

ОБЗОР СВОЙСТВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

[Е. Н. Воропаева¹, В. Н. Максимов^{1,2}, С. К. Малютина^{1,2}, М. Bobak³, М. И. Воевода¹](#)

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины»
(г. Новосибирск)

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)

³University College (London)

Благодаря уникальным свойствам мтДНК ее анализ широко применяется в диагностике митохондриальных заболеваний и судебно-медицинской экспертизе, изучении эволюции человека и генеалогических исследованиях, поиске причин старения, онкологических и социально-значимых соматических заболеваний. Исследования митохондриального генома требуют определенных технических и концептуальных знаний. В данном обзоре обобщены сведения о свойствах, видах изменчивости, методах исследования и особенностях работы с мтДНК.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, методы исследования, виды изменчивости мтДНК.

Воропаева Елена Николаевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», рабочий телефон: 8 (383) 264-25-16, e-mail: vena.81@mail.ru

Максимов Владимир Николаевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», профессор кафедры медицинской генетики и биологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 264-25-16, e-mail: medik11@mail.ru

Малютина Софья Константиновна — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией клиники и этиопатогенеза ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», профессор кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: 8 (383) 264-25-16, e-mail: smalyutina@hotmail.com

Bobak Martin — доктор медицинских наук, профессор университетского колледжа Лондона University College London, рабочий телефон: +44 020 3108 3021, e-mail:

Воевода Михаил Иванович — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины», рабочий телефон: 8 (383) 264-25-16, e-mail: mvoevoda@ya.ru

Характеристика и свойства мтДНК. Митохондриальная ДНК (мтДНК) была открыта методом электронной микроскопии М. М. Nass в 1963 году [1]. Одним годом спустя G. Schatz и J. Klima получили биохимическое подтверждение ее существования [2]. Последовательность нуклеотидов митохондриального генома впервые была описана в 1981 году Anderson et al. [3]. В настоящее время во всем мире в работе с мтДНК пользуются референсной последовательностью «revised Cambridge Reference Sequence» (rCRS), подтвержденной Andrews et al. в 1999 году [4, 5].

В сравнении с ядерной ДНК, насчитывающей более 3 миллиардов п.н., мтДНК представлена около 17 тыс. п.н. и функционально делится на регуляторный, некодирующий и кодирующий регионы [5–7]. Кодирующий регион содержит информацию о последовательности 37-ми генов: 22-х т-РНК, 2-х р-РНК и 13-ти генах продукции внутриклеточной энергии [8, 9].

Некодирующий регион (D-петля) имеет два гипервариабельных региона (HV1 и HV2 по 342 и 268 п.н.) с большим числом нуклеотидных различий между индивидуумами. Он участвует в контроле экспрессии генов мтДНК, содержит основные промоторы транскрипции и регулирующие репликацию последовательности [8–10].

Структурно мтДНК характеризуется наличием тяжелых (богатых тугоплавкими дуплексами G + T) и легких последовательностей, а также плотной упаковкой с отсутствием интронов [10]. Другими особенностями мтДНК, о которых следует упомянуть, являются гаплоидность набора генетической информации, отличный от ядерного генетический код и слабые механизмы репарации ДНК [11, 12].

В сравнении с ядерной мтДНК более стабильна во времени, в том числе при неблагоприятных условиях хранения, поскольку:

- представляет собой кольцевую молекулу;
- исходно присутствует не в двойном наборе, а в десятках и даже сотнях копий;
- окружена двойной мембраной митохондрий [13].

По этим причинам материалом для исследования могут служить даже очень малые по размеру образцы, ткани с небольшим содержанием ДНК (волосы, кости, зубы) или значительно деградировавший материал [9]. Кроме того, мтДНК относится к линейным маркерам, которые передаются по женской линии из поколения в поколение без изменений (в том числе рекомбинации), за исключением мутационных событий [14, 15]. Считается, что биологический смысл однородительского наследования мтДНК заключается в ограничении передачи патогенных мутаций в пределах одной линии. Биродительское наследование способствовало бы большей скорости распространения их в популяции [16].

Благодаря своим уникальным свойствам мтДНК является удобным и информативным материалом для генетических исследований. В настоящее время анализ мтДНК применяется при диагностике митохондриальных заболеваний, работе с сильно

деградировавшими образцами, в идентификации личности, при изучении эволюции человека и генеалогических исследованиях [7, 8, 13, 17, 18]. Активно ведется поиск изменений мтДНК, ассоциированных с возрастом, онкологической патологией и социально-значимыми соматическими заболеваниями [5, 6, 8, 9, 12, 14, 15, 19].

Виды изменчивости мтДНК. Считается, что частота мутаций в мтДНК в десятки раз превосходит таковую в ядерной ДНК [9, 12, 14]. Описаны основные типы повреждения мтДНК: алкилирование, гидролитическое повреждение, формирование ДНК-аддуктов, нуклеотидные замены, разрывы нити ДНК и окислительное повреждение [20]. Их результатом являются как точечные мутации, так и перестройки и делеции генетического материала диапазоном от 2 до 10 Кб, которые могут захватывать любой ген митохондриального генома [6, 9, 19].

Существуют значительные отличия в спектре мутаций мтДНК, наблюдающихся в клетках с активными и неактивным процессами митотического деления. В первом случае наиболее распространенным типом мутаций мтДНК являются замены нуклеотидов, во втором — крупные делеции [21].

Показана четкая тенденция накопления точечных мутаций в мтДНК с возрастом [22]. В дополнение к этому известно, что спектр точечных мутаций отличается в различных тканях [5, 22].

