

Mitokondriyal DNA heteroplazmi dinamikleri: İnsan sağlığı ve hastalıkları üzerindeki etkileri

Ali TOPAK

Bursa Yüksek İhtisas Eğitim Ve
Araştırma Hastanesi

The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease

James B. Stewart¹ and Patrick F. Chinnery²

Abstract | Common genetic variants of mitochondrial DNA (mtDNA) increase the risk of developing several of the major health issues facing the western world, including neurodegenerative diseases. In this Review, we consider how these mtDNA variants arose and how they spread from their origin on one single molecule in a single cell to be present at high levels throughout a specific organ and, ultimately, to contribute to the population risk of common age-related disorders. mtDNA persists in all aerobic eukaryotes, despite a high substitution rate, clonal propagation and little evidence of recombination. Recent studies have found that *de novo* mtDNA mutations are suppressed in the female germ line; despite this, mtDNA heteroplasmy is remarkably common. The demonstration of a mammalian mtDNA genetic bottleneck explains how new germline variants can increase to high levels within a generation, and the ultimate fixation of less-severe mutations that escape germline selection explains how they can contribute to the risk of late-onset disorders.

Özet

- Mitokondriyal DNA'nın yaygın genetik varyantları nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere batı dünyasının karşı karşıya kaldığı önemli sağlık sorunlarının gelişme riskini artırıyor.
- Biz bu makalede mtDNA varyantlarının nasıl ortaya çıktığını, tek bir hücredeki tek bir molekülden köken alıp da spesifik bir organda nasıl yüksek seviyelere ulaştığını ve sonuçta yaşla ilişkili yaygın görülen bozuklukların toplumdaki riskine nasıl katkıda bulunduğunu inceledik.

Makale içeriği

- Mitokondri evrimi
- Mitokondriyal DNA ile ilgili genel bilgi
- Homoplazmi, heteroplazmi
- Mitokondriyal DNA mutasyonlarının özellikleri
- mtDNA somatik mutasyonları hastalık ilişkisi
- mtDNA mutasyon kanser ilişkisi
- Bölünen ve bölünmeyen hücrelerde heteroplazmi
- Vejetatif segregasyon, relaxed replication, mitokondriyal genetik darboğaz hipotezi, Afrika'dan çıkış hipotezi
- Germline transmisyonu sırasında moleküler seleksiyon
- mtDNA polimorfizm hastalık ilişkisi

- Her 4.300 de bir kişiyi etkilediği bilinmektedir
- Yüzlerce farklı nokta mutasyonu ve delesyonu
- Birbiriyle örtüşen çok fazla sayıda klinik fenotip
- Doğum<-----<Yaşlılık
- Sinir sistemi
- Yaygın görülen geç başlangıçlı hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma fenotipleri

Mitochondrial biogenesis and mtDNA

- 2 milyar yıl önce Proteobacteria ve prokaryotik hücre ilişkisi -----
→ mitokondri
- Hücresel proteomların yaklaşık %10' unu içeren mitokondri hücresel enerji metabolizmasında merkezi bir rol oynar.
- Bu proteomlar intrasellüler kalsiyum sinyalizasyonunda, demir-sülfür halkalarının biyogenezinde ve apoptotik hücre ölümünde önemlidir.

- 16 569 baz çifti uzunluğunda, çift sarmallı yapı
- Ağır zincir (H) ve hafif zincirden (L) oluşur.
(molekül ağırlığını isimlendirmede guanin içeriği etkilidir)
- 2 rRNA
- 22 tRNA
- 13 mRNA olmak üzere toplam 37 gen bulunur.
- Displacement loop (kodlanmayan bölge)
- ~ 1.500 civarı olduğu tahmin edilen mitokondriyal proteinler

- **Mitokondrial DNA'nın 4 kodonu nükleer DNA'dan farklı mesajlar taşır.**
- **UGA** mitokondride **triptofan** kodlarken, nükleer genomda **“stop”** kodonudur
- **AUA** mitokondride **metionin** kodlarken, nükleer genomda **izolösin** kodonudur
- **AGA/AGG** mitokondride **“stop”** kodonu (nükleer kodondada stop kodonu olan UAA ve UAG) iken, nükleer genomda **arginin** kodunudur.

