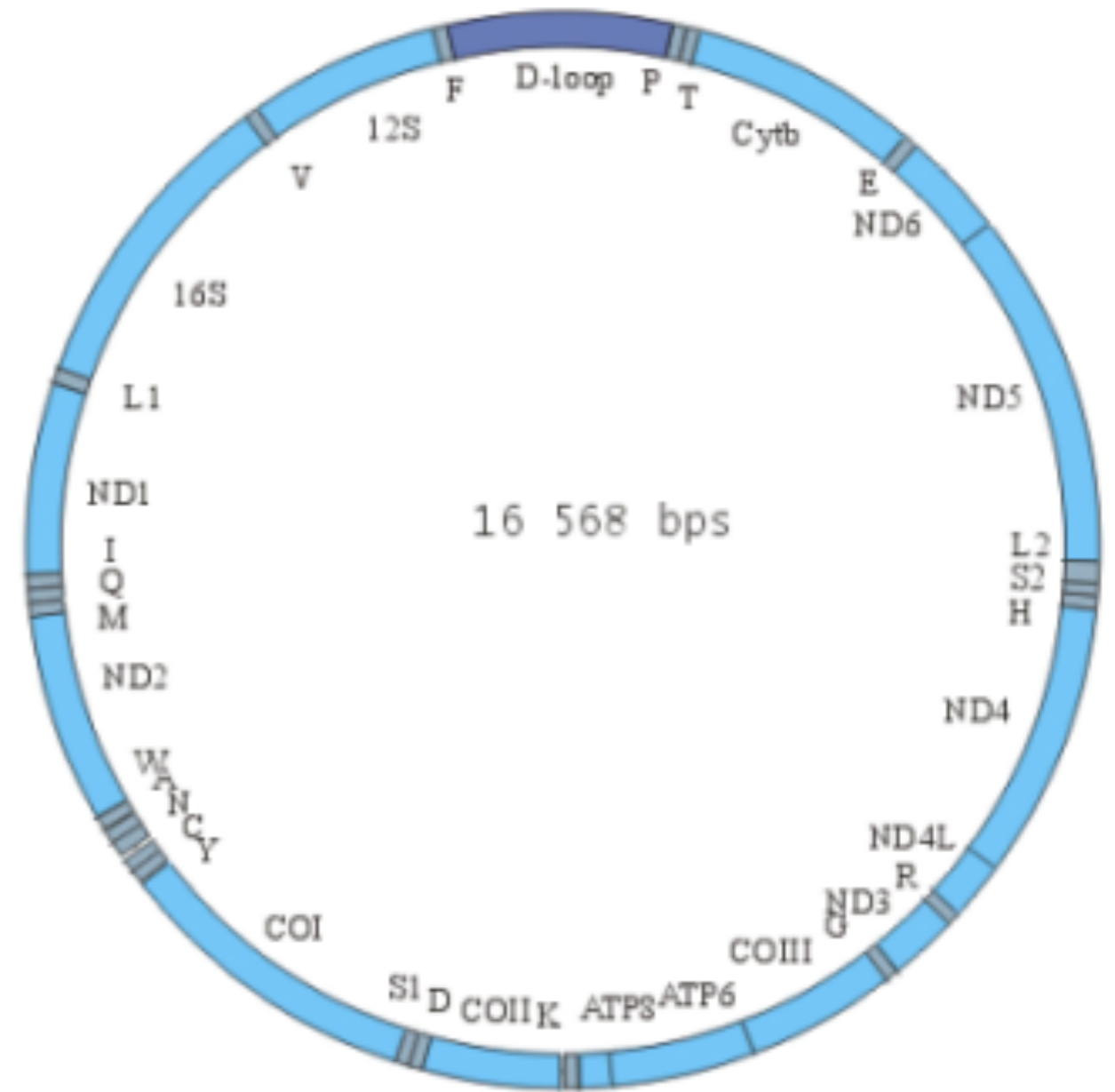
- kolista (?-mapa), wysoce polimorficzny, ~80kb
- mała gęstość genów
- bardzo bogaty w AT (17% GC)
- 8-9 genów kodujących białka; ~10 ORF intronowych, 24 tRNA, 2 rRNA, 1 RNA RNazy P
- 7-8 elementów ori, złożone mechanizmy replikacji