В работах по изучению митохондриального генома могут применяться различные типы оценки делеций, а именно: качественные (наличие или отсутствие делеции в мтДНК) и количественные (процент молекул мтДНК с делецией на клетку, процент соотношения числа молекул мтДНК с делецией к общему количеству молекул мтДНК (процент $dmtDNA/total\ mtDNA$), процент соотношения числа молекул мтДНК с делецией к количеству молекул мтДНК без делеции (процент $dmtDNA/FLmtDNA$) и др.) [22]. Многолетние исследования показали четкую тенденцию накопления делеции мтДНК с возрастом [26-29], более выраженную в клетках тканей с большим потреблением кислорода, например, мышечной и нервной [22].

Отличительной особенностью всех мутаций в мтДНК является нахождение их в состоянии гетероплазмии. В норме в клетке может находиться от 2-х до 10-ти и более копий митохондриального генома [7]. Под гетероплазмией подразумевается наличие нормального и мутантного типов последовательности мтДНК в одной клетке [15]. Такое сосуществование позволяет выживать клеткам даже с летальными мутациями [10]. Мутации мтДНК могут передаваться и накапливаться в клетках из поколения в поколения [6, 9]. Установлено, что в условиях гетероплазмии возможно отсутствие клинических проявлений патогенных мутаций, пока доля мутантных копий мтДНК не достигнет определенного порогового значения на клетку [10, 12, 30].

Помимо точечных и структурных нарушений изменчивость митохондриального генома может характеризоваться изменением числа копий мтДНК в клетке. Результаты исследований, проведенных на сегодняшний день и посвященных анализу связи между фенотипом и числом копий мтДНК, более противоречивы, чем данные по мутациям и делециям мтДНК. Например, в одних работах показана тенденция к снижению содержания числа копий мтДНК с возрастом [22, 23], в других сообщается об увеличении их количества или отсутствии значительных изменений числа копий мтДНК в течение жизни [24, 25].

Методы исследования мтДНК. Ввиду общего прогресса в молекулярной биологии с момента открытия мтДНК методы ее исследования претерпели значительное развитие

[17].

Исторически первым в работе с митохондриальным геномом для генотипирования ОНП мтДНК использовалась ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). В последующем этот метод стал применяться для поиска кандидатных мутаций митохондриального генома, приводящих к потере или появлению сайта рестрикции эндонуклеазы. В настоящее время спектр применяемых в работе с мтДНК эндонуклеаз рестрикции достаточно широк [9]. Преимущества данного подхода заключаются в низкой стоимости анализа, относительной простоте реализации, высокой чувствительности качественного анализа наличия гетероплазмии. Однако использование метода ПДРФ ограничено обнаружением изменений в сайтах рестрикции, большими временными затратами и невозможностью количественной оценки гетероплазмии мтДНК [12].

Все существующие в настоящее время подходы к детекции аллельных вариантов мтДНК могут быть условно разделены на несколько групп [12]:

1. Методы с применением энзимов:

- метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (restriction fragment length polymorphism — RFLP);
- метод полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (amplified fragment length polymorphism — AFLP);
- метод полиморфизма длин фрагментов расщепления (cleavage fragment length polymorphism — CFLP);
- ферментативная детекция мутации с использованием бактериофага (enzymatic mutation detection using the bacteriophage resolvase — EMD);
- анализ на основе лигазной реакции;
- метод инвазивного расщепления нуклеотида (invasive oligonucleotide cleavage — Invader);
- метод случайной амплификации полиморфной ДНК (random amplification of polymorphic DNA — RAPD);
- ПЦР с прямой терминацией (PCR with direct termination — DT-PCR);
- аллель-специфичная ПЦР (allele-specific PCR — AS-PCR).

2. Химические методы:

- метод химического расщепления гетеродуплекса (chemical cleavage of heteroduplexes);
- метод химического лигирования.

3. Методы, основанные на различной электрофоретической подвижности вариантов ДНК:

- анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК (single-stranded conformation polymorphism — SSCP);
- анализ гетеродуплексов;
- секвенирование ДНК.

4. Методы обнаружения в твердой фазе:

- гибридизация олигонуклеотидных массивов на микрочипах;
- волоконно-оптический анализ гибридизации ДНК;
- минисеквенирование;
- пиросеквенирование.

5. Хроматографические методы:

- денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (denaturing HPLC).
- Физические методы:
- масс-спектрометрия;
- резонансное тушение флуоресценции с помощью передачи энергии резонанса

флуоресценции (FRET).

Хотя большинство из этих подходов представляют собой стандартные инструменты молекулярной биологии, наличие явления гетероплазмии в мтДНК затрудняет как обнаружение, так и точное определение размера мутировавших фракций [31]. Для выявления и оценки уровня гетероплазмии мтДНК могут быть использованы различные методы секвенирования ДНК, высокоэффективная жидкостная хроматография, методы HRM (high resolution melt profiling) и TTGE (temporal temperature gradient gel electrophoresis), метод ARMS (amplification refractory mutation system), методы с применением эндонуклеаз и др. [12]. Подходы к исследованию и оценке уровня гетероплазмии мтДНК подробно освещены в обзоре Moraes et al. [9].

Выбор оптимального подхода требует учета преимуществ и недостатков методов. Работа Sobenin et al. содержит описание методов оценки гетероплазмии мтДНК в сравнительном аспекте [12].