- mtDNA sirküler yapıdadır ve yoğun kodlanan bölgeler içerir.
- Bir hücre içerisinde bağımsız çoğalan çok fazla sayıda kopyası bulunur.
- Kopya sayısı 100 ile yüz bin arasında hücre tiplerine göre değişebilir.
- mtDNA hasar tamiri nükleer DNA tamirine göre daha az efektif

- Homoplazmi
- Heteroplazmi
- Maternal kalıtım
- Rekombinasyonlar göstermiyor

- mtDNA mutasyonlarıyla hastalıklar arasındaki bağlantıya dair ilk net kanıtlar, 1980'li yılların sonlarına doğru, açıklanamayan nörolojik ve nöromusküler hastalıkları olan hastalarda yapılan çalışmalarda birbirine paralel sonuçların, mtDNA'nın temel patojenik mutasyonlarının tanımlanmasını sağlamasıyla ortaya çıkmıştır.
- Leber kalıtsal optik nöropati (LHON)
- Mitokondriyal miyopatiler
- MELAS

- Klinik ve genetik heterojenite
- Maternal kalıtım
- Aynı ailede çok sayıda bireyde görülebilir.
- mtDNAdelesyonları nadir olarak kalıtsaldır.
- Homoplazmik mtDNA nokta mutasyonları genellikle, tipik olarak sadece bir doku veya organı etkileyen rölatif olarak ılımlı biyokimyasal defektlere sebep olmaktadır.

- Heteroplazmik mutasyonlar, özellikle beyin ve spinalkord, kas, periferik sinirler, kalp ve endokrin organlar olmak üzere birçok organ ve sistemlerini etkilemektedir.

- Heteroplazmik mutasyonlar için cybrid hücre dizileri kullanılan in vitro çalışmalar ve dokü-biyopsi örneklerinden izole edilmiş tek hücreler kullanılarak yapılan çalışmalar, biyokimyasal defektin mevcut laboratuvar teknikleriyle saptanabilmesi için mutant mtDNA oranlarının kritik bir eşik değere (tipik olarak %60-80) ulaşması gerektiğini göstermiştir.

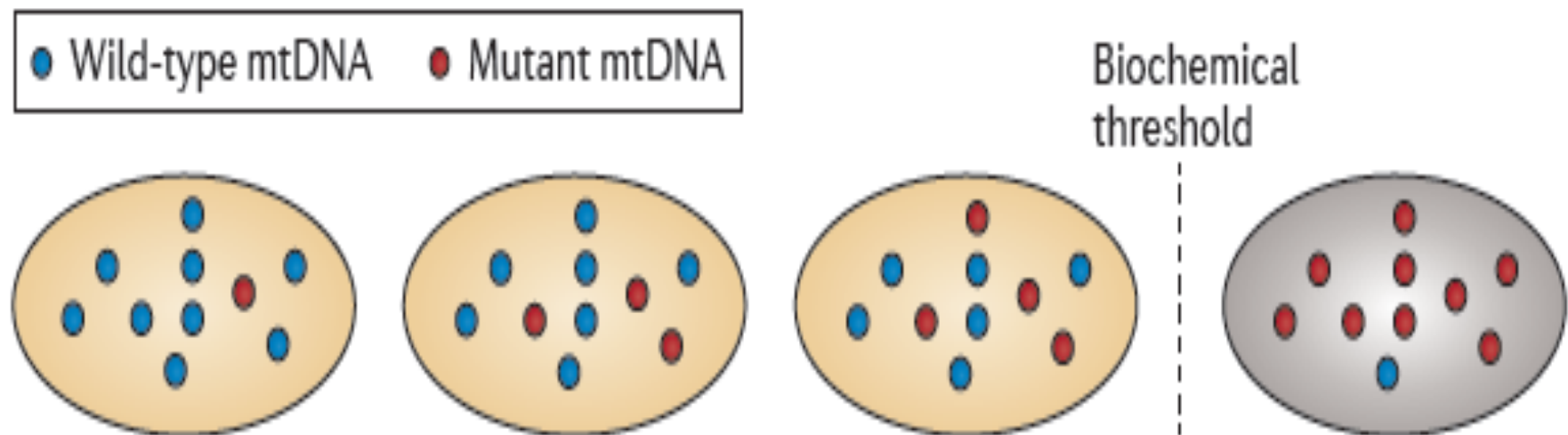


Figure 1 | **mtDNA heteroplasmy and the threshold effect.** Mitochondrial DNA (mtDNA) mutations that have occurred within approximately three human generations are usually heteroplasmic, and the same cell can contain varying proportions of mutated and wild-type mtDNA. If a mutation is pathogenic, the cell can usually tolerate a high percentage level of this variant before the biochemical threshold is exceeded and a defect in the respiratory chain is detected. Typically, this threshold level is $>80\%$, suggesting that most mtDNA mutations are haploinsufficient or recessive⁶⁴.