# Człowiek

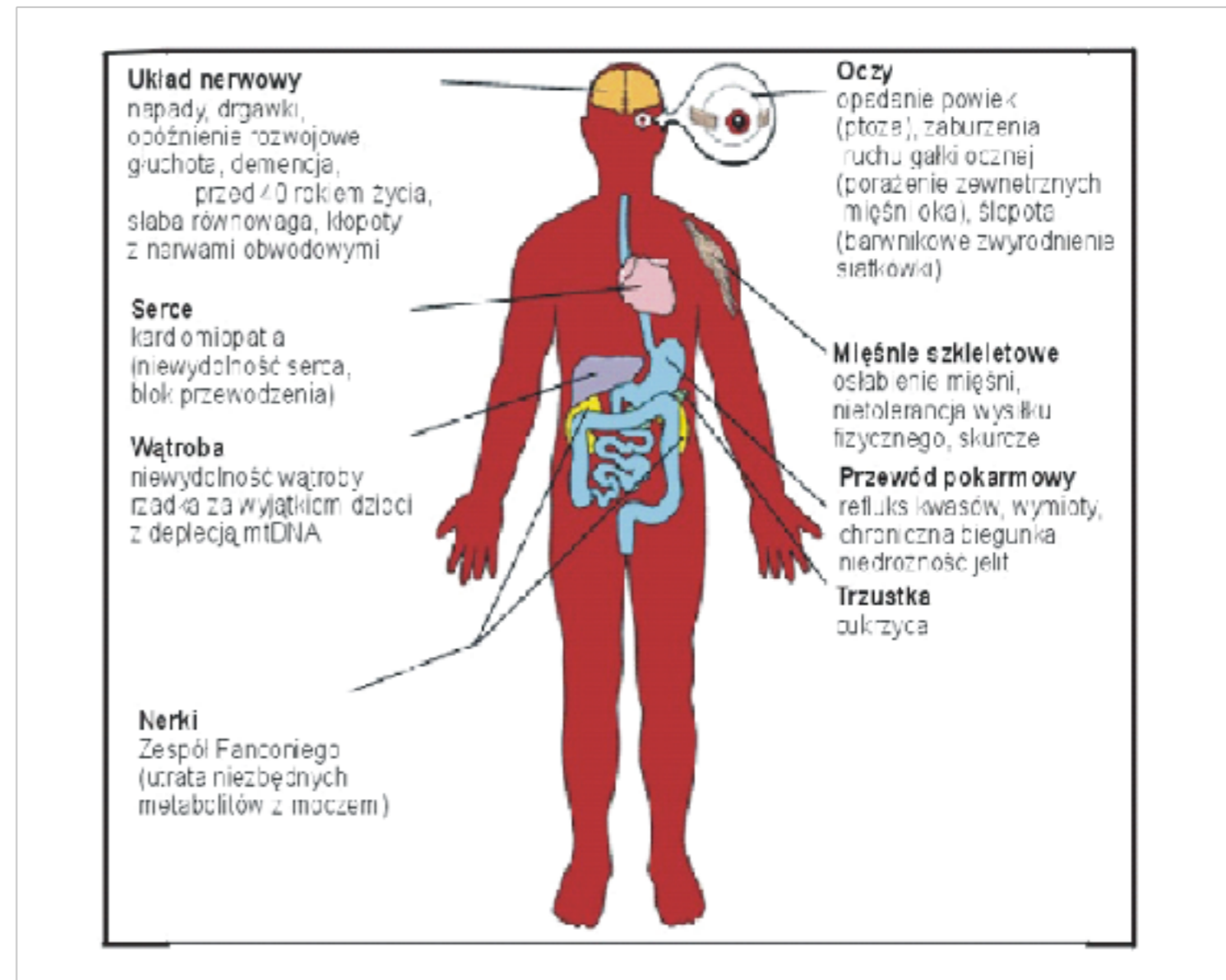
---

- 16 568 par zasad
- koduje –
  - 13 białek łańcucha oddechowego (z 84),
  - 2 rRNA (16 S i 12 S),
  - 22 tRNA
- Zwarty - brak intronów, brak lub niewielkie obszary niekodujące między genami, czasem brak pełnego kodonu STOP (wprowadzany poprzez poliadenylację)
- 2-3 pierwotne transkrypty, obróbka przez wycinanie tRNA
- Dziedziczenie od matki (mitochondria plemnika niszczone przez mechanizm zależny od ubiquitynacji)