При выборе метода изучения мтДНК, как правило, опираются на то, какую конкретно задачу требуется решить. Так, в случае поиска известной мутации (например, ранее идентифицированной у одного из членов исследуемой семьи или описанной ранее кандидатной для изучаемой патологии и популяции мутаций) могут применяться вариации метода ПЦР [9]. Для скрининга неизвестных мутаций в мтДНК с конца 1990-х годов применялись метод электрофореза в градиентном денатурирующем геле (DGGE) или метод полиморфизма конформации однонитчатой цепочки ДНК (SSCP) [32, 33]. С начала 2000-х годов в связи с развитием и удешевлением методов секвенирования, а также относительно небольшим размером молекулы мтДНК, стал выполняться анализ последовательности митохондриального генома в полном объеме [34, 35].

Долгое время, несмотря на низкую пропускную способность и высокую стоимость исследований, секвенирование по Сэнгеру было «золотым стандартом» изучения последовательности мтДНК [13]. В идентификации личности, при изучении эволюции человека и генеалогических исследованиях применяется секвенирование двух гипервариабельных регионов мтДНК. Оба региона содержат полицитозиновые тракты, секвенирование которых очень затруднено вследствие проскальзывания полимеразы по нити ДНК [5, 8]. Перед секвенированием может проводиться скринирующее генотипирование с использованием специфичных олигопроб, минисеквенированием, применением ПДРФ анализа и т. д. В судебно-медицинской экспертизе человека секвенирование всей мтДНК является более эффективным методом, чем секвенирование только HV1 и HV2 регионов [5].

Помимо малой применимости прямого секвенирования по Сэнгеру для крупномасштабных исследований, при работе с митохондриальным геномом метод имеет еще один существенный недостаток — это низкая чувствительность для обнаружения доли минорного аллеля (около 10 %) [15]. В реальной лабораторной практике ввиду различного качества выполнения методики нижняя граница обнаружения уровня гетероплазмии мтДНК методом секвенирования по Сэнгеру находится в диапазоне 30–50 % мутантных копий [17].

Секвенирование нового поколения (NGS), благодаря высокой чувствительности и разрешающей способности, открыло новые возможности в изучении митохондриального генома [16]. В обзоре С. Pareek et al. (2011) подробно описаны возможности и особенности технологий NGS различных поколений, возможности их практического приложения, достижения и перспективы в изучении генома человека [36].

Использование технологии NGS позволило идентифицировать все известные и потенциально новые мутации в мтДНК [37]. Современное состояние знаний о патогенности выявленных в митохондриальном геноме мутаций таково. В существующих в настоящее время информационных базах данных описано более чем 5000 вариантов мтДНК, ассоциированных с фенотипом различных заболеваний. Вместе с тем, для подавляющего большинства из них причинную роль их в возникновении этих заболеваний не доказана [38].

В последние десятилетия появилось большое количество баз данных и web-сервисов, сфокусированных на анализе данных строения мтДНК в норме и при патологии: MITOMAP [39], MitoLSDB [40], MitoBreak [41], HmtDB [42], mitoDB [43], mtDNAprofiler [44], HAPLOFIND [45] и др. Обзор Rajput N. посвящен описанию части ресурсов, накапливающих данные о роли генома в формировании митохондриальной патологии [38].

В случае верификации новой мутации в мтДНК важно точно установить степень ее причастности к формированию изучаемого фенотипа путем оценки ряда критериев:

- уровень гетероплазмии;
- корреляция характера мутации с конкретным фенотипом;
- присутствие мутации у больных и отсутствие у здоровых членов семьи (уровень гетероплазмии у сиблингов может варьировать);
- дополнительные биохимические, гистологические, цитохимические или иммуноцитохимические подтверждения митохондриального дефекта;
- подтверждение патогенности мутации экспериментальными данными;
- сравнение последовательностей мтДНК опухолевой и здоровых тканей для исключения ОНП [5, 12, 17, 19, 31, 46].

Другим фактором, который необходимо учитывать при интерпретации результатов секвенирования мтДНК, является наличие ядерных митохондриальных псевдогенов, которые могут быть источником получения ошибочных данных [5].

Для обнаружения структурных перестроек и делеции крупных участков мтДНК наиболее часто используются методы секвенирования, лонг-ПЦР и Саузерн-блот анализа.

Саузерн-блот анализ ввиду большей сложности в сравнении с методами на основе ПЦР, несмотря на техническую возможность, не применяется для поиска точечных мутаций в последовательности мтДНК [9].

Для выполнения анализа после выделения тотальной ДНК матрица обрабатывается рестриктазами PvuII, BamHI, PstI, или SnaBI, имеющими уникальные сайты рестрикции в различных регионах митохондриального генома. В последующем фрагменты разгоняются методом электрофореза в 0,7-0,8 % агарозном геле, и выполняется стандартный Саузерн-блот анализ [9].

В последние годы для выявления делеций в мтДНК все более часто применяются методы лонг-ПЦР (long amplicon PCR — LA-PCR или long extension PCR — LX-PCR), которые позволяют нарабатывать фрагменты 10-15 Кб и более [47, 48]. Ее принцип основан на том, что в случае делеции любой протяженности область D-петли всегда сохраняется в молекуле мтДНК. С помощью праймеров, специфичных для данного региона, производится наработка всего митохондриального генома. Чем короче молекула мтДНК в материале, тем большее преимущество амплификации она будет иметь над полноразмерным вариантом мтДНК. Это позволяет идентифицировать наличие

и примерную протяженность делеции. Для уточнения локализации делеции может производиться ПДРФ анализ или секвенирование небольших фрагментов [9].