- Epidemiyolojik alışmalar, primer mtDNA hastalıklarının yaklaşık olarak her 4,300 kişiden 1'ini etkilediğini göstermiştir, bu da bu hastalıkları en yaygın görülen kalıtsal metabolik hastalık yapmaktadır.
- İlginç bir şekilde, en sık görülen 10 patojenik mtDNA nokta mutasyonunun, genelde düşük düzeydeki heteroplazmilerde olsa da, yaklaşık olarak her 200 sağlıklı bireyden 1'inde var olduğu bulunmuştur.

mtDNA somatik mutasyonları ve hastalıkları

- Sağlıklı yaşlılardan alınan doku biopsileri çok düşük düzeylerde birkaç farklı mtDNA mutasyonu içermekteydi ve hem mtDNA delesyonları hem de nokta mutasyonları tipik olarak post-mitotik (bölünmeyen) dokularda olmak üzere aynı sağlıklı yaşlı bireylerde tespit edildi³²⁻³⁵

mtDNA somatik mutasyonları ve hastalıkları

- Bir doku veya organdaki toplam mutasyonal yük düşük olsa da, birbirinden bağımsız mutasyonlar hücreler içinde daha yüksek düzeylere akümüle olabilmekte ve böylece biyokimyasal defektlere sebep olabilmektedir.³³
- Geç başlangıçlı nörodejenaratif hastalıklarda (Parkinson^{36,37}ve Alzheimer³⁵gibi) etkilenen organlarda biyokimyasal olarak yetersiz hücreler artmış sıklıkta gözlemlenmiştir.

mtDNA mutasyon kanser ilişkisi

- mtDNA mutasyonları sık görülen kanserlere sahip hastalarda da gözlemlenmiştir^{40,41} , bu da bizi onkogoneze veya metastatik yayılıma katkı sağlayabilecekleri kanısına yönlendirmektedir.
- Bu görüş, malignitelere oksidatif metabolizmadan glikolize bir kaymanın (Warburg etkisi olarak bilinir) olması sebebiyle ilgi çekicidir.

mtDNA mutasyon kanser ilişkisi

- Ancak günümüzdeki 1,675 tümörde yapılan en kapsamlı çalışmalardan elde edilen kanıtlara göre kanserlerde mtDNA mutasyonlarının karakterize edilmesinin sonuçları bu görüşü desteklememektedir.⁴²
- Yani bu çalışmalar mutasyonların ne malign süreç tarafından oluşturulduğu ne de malign sürece katkı sağladığı fikrini oluşturmuştur.⁴²

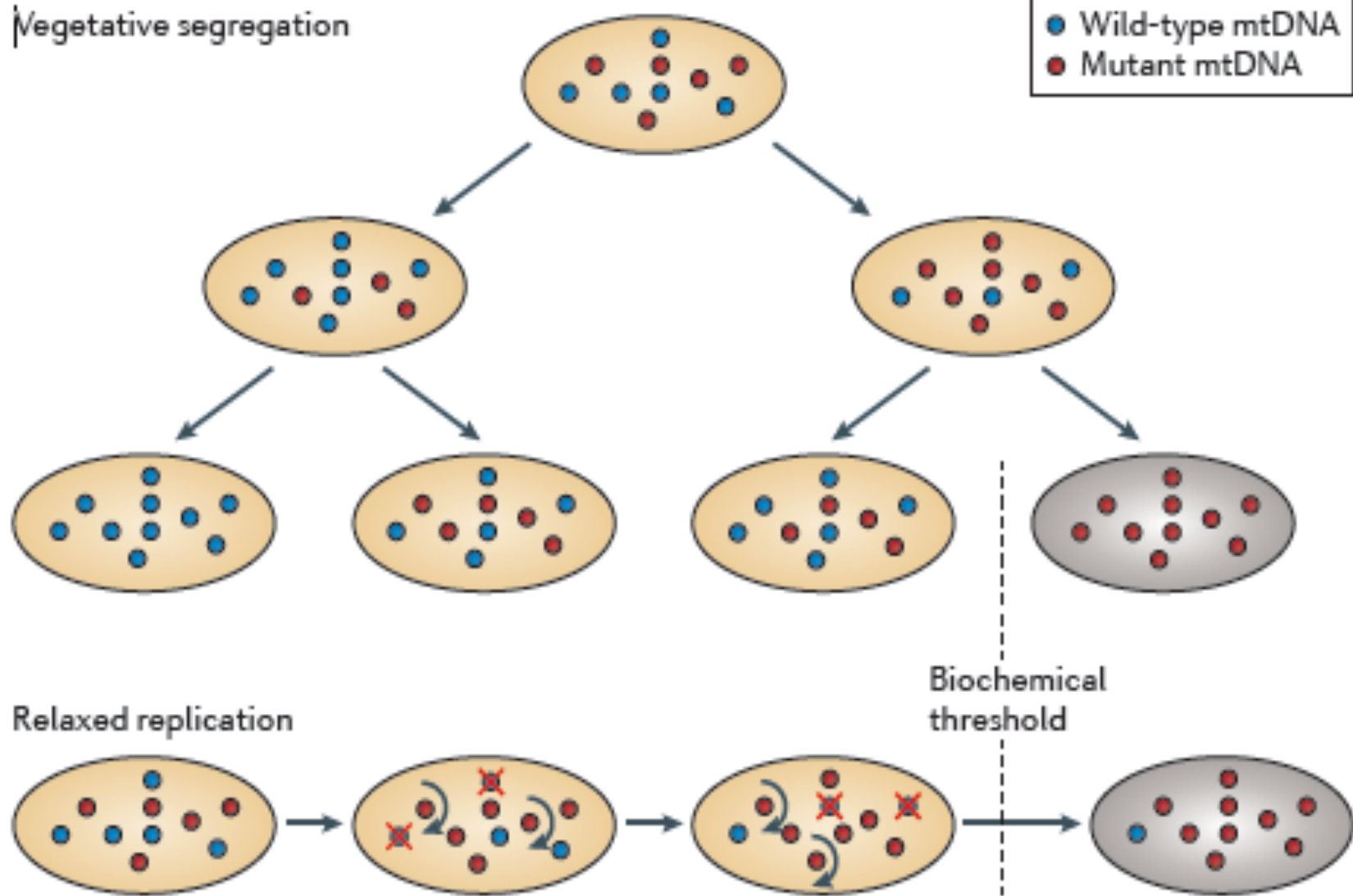
Heteroplazmilerde yaşam süresi değişiklikleri