# Mitochondria i choroby

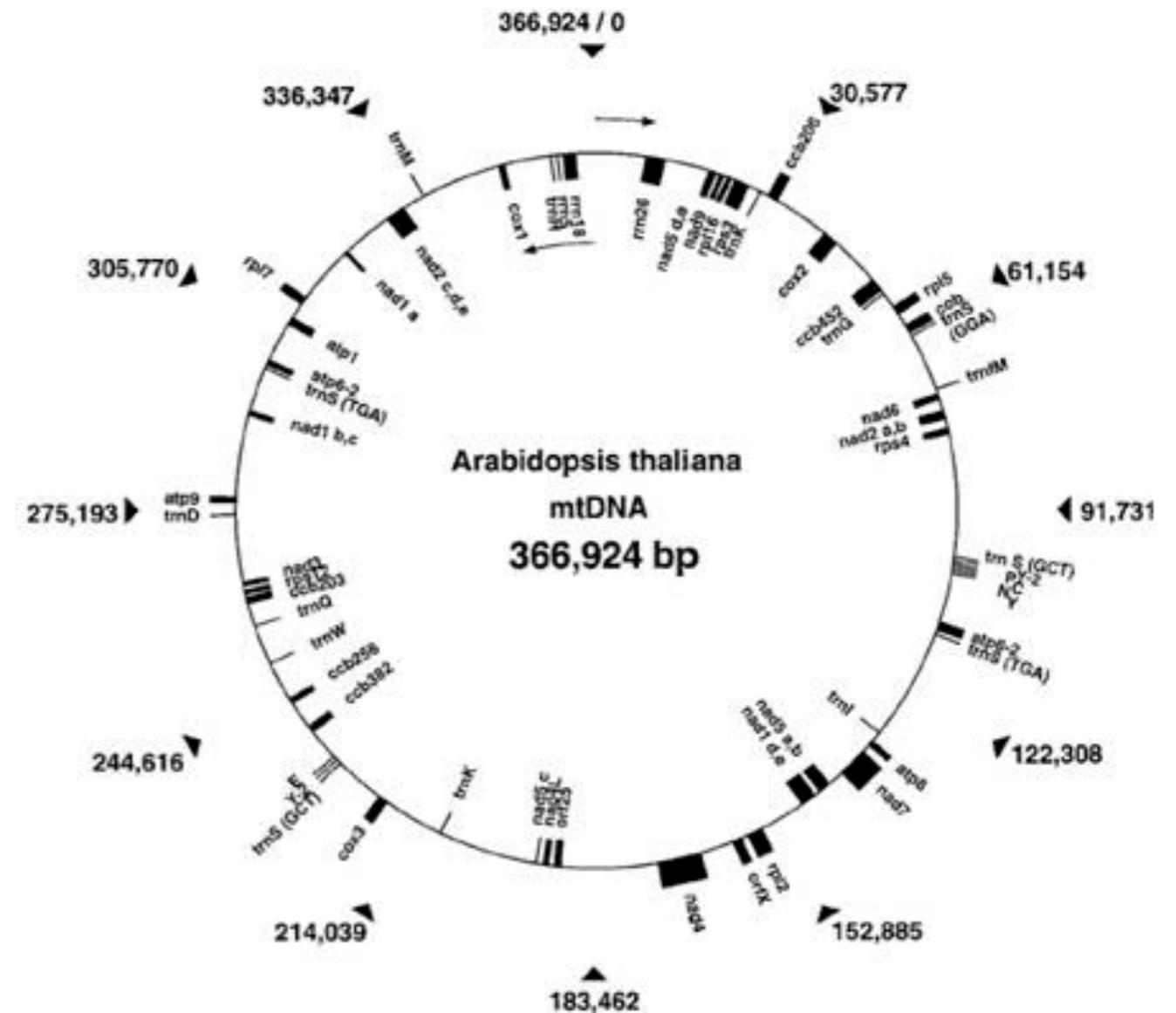
- Wiele chorób człowieka związanych jest z zaburzeniami w mitochondriach
- Mutacje w mtDNA (kilkaset znanych)
  - dziedziczone tylko od matki
- Mutacje w genach jądrowych (~150 genów)
- Około 1/10 000 urodzeń
- Mitochondria odgrywają też rolę w częstych chorobach (np. nowotwory, cukrzyca)





# Rośliny

- Duże genomy o niskiej gęstości genów, 50-60 genów (u *A. thaliana* 33 białka, 3 rRNA i 20 tRNA)
- Elementy repetytywne, częsta rekombinacja dająca populacje cząsteczek subgenomowych (sublimony)
- Standardowy kod genetyczny, editing, introny
- Częsta wymiana genów między mtDNA, cDNA i nDNA