Определения числа копий мтДНК в клетке производится относительно ядерного генома. Измерение относительного числа копий мтДНК рассчитывается по отношению уровня величин флуоресценции продукта ПЦР гена мтДНК к таковой ядерного гена (например, GAPDH или β -актина), полученных методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Метод имеет ряд преимуществ: является прямым, быстрым, относительно дешевым методом изучения мтДНК, требует очень небольшое количество матрицы (5-10 нг). Специфичность реакции определяется выбором праймеров и легко адаптируется под конкретные цели, имеет хорошую воспроизводимость [49]. Кроме того, он дает возможность мониторинга уровня гетероплазмии мутации [49], а в случае необходимости экономии мтДНК может применяться мультиплексирование с использованием большого числа пар праймеров в одной пробирке [13].

Для того чтобы результаты ПЦР-РВ было легче интерпретировать, а полученные данные были более надежными, для всех исследуемых образцов входные количества мтДНК должны быть одинаковыми. По этой причине после измерения концентрации ДНК все пробы разводят до равной целевой концентрации [49].

Ранее упоминалось о противоречивости результатов исследований, посвященных анализу связи между фенотипом и числом копий мтДНК. Возможным объяснением отсутствия консенсуса между этими исследованиями могут быть различные методологические подходы [22]. Поскольку в митохондриальном геноме присутствуют участки, подверженные делециям, большое значение при оценке числа копий мтДНК методом РВ-ПЦР имеет область связывания праймеров [6, 9, 19, 22]. Кроме того, считается, что число копий мтДНК может варьировать в ответ на разнообразные стрессы [50], а также меняться в различных тканях, на различных стадиях развития организма и т. д. [22].

Особенности работы с мтДНК. Важным фактором для успешного решения научных и практических задач, связанных с исследованием митохондриального генома, является правильный выбор ткани для экстракции мтДНК. Следует учитывать следующие факты. Точечные мутации и перестройки митохондриального генома возникают чаще, быстрее накапливаются и с большей вероятностью могут быть идентифицированы в быстро делящихся тканях [9]. Описаны ситуации наличия мутации, ограниченной пределами одной ткани, а также различный уровень гетероплазмии (мозаичность) между тканями одного человека, что может привести к развитию фокальной патологии в отдельных органах и тканях [12, 15, 51].

При выборе способа хранения материала и экстракции мтДНК следует учитывать требования к матрице при различных методах генетического анализа. В большинстве случаев для получения мтДНК ткань, из которой будут изолировать нуклеиновые кислоты, может храниться замороженной до процедуры выделения при широком диапазоне температур (от -20 до -80 °C). Применим любой из известных методов выделения ДНК: с использованием микроколонок, высаливанием или фенол-хлороформной экстракции [52]. Однако при Саузерн-блот анализе и лонг-ПЦР предъявляются высокие требования к молекулярной массе и качеству матрицы, что требует хранения образцов до и после этапа экстракции при температуре не выше -80 °C и выделения ДНК наиболее щадящими методами фенольно-хлороформной экстракции с применением протеиназы К или высаливанием [9, 49, 52].

В случае необходимости перед экстракцией ДНК проводится выделение митохондрий, что

сводит к минимуму загрязнение мтДНК генетическим материалом ядерного происхождения. Подробные обзоры и описания методов изоляции митохондрий из широкого спектра тканей (печени, почек, семенников, головного мозга, скелетных мышц и культивируемых клеток) представлены в работах S. Maynard et al. и F. Pallotti et al. [53, 54].

Использование мягких тканей без предварительной изоляции митохондрий в качестве источника нуклеиновых кислот требует этапа гомогенизации образца [55], а при работе с сухими и плотными тканями может потребоваться измельчение материала в жидком азоте [49].

По причинам большей копияности и стабильности во времени и неблагоприятных условиях хранения материала при выделении нуклеиновых кислот всегда будет получен больший выход мтДНК в сравнении с ДНК ядерного происхождения [13].

Измерение концентрации выделенной мтДНК чаще всего проводится ПЦР-РВ. В некоторых лабораториях измеряют количество ядерной ДНК и по специальной формуле устанавливают ожидаемое количество мтДНК [49].

Следует отметить следующий немаловажный методологический аспект при работе с мтДНК. Известна высокая степень летучести ее фрагментов в случае работы с сильно деградировавшими образцами, а также наработанных в ходе ПЦР мелких ампликонов. По этой причине в работе с мтДНК особое значение принимает чистота работы персонала и мероприятия по профилактике и борьбе с контаминацией [13].

Протоколы ПЦР на основе мтДНК имеют свои особенности. Они предусматривают использование 35-40 и более циклов и добавление большего количества Taq-полимеразы. В работе с сильно деградировавшей мтДНК применяют минипраймеры. Помимо отрицательного контроля (ПЦР смесь без добавления матрицы ДНК) необходимого для подтверждения отсутствия контаминации используется положительный контроль (ПЦР смесь с мт-ДНК известной концентрации) для подтверждения работы системы, а также контроль качества экстракции ДНК.

Исследования митохондриального генома в аспектах изучения античной ДНК или роли мтДНК в процессах онкогенеза требуют дополнительных технических и концептуальных знаний, обобщенных в соответствующих обзорах E. Rizzi et al. и A. Czarnecka et al. [13, 46].

Финансовая поддержка: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-45-00030).