- Bütün mtDNA mutasyonları tek bir hücre içindeki tek bir organeldeki tek bir molekülden köken alır.
- Her hücrenin binlerce mtDNA molekülü olduğu düşünülürse mutasyon içeren tek bir molekül, en güncel teknolojilerin mutasyon-saptama eşik düzeyinin çok daha altında kalmaktadır.

Bölünen hücrelerde heteroplazmi

- Bir hücre bölündüğünde, mtDNA molekülleri iki yavru hücreye geçer.
- Eğer o sırada bir heteroplazmik varyant mevcutsa, şansa göre iki yavru hücre mutant moleküllerden farklı miktarda alabilir.
- Bu sürece ***vejetatif segregasyon*** denir.

Vegetative segregation



Relaxed replication

Biochemical
threshold

Figure 3 | mtDNA heteroplasmy can change throughout the lifetime of an individual. When cells divide, the proportion of mutated (red) and wild-type (blue) mitochondrial DNA (mtDNA) can differ in the daughter cells, leading to a shift in heteroplasmy levels (either up or down) over time through vegetative segregation.

Bölünen hücrelerde heteroplazmi

- *Mutasyona hücresel düzeyde seleksiyon:*
 - ❑ Mitokondriyal kodlanan tRNAleucine 1 (UUA/G) (MTTL1) geninde sık görülen patojenik mutasyon düzeylerinin m. 3243A>G, yaşam süresi boyunca kanda katlanarak azalması

Bölünmeyen hücrelerde heteroplazmi

- mtDNA *relaxed replication* denen bir süreçle bölünmeyen hücrelerde bile devamlı olarak yıkılmakta ve replike edilmektedir.
- Heteroplazmik bir hücrede şansa göre bir varyant molekülün wild-type moleküle göre daha sık replike edilebilme ihtimali vardır.