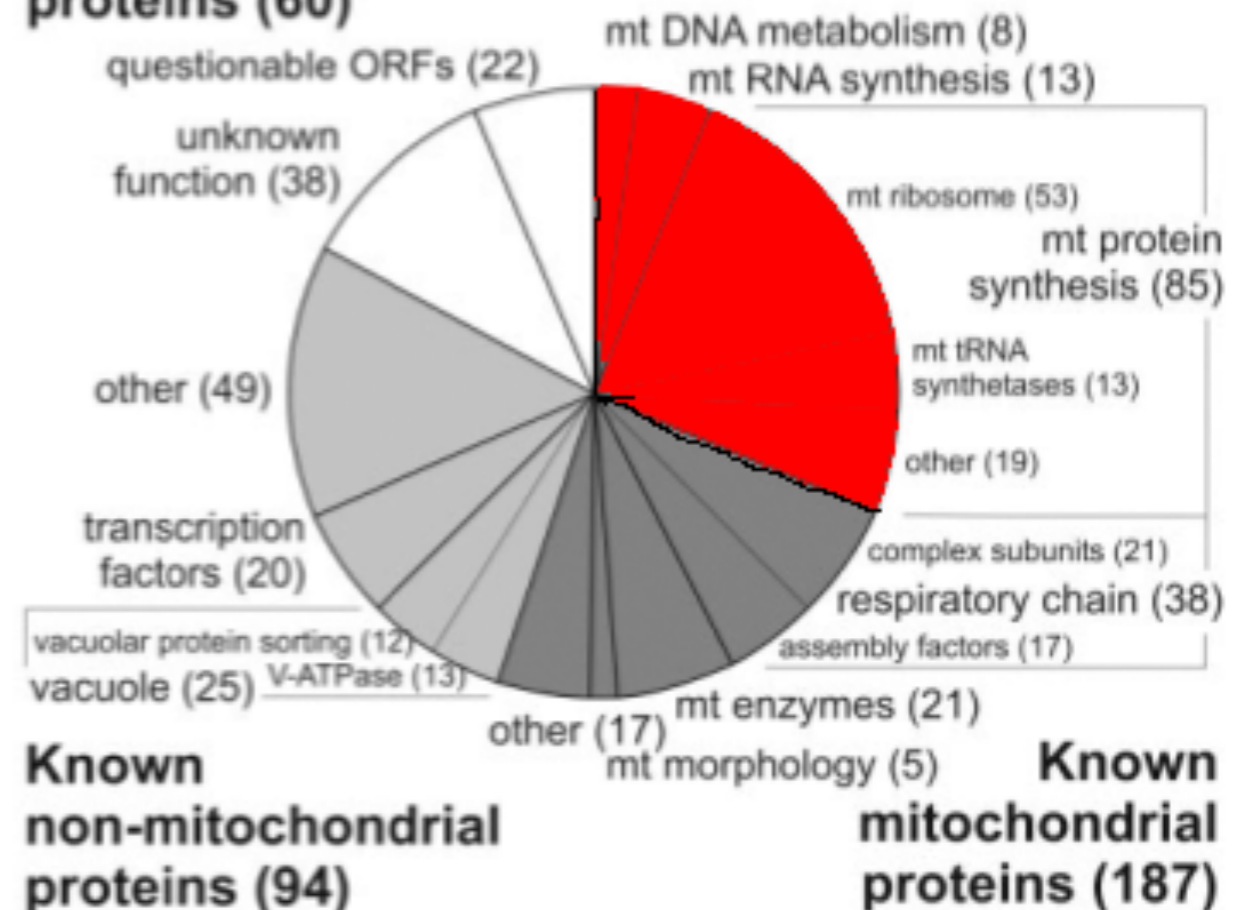


# Po co ciągle utrzymywać genom mitochondrialny?

- Utrzymywanie mitochondrialnego systemu genetycznego jest kosztowne:
  - koduje zaledwie ~1% proteomu mitochondrialnego
  - ~25% kodowanych jądrowo białek mitochondrialnych uczestniczy w utrzymaniu i ekspresji mtDNA

## Nuclear *pet* genes of *S. cerevisiae* (341)

### Unknown proteins (60)



# Po co ciągle utrzymywać genom mitochondrialny?

---

- “Zamrożenie” przez niestandardowy kod genetyczny
- Wyjaśnienie mechanistyczne
- Wyjaśnienie regulacyjno-koordynacyjne
- Wyjaśnienie regulacyjno-ewolucyjne

# Wyjaśnienie mechanistyczne

---

- Istnieją geny, które są kodowane w mtDNA u wszystkich znanych organizmów
  - CYTB, COX1, rRNA
- I takie, które są kodowane w mtDNA u ogromnej większości organizmów
  - ATP6,8,9; tRNA; ND1-6; COX2,3
- Kodowane białka lokalizują się w wewnętrznej błonie
- Próby rekodowania genu w jądrze niekiedy skuteczne (ATP8, maturaза bl4), niekiedy nie (CYTB, ND4)

# Wyjaśnienie mechanistyczne

---

- W mtDNA są kodowane te białka, których import do mitochondrium byłby niemożliwy, mało wydajny lub kosztowny
  - wykazane doświadczalnie dla CYTB
- W mtDNA kodowane są te białka, których obecność poza wewnętrzną błoną mitochondrium byłaby niebezpieczna dla komórki