Список литературы

1. Nass M. M. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. fixation and electron staining reactions / M. M. Nass, S. Nass // J. Cell. Biol. — 1963. — N 19. — P. 593-611.
2. Schatz G. Triphosphopyridine nucleotide : cytochrome C reductase of Saccharomyces Cerevisiae 'microsomal enzyme / G. Schatz, J. Klima // Biochimica et Biophysica Acta. — 1964. — Vol. 81, N 3. — P. 448-461.
3. Sequence and organization of the human mitochondrial genome / S. Anderson [et al.] // Nature. — 1981. — Vol. 290, N 5806. — P. 457-465.
4. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA / R. M. Andrews [et al.] // Nat. Genet. — 1999. — Vol. 23, N 2. — P. 147.
5. Mitochondria and Cancer: Past, Present, and Future / M. L. Verschoor [et al.] // BioMed Research International. — 2013. — Article ID 612369.
6. Heinz D. Mitochondrial Quality Control : Impact on Aging and Life Span — A Mini-Review /

- D. Heinz, O. D. Bernhardt // *Gerontology*. — 2013. — N 59. — P. 413-420.
7. Wong L. J. C. Challenges of bringing next generation sequencing technologies to clinical molecular diagnostic laboratories / L. J. C. Wong // *Neurotherapeutics*. — 2013. — N 10. — P. 262-272.
 8. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders : Exome sequencing for disease gene identification / A. Ohtake [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2014. — N 1840. — P. 1355-1359.
 9. Techniques and pitfalls in the detection of pathogenic mitochondrial DNA mutations / C. T. Moraes [et al.] // *J. Mol. Diagn.* — 2003. — N 5. — P. 197-208.
 10. Taanman J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication / J. W. Taanman // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1999. — N 1410. — P. 103-123.
 11. Bogenhagen D. F. Repair of mtDNA in Vertebrates / D. F. Bogenhagen // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — N 64. — P. 1276-1281.
 12. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome : perspectives in diagnostics and methodological pitfalls / I. A. Sobenin [et al.] // *BioMed Research International*. — 2014. — Article ID 292017.
 13. Ancient DNA studies : new perspectives on old samples / E. Rizzi [et al.] // *Genetics Selection Evolution*. — 2012. — N 44. — P. 21.
 14. Mitochondrial bioenergetics in aging / G. Lenaz [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2000. — N 1459. — P. 397-404.
 15. Segregation of point mutation heteroplasmy in the control region of dog mtDNA studied systematically in deep generation pedigrees / C. F. Klütsch [et al.] // *Int. J. Legal. Med.* — 2011. — Vol. 125, N 4. — P. 527-535.
 16. Zouros E. The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae / E. Zouros // *Genes Genet. Syst.* — 2000. — N 75. — P. 313-318.
 17. McCormick E. Molecular genetic testing for mitochondrial disease : from one generation to the next / E. McCormick, E. Place, M. J. Falk // *Neurotherapeutics*. — 2013. — Vol. 10, N 2. — P. 251-61.
 18. Nesheva D. V. Aspects of ancient mitochondrial DNA analysis in different populations for understanding human evolution / D. V. Nesheva // *BJMG*. — 2014. — Vol. 17, N 1. — P. 5-14.
 19. Pereira L. Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncocytic phenotype : pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors / L. Pereira [et al.] // *BMC Cancer*. — 2012. — N 12. — P. 53.
 20. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity-Critical Analysis and Update / M. Alexeyev [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* — 2013. — N 5. — a012641.
 21. Shokolenko I. N. Aging : A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update / I. N. Shokolenko, G. L. Wilson, M. F. Alexeyev // *World J. Exp. Med.* — 2014. — Vol. 4, N 4. — P. 46-57.
 22. Mitochondrial DNA damage patterns and aging: revising the evidences for humans and mice / N. Kazachkova [et al.] // *Aging and disease*. — 2013. — Vol. 4, N 6. — P. 337-350.
 23. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans / K. R. Short [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2005. — N 102. — P. 5618-5623.
 24. Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart / T. Frahm [et al.] // *Mechanisms of ageing and development*. — 2005. — N 126. — P. 1192-1200.