Vegetative segregation

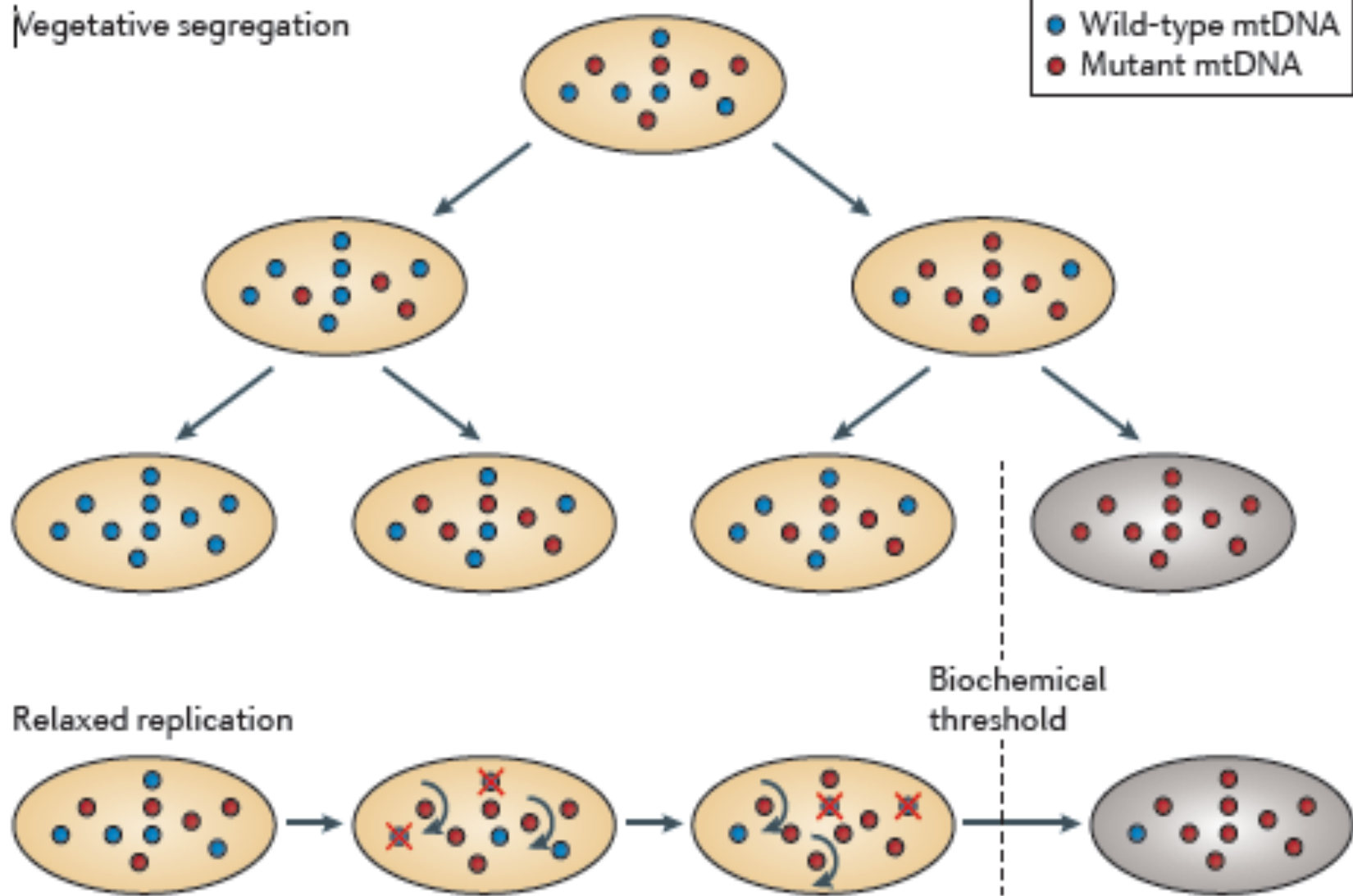


Figure 3 | **mtDNA heteroplasmy can change throughout the lifetime of an individual.** When cells divide, the proportion of mutated (red) and wild-type (blue) mitochondrial DNA (mtDNA) can differ in the daughter cells, leading to a shift in heteroplasmy levels (either up or down) over time through vegetative segregation.

Bölünmeyen hücrelerde heteroplazmi

- Ancak eğer özellikle belirli bir varyant molekül lehine veya aleyhine eğilim olursa, bu durum relaxed replication doğrultusunu etkileyecektir ve moleküler varyantlardan birinin birikmesini hızlandıracaktır.
- Örneğin, patojenik delesyonlu mtDNA molekülleri wild-type mtDNA moleküllere göre birkaç kilobaz daha küçüktür.
- Daha küçük mtDNA molekülleri daha hızlı replike olabilir ve böylece daha fazla replikasyon için daha uygun olabilir.

'Wildtype'in sürdürülmesi' hipotezi

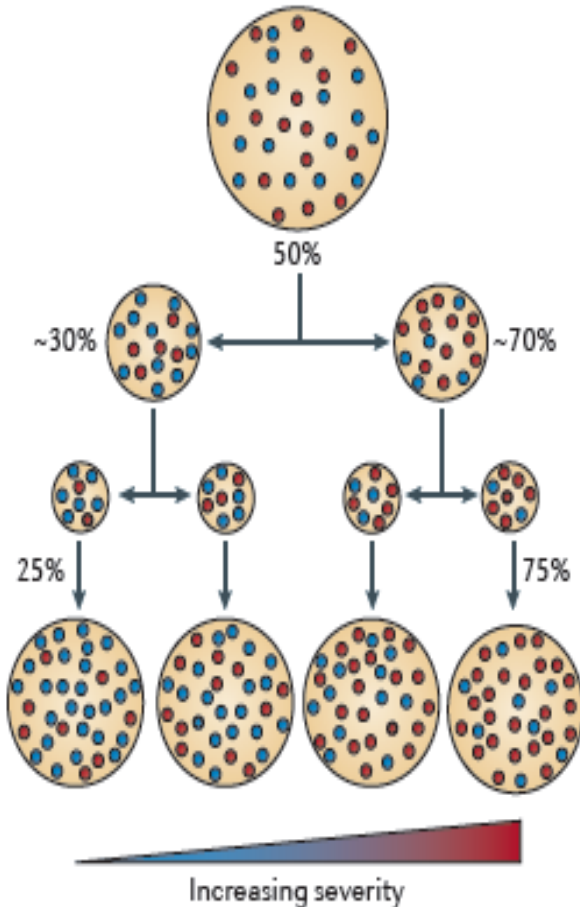
- Eğer moleküllerden biri mutasyona uğrarsa hücre dengeyi korumak adına bütün mtDNA'yı replike ederek yanıt vermektedir.
- Bu, kısa dönemde wild-type mtDNA oranını etkilemeyebilir ancak mutant mtDNA moleküllerinin oranının uzun vadede %50 sınırını geçme ihtimali vardır