# Wyjaśnienie regulacyjno-koordynacyjne

---

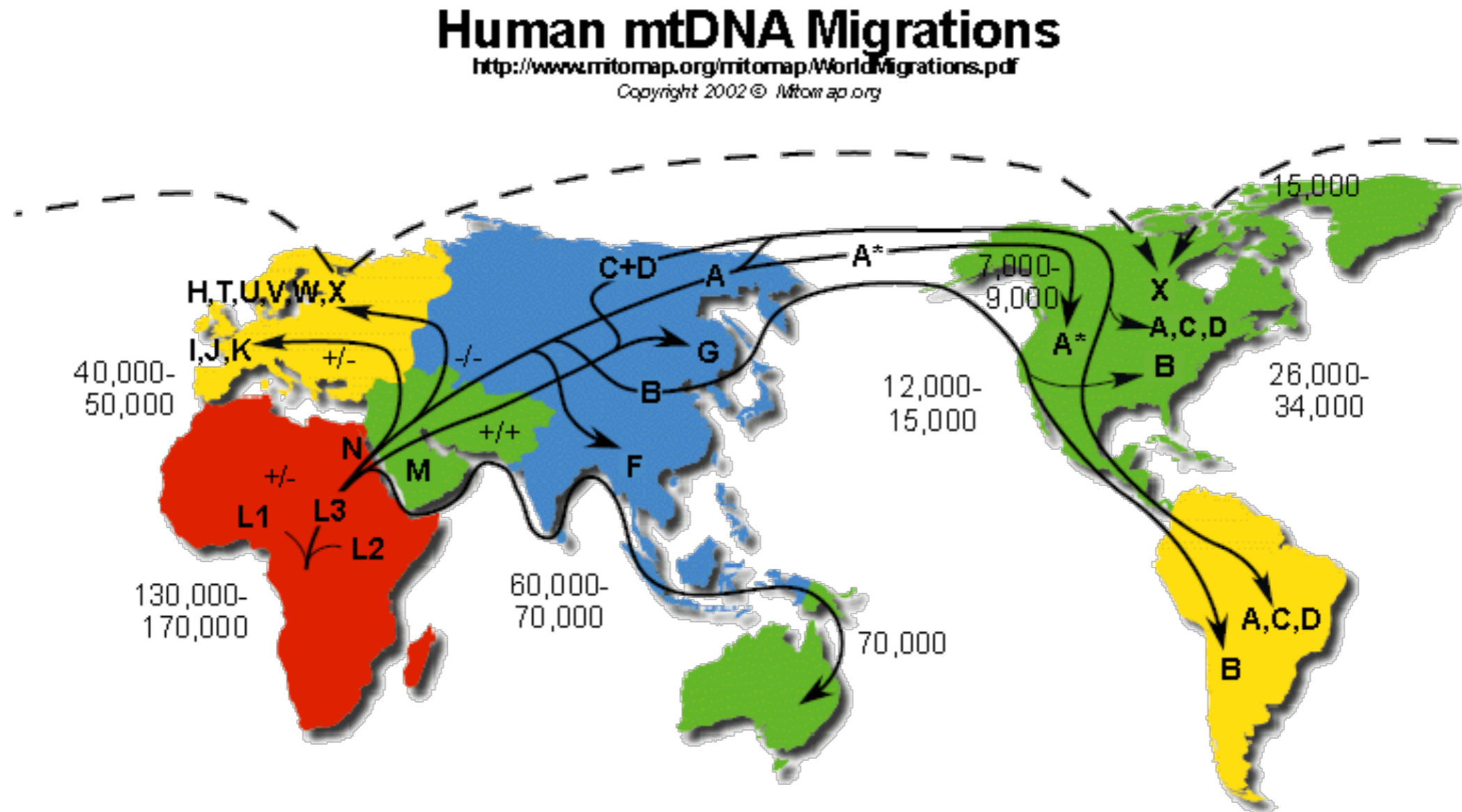
- W mtDNA kodowane są te geny, których ekspresja powinna być bezpośrednio koordynowana w organellum
  - Np. regulacja transkrypcji w mtDNA *S. cerevisiae* przez poziom ATP
- Koordynacja syntezy białek i składania kompleksów w wewnętrznej błonie mitochondrium – zapewnienie stechiometrii i organizacji kompleksów
  - fizyczny związek translacji z błoną wewnętrzną

# Wyjaśnienie regulacyjno-ewolucyjne

---

- Większość organizmów wyższych utrzymuje w mtDNA podstawy zestaw genów, kodujących białka wewnętrznej błony uczestniczące w oddychaniu
- U jednokomórkowców skład mtDNA jest bardziej zmienny, ale utrata z mtDNA całych kompleksów (np. cV u *Apicomplexa*) zachodzi głównie u organizmów pasożytniczych
- U wielokomórkowców wyewoluowały mechanizmy zapewniające dziedziczenie jednorodzicielskie

# Zmienność mtDNA ma znaczenie adaptacyjne



+/-, +/+, or -/- = Dde I 10394 / Alu I 10397  
\* = Rsa I 16329

Mutation rate = 2.2 - 2.9 % / MYR  
Time estimates are YBP



# Ewolucyjna medycyna mitochondrialna

---

- Warianty zaadoptowane do zimnego klimatu:
  - słabsze sprzężenie OXPHOS z wytwarzaniem ATP (większe straty – większa produkcja ciepła).
  - Korelacje z zapadaniem na choroby związane z niedostatecznym wytwarzaniem energii (np. LHON), ale mniejsza szkodliwość diety wysokokalorycznej
    - mniejsza zapadalność na związane z wytwarzaniem ROS choroby degeneracyjne, cukrzycę
    - długowieczność
    - np. haplogrupa J (Europa), D (Azja)