25. Mitochondrial DNA deletions and the aging heart / S. A. Mohamed [et al.] // *Experimental gerontology*. — 2006. — N 41. — P. 508-517.
26. Zhang Y. F. Age-dependent mitochondrial DNA 4977bp depletion in human skeletal muscle / Y. F. Zhang // *Fa yi xue za zhi*. — 2007. — N 23. — P. 438-440.
27. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion is a common phenomenon in hair and increases with age. *Bosnian journal of basic medical sciences* / Y. Zheng [et al.] // *Udruzenje basicnih medicinskih znanosti* = Association of Basic Medical Sciences. — 2012. — N 12. — P. 187-192.
28. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers / E. Bua [et al.] // *American journal of human genetics*. — 2006. — N 79. — P. 469-480.
29. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease / A. Bender [et al.] // *Nature genetics*. — 2006. — N 38. — P. 515-517.
30. DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations in human disease / S. DiMauro, E. A. Schon // *Am. J. Med. Genet.* — 2001. — N 106. — P. 18-26.
31. Khaidakov M. Possibility of selection against mtDNA mutations in tumors / M. Khaidakov, R. J. Shmookler Reis // *Molecular Cancer*. — 2005. — N 4. — P. 36.
32. Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders / D. Sternberg [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1998. — Vol. 7, N 1. — P. 33-42.
33. Rapid and enhanced detection of mitochondrial DNA variation using single-strand conformation analysis of superposed restriction enzyme fragments from polymerase chain reaction-amplified products / F. Barros [et al.] // *Electrophoresis*. — 1997. — N 18. — P. 52-54.
34. Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations / L. J. Wong [et al.] // *Clin. Chem.* — 2002. — N 48. — P. 1901-1912.
35. Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with Leber's hereditary optic neuropathy lacking the three most common pathogenic DNA mutations / S. Fauser [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — N 295. — P. 342-347.
36. Pareek C. S. Sequencing technologies and genome sequencing / C. S. Pareek, R. Smoczynski, A. Tretyn // *J. Appl. Genetics*. — 2011. — N 52. — P. 413-435.
37. Yang Y. Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science / Y. Yang, B. Xie, J. Yan // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. — 2014. — Vol. 12, N 5. — P. 190-197.
38. Rajput N. K. Resources, challenges and way forward in rare mitochondrial diseases research / N. K. Rajput, V. Singh, A. Bhardwaj // *F1000Res*. — 2015. — N 4. — P. 70.
39. Kogelnik A. M. MITOMAP : a human mitochondrial genome database / A. M. Kogelnik, M. T. Lott, M. D. Brown // *Nucleic Acids Res.* — 1996. — Vol. 24, N 1. — P. 177-179.
40. Shamnamole K. MitoLSDB : a comprehensive resource to study genotype to phenotype correlations in human mitochondrial DNA variations / K. Shamnamole, S. Jalali, V. Scaria // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8, N 4. — e60066.
41. Damas J. MitoBreak : the mitochondrial DNA breakpoints database / J. Damas, J. Carneiro, A. Amorim // *Nucleic Acids Res.* — 2014. — N 42. — D1261-8.
42. Rubino F. HmtDB, a genomic resource for mitochondrion-based human variability studies / F. Rubino, R. Piredda, F. M. Calabrese // *Nucleic Acids Res.* — 2012. — N 40. — D1150-9.
43. Scheibye-Knudsen M. A novel diagnostic tool reveals mitochondrial pathology in human diseases and aging / M. Scheibye-Knudsen, K. Scheibye-Alsing, C. Canugovi // *Aging*. — 2013. — Vol. 5, N 3. — P. 192-208.
44. mtDNAprofiler : a Web application for the nomenclature and comparison of human

- mitochondrial DNA sequences / I. S. Yang [et al.] // J. Forensic. Sci. — 2013. — Vol. 58, N 4. — P. 972-80.
45. HAPLOFIND : a new method for high-throughput mtDNA haplogroup assignment / D. Vianello [et al.] // Hum. Mutat. — 2013. — Vol. 34, N 9. — P. 1189-94.
 46. Molecular oncology focus — Is carcinogenesis a 'mitochondriopathy'? / A. M. Czarnecka [et al.] // Journal of Biomedical Science. — 2012. — N 17. — P. 31.
 47. Tengan C. H. Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR / C. H. Tengan, C. T. Moraes // Biochem. Mol. Med. — 1996. — N 58. — P. 130-134.
 48. Efficient and specific amplification of identified partial duplications of human mitochondrial DNA by long PCR / B. Fromenty [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. — 1996. — N 1308. — P. 222-230.
 49. Meyer J. N. QPCR : a tool for analysis of mitochondrial and nuclear DNA damage in ecotoxicology / J. N. Meyer // Ecotoxicology. — 2010. — N 19. — P. 804-811.
 50. Lee H. C. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress / H. C. Lee, Y. H. Wei // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2005. — N 37. — P. 822-834.
 51. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA / A. L. Andreu [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1999. — N 341. — P. 1037-1044.
 52. Telomere length measurement and comparison in skeletal muscle, adipose tissue, skin and leukocytes : methodological aspects and preliminary results / S. Toupance [et al.] // Arch. Cardiovasc. Dis. — 2014. — Suppl. 6. — P. 18-19.
 53. Mitochondrial base excision repair assays / S. Maynard [et al.] // Methods. — 2010. — Vol. 51, N 4. — P. 416-425.
 54. Pallotti F. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines / F. Pallotti, G. Lenaz // Methods Cell Biol. — 2007. — N 80. — P. 3-44.
 55. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells / J. H. Santos [et al.] // Methods Mol. Biol. — 2006. — N 314. — P. 183-99.

REVIEW ON PROPERTIES AND METHODS OF MITOCHONDRIAL DNA RESEARCH

[*E. N. Voropayeva¹, V. N. Maximov^{1,2}, S. K. Malyutina^{1,2}, M. Bobak³, M. I. Voyevoda¹*](#)

¹FSBSE «Research Institute of Therapy and Preventive Medicine» SB RAMS (Novosibirsk)

²FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health of Russia» (Novosibirsk)

³University College (London)

Owing to unique properties mtDNA its analysis is widely applied in diagnostics of mitochondrial diseases and forensic medical examination, studying of evolution of the person and genealogical researches, search of the reasons of aging, oncologic and socially important somatopathies. Researches of mitochondrial genome demand certain technical and conceptual knowledge. Data on properties, types of variability, methods of research and features of work with mtDNA are generalized in this review.

Keywords: mitochondrial DNA, research methods, types of mtDNA variability.