mtDNA genetik darboğaz hipotezi

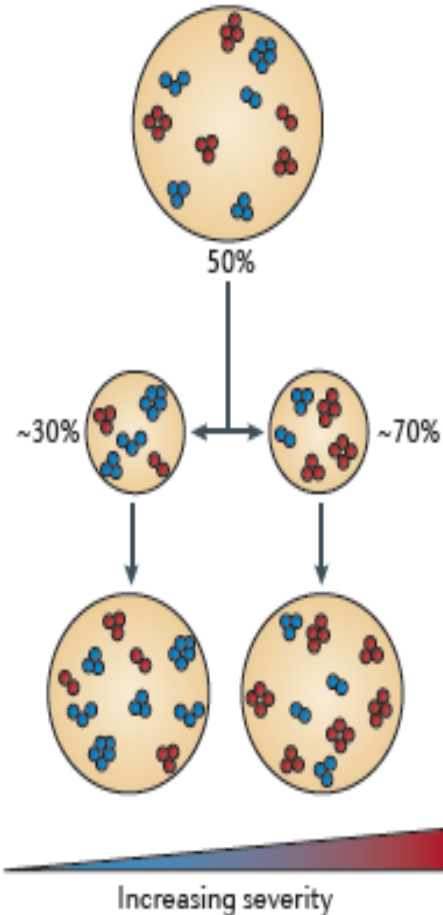
- Heteroplazmi düzeyinin germline transmisyonu sırasında önemli derecede değişebildiği 30 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir.
- Heteroplazmik polimorfik varyantlar taşıyan Holstein ineklerinde yapılan çalışma bir *de novo* heteroplazmik mutasyonun 2 veya 3 jenerasyon içinde homoplazmik hale gelebileceğini göstermiştir^{69,70}.
- Bu durum, anneden yavrularına bütün mitokondriyal genomlardan sadece küçük bir kısmının geçtiğini öne süren mitokondriyal genetik darboğaz hipotezini ortaya çıkarmıştır.

mtDNA genetik darboğaz hipotezi

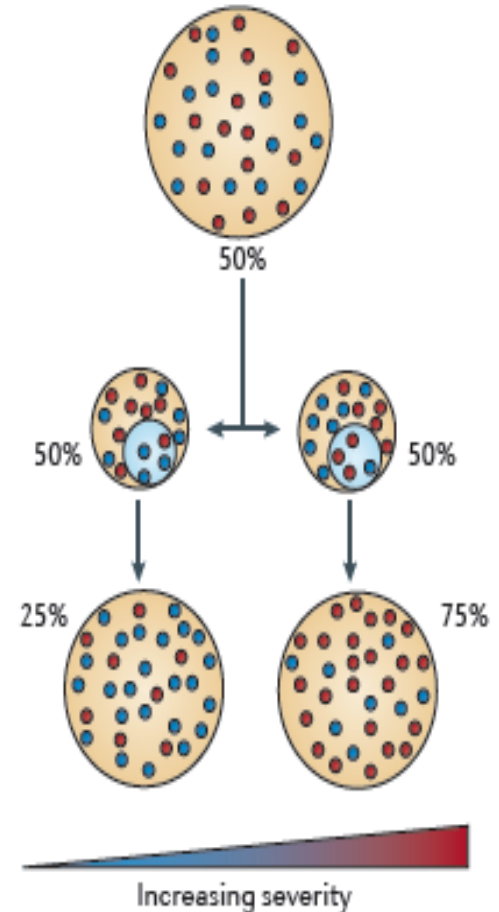
a Reduced copy number in early PGCs



b Unequal partitioning of homoplasmic segregating units within PGCs.