# Ewolucyjna medycyna mitochondrialna

---

- Warianty zaadoptowane do ciepłego klimatu:
  - silne sprzężenie OXPHOS z wytwarzaniem ATP i wydajne wykorzystanie kalorii z pokarmu.
  - w połączeniu z wysokokaloryczną dietą zwiększone wytwarzanie ROS
  - podatność na choroby degeneracyjne (np. AD), cukrzycę

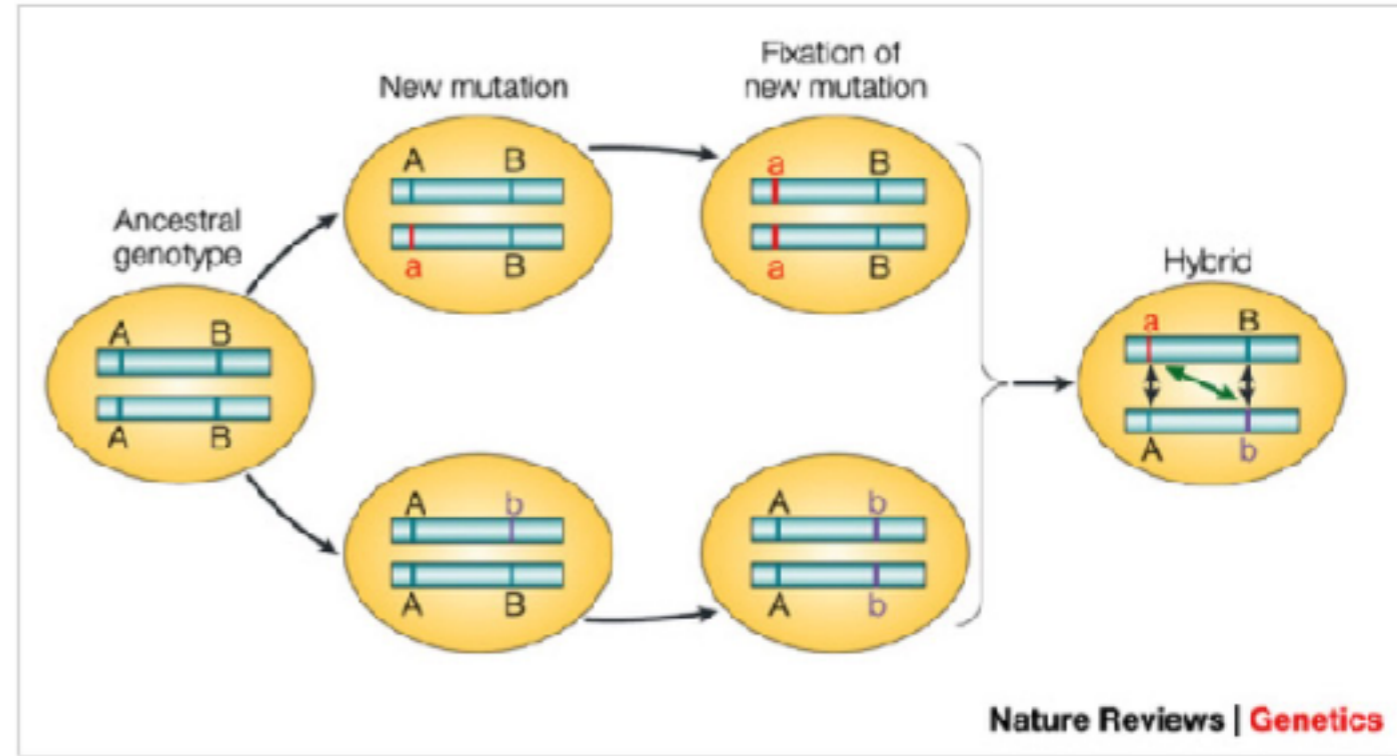
# Wyjaśnienie regulacyjno-ewolucyjne

---

- Utrzymywanie genów kodujących podstawowe białka kompleksów łańcucha oddechowego w wysoce zmiennym mtDNA ułatwia adaptację do zmiennych wymagań energetycznych środowiska
- Utrzymywanie sprzężenia tych wariantów poprzez dziedziczenie jednorodzicielskie umożliwia koewolucję i koordynację zmienności adaptacyjnej