About authors:

Voropayeva Elena Nikolaevna — candidate of medical science, research associate of laboratory of molecular and genetic researches of therapeutic diseases at FSBSE «Research Institute of Therapy and Preventive Medicine» SB RAMS, office phone: 8 (383) 264-25-16, e-mail: vena.81@mail.ru

Maksimov Vladimir Nikolaevich — doctor of medical sciences, head of laboratory of molecular and genetic researches of therapeutic diseases at FSBSE «Research Institute of Therapy and Preventive Medicine» SB RAMS, professor of medical genetics and biology chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health of Russia», office phone: 8 (383) 264-25-16, e-mail: medik11@mail.ru

Malyutina Sofya Konstantinovna — doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of etiopathogenesis and clinic at FSBSE «Research Institute of Therapy and Preventive Medicine» SB RAMS, professor of therapy, hematology and transfusiology chair at FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health of Russia», office phone: 8 (383) 264-25-16, e-mail: smalyutina@hotmail.com

Bobak Martin — doctor of medical science, professor of University College London, office phone: +44 020 3108 3021, e-mail: m.bobak@ucl.ac.uk

Voevoda Michael Ivanovich — doctor of medical science, professor, correspondence member of the RAMS, director at FSBSE «Research Institute of Therapy and Preventive Medicine» SB RAMS, office phone: 8 (383) 264-25-16, e-mail: mvoevoda@ya.ru

List of the Literature:

1. Nass M. M. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. fixation and electron staining reactions / M. M. Nass, S. Nass // J. Cell. Biol. — 1963. — N 19. — P. 593-611.

2. Schatz G. Triphosphopyridine nucleotide : cytochrome C reductase of *Saccharomyces Cerevisiae* 'microsomal enzyme / G. Schatz, J. Klima // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1964. — Vol. 81, N 3. — P. 448-461.
3. Sequence and organization of the human mitochondrial genome / S. Anderson [et al.] // *Nature*. — 1981. — Vol. 290, N 5806. — P. 457-465.
4. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA / R. M. Andrews [et al.] // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 23, N 2. — P. 147.
5. Mitochondria and Cancer: Past, Present, and Future / M. L. Verschoor [et al.] // *BioMed Research International*. — 2013. — Article ID 612369.
6. Heinz D. Mitochondrial Quality Control : Impact on Aging and Life Span — A Mini-Review / D. Heinz, O. D. Bernhardt // *Gerontology*. — 2013. — N 59. — P. 413-420.
7. Wong L. J. C. Challenges of bringing next generation sequencing technologies to clinical molecular diagnostic laboratories / L. J. C. Wong // *Neurotherapeutics*. — 2013. — N 10. — P. 262-272.
8. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders : Exome sequencing for disease gene identification / A. Ohtake [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2014. — N 1840. — P. 1355-1359.
9. Techniques and pitfalls in the detection of pathogenic mitochondrial DNA mutations / C. T. Moraes [et al.] // *J. Mol. Diagn.* — 2003. — N 5. — P. 197-208.
10. Taanman J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication / J. W. Taanman // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1999. — N 1410. — P. 103-123.
11. Bogenhagen D. F. Repair of mtDNA in Vertebrates / D. F. Bogenhagen // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — N 64. — P. 1276-1281.
12. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome : perspectives in diagnostics and methodological pitfalls / I. A. Sobenin [et al.] // *BioMed Research International*. — 2014. — Article ID 292017.
13. Ancient DNA studies : new perspectives on old samples / E. Rizzi [et al.] // *Genetics Selection Evolution*. — 2012. — N 44. — P. 21.
14. Mitochondrial bioenergetics in aging / G. Lenaz [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2000. — N 1459. — P. 397-404.
15. Segregation of point mutation heteroplasmy in the control region of dog mtDNA studied systematically in deep generation pedigrees / C. F. Klütsch [et al.] // *Int. J. Legal. Med.* — 2011. — Vol. 125, N 4. — P. 527-535.
16. Zouros E. The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae / E. Zouros // *Genes Genet. Syst.* — 2000. — N 75. — P. 313-318.
17. McCormick E. Molecular genetic testing for mitochondrial disease : from one generation to the next / E. McCormick, E. Place, M. J. Falk // *Neurotherapeutics*. — 2013. — Vol. 10, N 2. — P. 251-61.
18. Nesheva D. V. Aspects of ancient mitochondrial DNA analysis in different populations for understanding human evolution / D. V. Nesheva // *BJMG*. — 2014. — Vol. 17, N 1. — P. 5-14.
19. Pereira L. Somatic mitochondrial DNA mutations in cancer escape purifying selection and high pathogenicity mutations lead to the oncocyctic phenotype : pathogenicity analysis of reported somatic mtDNA mutations in tumors / L. Pereira [et al.] // *BMC Cancer*. — 2012. — N 12. — P. 53.
20. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity-Critical Analysis and Update / M. Alexeyev [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* — 2013. — N 5. — a012641.
21. Shokolenko I. N. Aging : A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update /