c Replication of a subgroup of genomes during oocyte maturation



• Wild-type mtDNA • Mutant mtDNA • Selected genomes for replication

Germline transmisyonu sırasında moleküler seleksiyon

- Dişı germline gelişiminde mutasyonun davranışı nötral segregasyonla uyumludur.
- Ancak, bu anneden doğan yavrular çok yüksek mutasyon düzeylerinin aleyhine güçlü bir sapma göstermektedir, bu da yüksek düzeylerde mutasyona sahip döllerin sınırlandırılması için bir post-fertilizasyon seleksiyon mekanizmasının varlığına işaret etmektedir⁸⁰

Germline transmisyonu sırasında moleküler seleksiyon

- Araştırmacılar, homoplazmik durumdaki sineklerde 29°C'de 4 günde ölümcül olan, mitokondriyal olarak kodlanan sitokrom c oksidaz 1 (mtco1) genindeki⁸⁸ sıcaklığa-hassas bir heteroplazmik mutasyonu kullandı.
- Heteroplazmik sinekler yüksek sıcaklıkta ölmedi⁸⁸ ancak sıcak maruziyetinin 3. gününde araştırmacılar, mutasyonun döllere transmisyonu aleyhinde güçlü bir sapma gözlemledi.
- Bu da moleküler seleksiyonun sineğin oosit gelişiminin geç germarium evresinde meydana geldiğini göstermektedir⁸⁹

Germline transmisyonu sırasında moleküler seleksiyon

- mtDNA mutasyonlarına karşı seleksiyonun, dişilerde in utero dönemde başlayıp menopoza kadar devam eden primer oositlerin (folliküleratrezi) katsal kaybıyla bağlantılı olabileceği öne sürölmüştür.
- Bu kadınların sınırlı reproduktif kapasitesi için bir açıklama sağlayabilmektedir ve bazı durumlarda da prematür ovarian yetmezliğe sebep olabilmektedir⁹³.