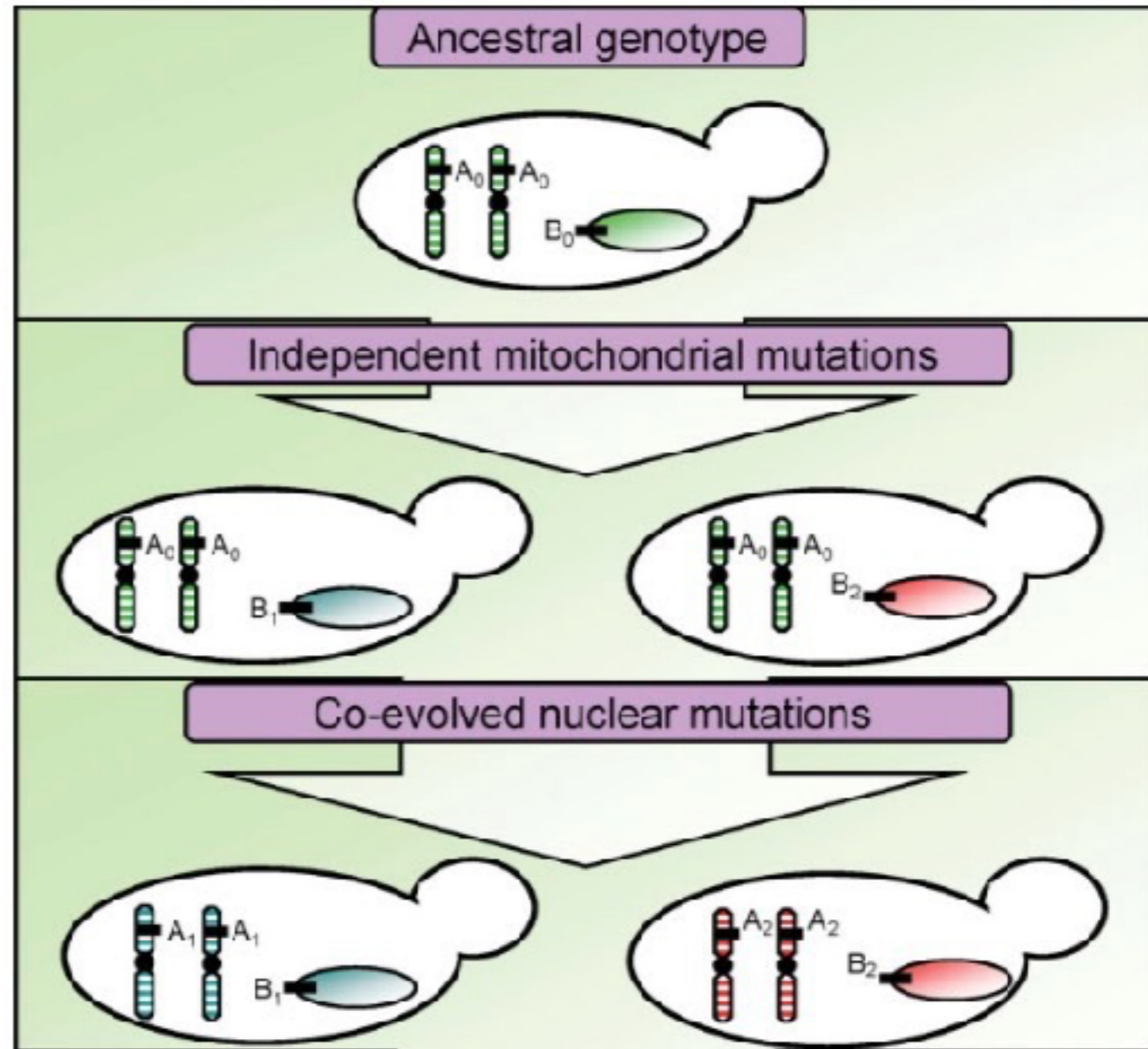
# mtDNA i jądro w ewolucji

- Powstanie nowego gatunku - specjacja - wymaga powstania bariery niezgodności genetycznej
- Do tego nie wystarczy jeden gen
- Model Dobzhanskiego-Müllera - niezgodność dwóch współpracujących genów



# mtDNA i jądro w specjacji

- Współzależność jądro-mitochondria jako podstawa bariery międzygatunkowej
- Genom mitochondriów w ewolucji zmienia się bardzo szybko
- Genom jądrowy musi nadążać



# MRS1 i intron COX1 u drożdży

- Pierwszy opisany przykład bariery jądro-mitochondrialnej (Herbert CJ *et al.* Gene Expr. 1992;2(3): 203-14)
- Mrs1p *S. cerevisiae* nie radzi sobie z nowym intronem, który pojawił się w genie *COX1* *S. paradoxus*