- I. N. Shokolenko, G. L. Wilson, M. F. Alexeyev // *World J. Exp. Med.* — 2014. — Vol. 4, N 4. — P. 46-57.
22. Mitochondrial DNA damage patterns and aging: revising the evidences for humans and mice / N. Kazachkova [et al.] // *Aging and disease.* — 2013. — Vol. 4, N 6. — P. 337-350.
 23. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans / K. R. Short [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 2005. — N 102. — P. 5618-5623.
 24. Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart / T. Frahm [et al.] // *Mechanisms of ageing and development.* — 2005. — N 126. — P. 1192-1200.
 25. Mitochondrial DNA deletions and the aging heart / S. A. Mohamed [et al.] // *Experimental gerontology.* — 2006. — N 41. — P. 508-517.
 26. Zhang Y. F. Age-dependent mitochondrial DNA 4977bp depletion in human skeletal muscle / Y. F. Zhang // *Fa yi xue za zhi.* — 2007. — N 23. — P. 438-440.
 27. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion is a common phenomenon in hair and increases with age. Bosnian journal of basic medical sciences / Y. Zheng [et al.] // *Udruzenje basicnih mediciniskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences.* — 2012. — N 12. — P. 187-192.
 28. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers / E. Bua [et al.] // *American journal of human genetics.* — 2006. — N 79. — P. 469-480.
 29. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease / A. Bender [et al.] // *Nature genetics.* — 2006. — N 38. — P. 515-517.
 30. DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations in human disease / S. DiMauro, E. A. Schon // *Am. J. Med. Genet.* — 2001. — N 106. — P. 18-26.
 31. Khaidakov M. Possibility of selection against mtDNA mutations in tumors / M. Khaidakov, R. J. Shmookler Reis // *Molecular Cancer.* — 2005. — N 4. — P. 36.
 32. Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders / D. Sternberg [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1998. — Vol. 7, N 1. — P. 33-42.
 33. Rapid and enhanced detection of mitochondrial DNA variation using single-strand conformation analysis of superposed restriction enzyme fragments from polymerase chain reaction-amplified products / F. Barros [et al.] // *Electrophoresis.* — 1997. — N 18. — P. 52-54.
 34. Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations / L. J. Wong [et al.] // *Clin. Chem.* — 2002. — N 48. — P. 1901-1912.
 35. Sequence analysis of the complete mitochondrial genome in patients with Leber's hereditary optic neuropathy lacking the three most common pathogenic DNA mutations / S. Fauser [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2002. — N 295. — P. 342-347.
 36. Pareek C. S. Sequencing technologies and genome sequencing / C. S. Pareek, R. Smoczynski, A. Tretyn // *J. Appl. Genetics.* — 2011. — N 52. — P. 413-435.
 37. Yang Y. Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science / Y. Yang, B. Xie, J. Yan // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* — 2014. — Vol. 12, N 5. — P. 190-197.
 38. Rajput N. K. Resources, challenges and way forward in rare mitochondrial diseases research / N. K. Rajput, V. Singh, A. Bhardwaj // *F1000Res.* — 2015. — N 4. — P. 70.
 39. Kogelnik A. M. MITOMAP : a human mitochondrial genome database / A. M. Kogelnik, M. T. Lott, M. D. Brown // *Nucleic Acids Res.* — 1996. — Vol. 24, N 1. — P. 177-179.
 40. Shamnamole K. MitoLSDB : a comprehensive resource to study genotype to phenotype

- correlations in human mitochondrial DNA variations / K. Shamnamole, S. Jalali, V. Scaria // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, N 4. — e60066.
41. Damas J. MitoBreak : the mitochondrial DNA breakpoints database / J. Damas, J. Carneiro, A. Amorim // Nucleic Acids Res. — 2014. — N 42. — D1261—8.
 42. Rubino F. HmtDB, a genomic resource for mitochondrion-based human variability studies / F. Rubino, R. Piredda, F. M. Calabrese // Nucleic Acids Res. — 2012. — N 40. — D1150—9.
 43. Scheibye-Knudsen M. A novel diagnostic tool reveals mitochondrial pathology in human diseases and aging / M. Scheibye-Knudsen, K. Scheibye-Alsing, C. Canugovi // Aging. — 2013. — Vol. 5, N 3. — P. 192-208.
 44. mtDNAprofiler : a Web application for the nomenclature and comparison of human mitochondrial DNA sequences / I. S. Yang [et al.] // J. Forensic. Sci. — 2013. — Vol. 58, N 4. — P. 972-80.
 45. HAPLOFIND : a new method for high-throughput mtDNA haplogroup assignment / D. Vianello [et al.] // Hum. Mutat. — 2013. — Vol. 34, N 9. — P. 1189-94.
 46. Molecular oncology focus — Is carcinogenesis a 'mitochondriopathy'? / A. M. Czarnecka [et al.] // Journal of Biomedical Science. — 2012. — N 17. — P. 31.
 47. Tengan C. H. Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR / C. H. Tengan, C. T. Moraes // Biochem. Mol. Med. — 1996. — N 58. — P. 130-134.
 48. Efficient and specific amplification of identified partial duplications of human mitochondrial DNA by long PCR / B. Fromenty [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. — 1996. — N 1308. — P. 222-230.
 49. Meyer J. N. QPCR : a tool for analysis of mitochondrial and nuclear DNA damage in ecotoxicology / J. N. Meyer // Ecotoxicology. — 2010. — N 19. — P. 804-811.
 50. Lee H. C. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress / H. C. Lee, Y. H. Wei // Int. J. Biochem. Cell. Biol. — 2005. — N 37. — P. 822-834.
 51. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA / A. L. Andreu [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1999. — N 341. — P. 1037-1044.
 52. Telomere length measurement and comparison in skeletal muscle, adipose tissue, skin and leukocytes : methodological aspects and preliminary results / S. Toupance [et al.] // Arch. Cardiovasc. Dis. — 2014. — Suppl. 6. — P. 18-19.
 53. Mitochondrial base excision repair assays / S. Maynard [et al.] // Methods. — 2010. — Vol. 51, N 4. — P. 416-425.
 54. Pallotti F. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines / F. Pallotti, G. Lenaz // Methods Cell Biol. — 2007. — N 80. — P. 3-44.
 55. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells / J. H. Santos [et al.] // Methods Mol. Biol. — 2006. — N 314. — P. 183-99.