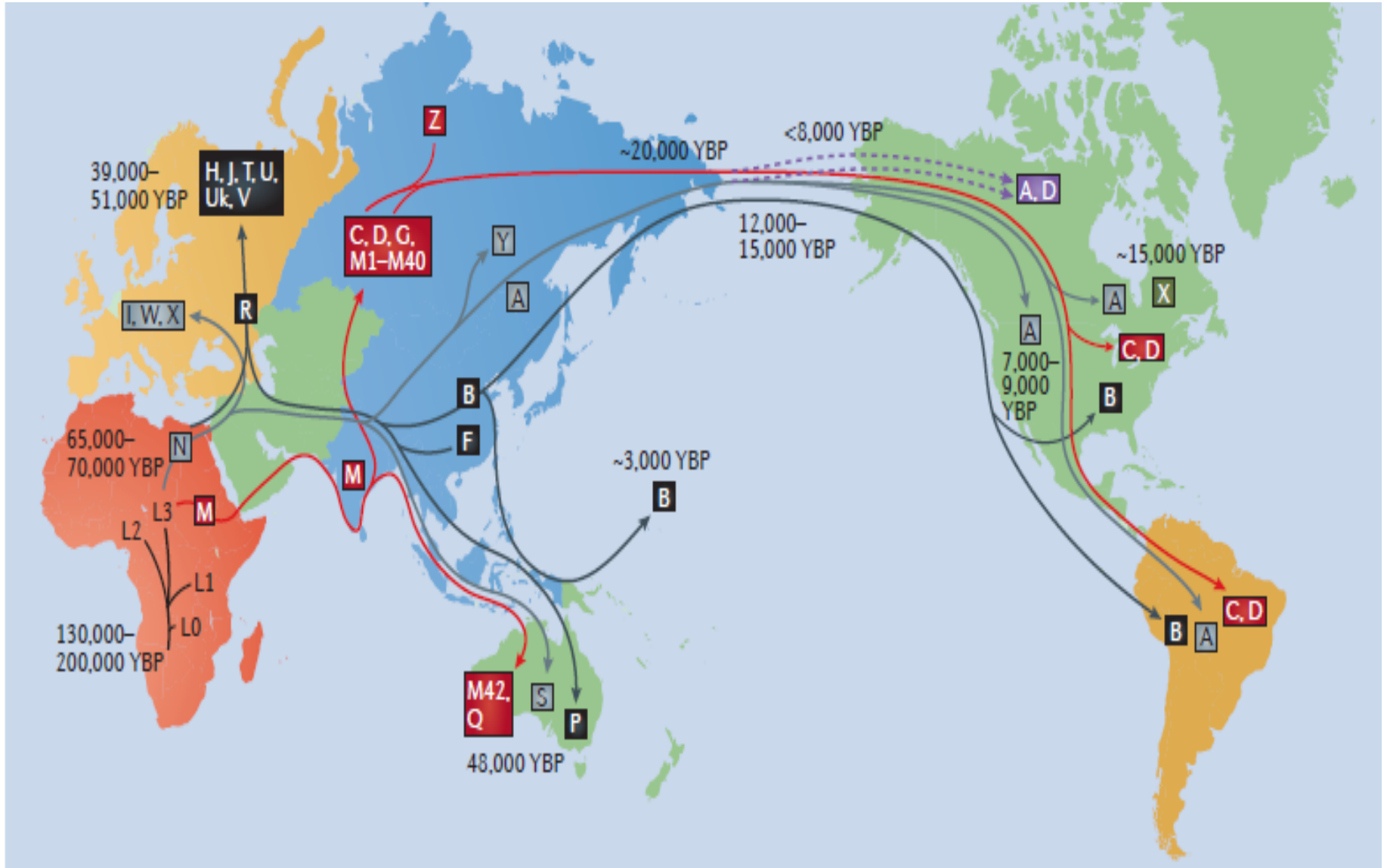
“Afrika’dan çıkış” hipotezi

- İnsan popülasyonunun ekspansiyonu ve migrasyonu ile farklı maternal nesillerde yeni mutasyonlar ortaya çıkmıştır (ve çıkmaya devam etmektedir).
- Bu mutasyonlar bir germ hücresinden ortaya çıkmış olup jenerasyonlar boyunca devam etmiş ve son olarak bir maternal soyda sabit hale (homoplazmik) gelmiştir.

“Afrika’dan çıkış” hipotezi

- mtDNA’ nın uniparental kalıtımı ve intermoleküler rekombinasyonun yokluğu bu varyantların spesifik etnik gruplara sınırlı olduğu anlamına gelmektedir ve popülasyon genetikçileri tarafından dünyanın göçü ve kolonizasyonunu tanımlamak için kullanılmıştır.
- Büyük-skallalı çalışmalar, insan mitokondrisinin dünyadaki akrabalık yayılımının yaklaşık 100.000 yıl önce Afrika kökeninden geldiğine dair geleneksel görüşü onaylamıştır.

“Afrika’dan çıkış” hipotezi



mtDNA polimorfizm hastalık ilişkisi

- Bazı çalışmalar sık görülen mtDNA varyantlarının akut sepsis sonrası hayatta kalma olasılığını arttırdığını göstermiştir^{104,105,}
- Enfeksiyon hastalıklarına maruziyetin hayatta kalma avantajı sağlayan belirli mtDNA varyantlarını seleksiyona uğratmış olma ihtimalini ortaya koymaktadır.
- Fakat bu varyantlar aynı zamanda geç-başlangıçlı dejeneratif hastalıkları predispoze etmektedir.

Sonuçlar

- Hem insan popülasyonu hem de tek-hücre düzeyinde geniş skalalı mtDNA veri-setlerinin oluşturulması, mtDNA mutasyonlarının kökenine, tespitine ve sonuçlarına ışık tutmayı sağlayabilir.
- Çok düşük-düzey mtDNA heteroplazmileri sağlıklı insanlarda bulunabilir.
- Heteroplazmik varyantların maternal soy boyunca geçişi, organizmayı veya popülasyonu etkileyebilecek potansiyel olarak zararlı mutasyonlara kaynak olabilmektedir.

Sonuçlar

- mtDNA darboğazı, germline gelişimi içinde heteroplazmik varyantların homoplazmik varyantlara hızlı segregasyonunu sağlamaktadır.
- Yüksek derecede zararlı mutasyonlar için bu hızlı segregasyon organeller, hücresel veya organizmal düzeyde germline'ı mutasyonlardan arındırmaktadır.

Sonuçlar

- mtDNA mutasyonları kısa dönemde akut hastalıklara karşı koruma sağlayabiliyor olsa da uzun dönemde bu mutasyonların artmış yükü hücresel disfonksiyon ve yaşlanma ilişkilidir.
- Son 20 yılda insan popülasyonu demografilerindeki kayma daha uzun yaşam beklentisini göstermektedir, bu durumda mtDNA'nın geç-başlangıçlı multifaktöriyel dejeneratif hastalıklar geliştirme riskine katkısı ise artma eğilimindedir.

Sonuçlar

- Yüksek çözünürlüklü canlı hücre görüntüleme çalışmaları, kritik noktalarda mtDNA segregasyon mekanizmalarını açığa kavuşturmak için kullanışlı olacaktır ve ultraderin mtDNA sekanslama ve transkriptomik uygulamalarıyla kombine edilmesi düşük frekanstaki varyantların spesifik hücre tiplerindeki etkilerini anlamak için gerekli olacaktır.