	Sc-MRS1	Sp-MRS1
Sc-mito	+	+
Sp-mito	-	+



# U zwierząt

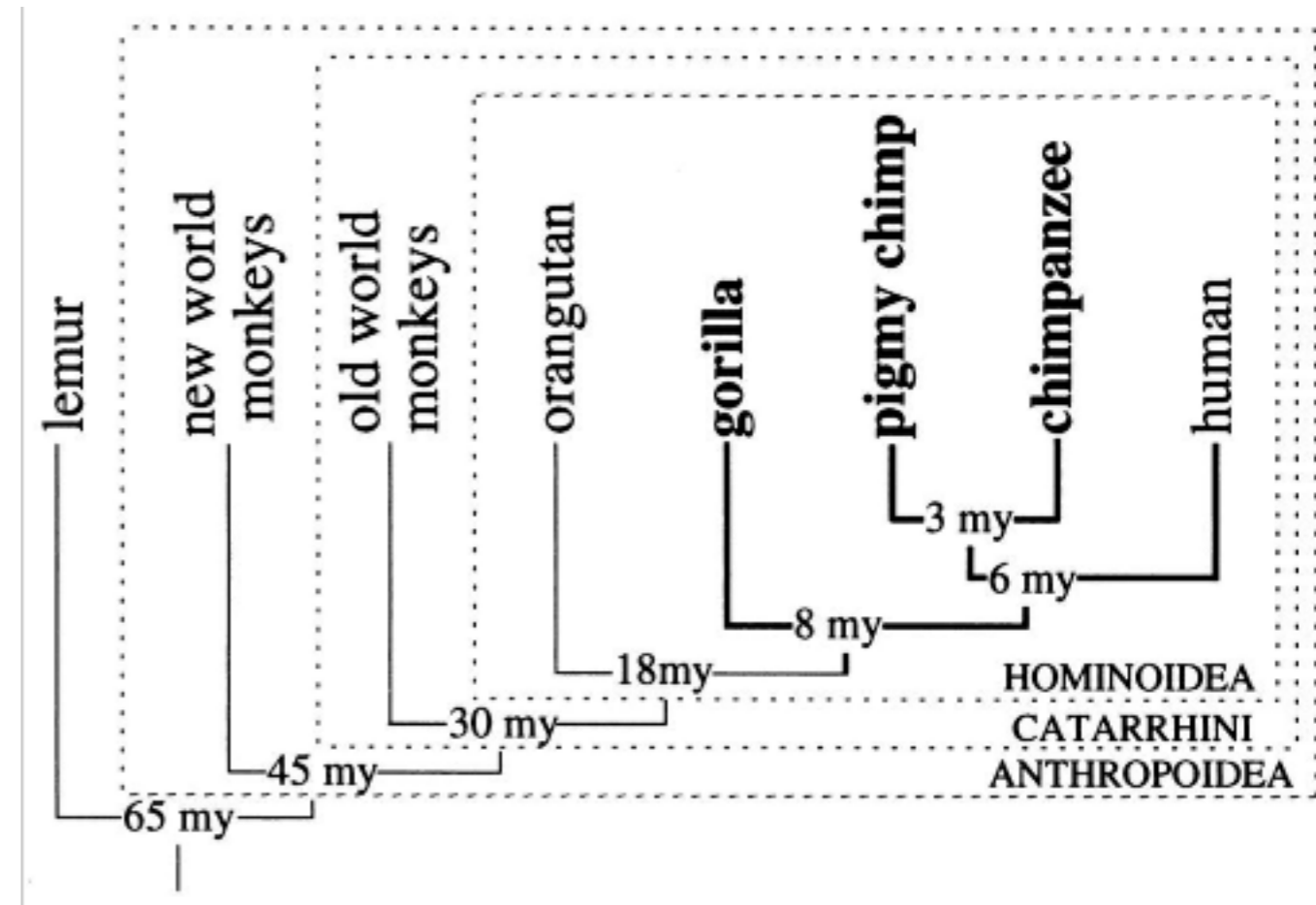
---

- Myszy ksenomitochondrialne (*Mus musculus*)
  - mtDNA z *M. spretus* lub *M. dunni* - działa, z lekkimi objawami defektu mitochondrialnego
  - mtDNA ze szczura *Rattus norvegicus* - ciężki defekt

McKenzie *et al.* 2004, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(6): 1685–1690; Dey *et al.* 2000, *J Biol Chem.* 275(40): 31520-7; McKenzie & Trounce, 2000, *J Biol Chem.* 275, 31514-31519.

# U naczelnym

- Komórki człowieka z mtDNA
  - szympansa i goryla - funkcjonują, lekkie defekty
  - orangutana i dalszych gatunków - nie funkcjonują
- Kenyon & Moraes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(17): 9131–9135; Barrientos et al. *J Biol Chem.* 1998, 273(23):14210-7.





# Podsumowanie

---

- Mitochondria to potomkowie bakterii
- Śladem ich historii ewolucyjnej jest własny genom - mtDNA
- mtDNA jest niewielki, ale bardzo ważny dla ewolucji

