

Kalle Keisu

MITOKONDRION VANHENEMISTEORI- AT: KATSAUS ENERGIAMETABOLIAN TASAPAINON TOIMINTAHÄIRIÖIHIN

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintutkielma
Huhtikuu 2023

TIIVISTELMÄ

Kalle Keisu: Mitokondrion vanhenemisteoriat: katsaus energiametabolian tasapainon toimintahäiriöihin
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan tutkinto-ohjelma
Huhtikuu 2023

Termi vanheneminen on hyvä erottaa ikääntymisestä. Vanheneminen tarkoittaa luonnollista fysiologisen toiminnallisuuden heikkenemistä ajan kuluessa, kun taas ikääntyminen viittaa vuosien kertymiseen. Toisin sanoen kaksi yksilöä, joiden kronologinen ikä on sama, voivat olla keskenään biologisesti eri ikäisiä esimerkiksi geneettisten, epigeneettisten sekä osin tuntemattomien tekijöiden toimesta. 12 biologista vanhenemistä ohjaavaa tunnusmerkkiä pyrkivät selittämään vanhenemisen solu- ja molekyyli-tason muutoksia. Tämän työn tavoitteena on syventyä yhteen niistä, mitokondrion toimintahäiriöihin, joista merkittävimpiä ovat energiametabolian homeostaasin muutokset.

Aluksi kirjallisuuskatsauksessa esitellään energiametabolian normaali toiminta sekä sen rappeutuminen, jota vanheneminen edistää. Energiametabolia kulminoituu oksidatiivisen fosforylaation eheään toimintaan, jonka tasapainon säätelystä vastaa entsyymien ja koentsyymien muodostama antioksidanttijärjestelmä. Energiametabolian rappeutumista käsitellään teorioiden näkökulmasta. Mitokondrion toimintahäiriöiden laukaisevan tekijän selvittäminen on kiinnostanut tutkijoita jo 1950-luvulta lähtien. Vapaiden radikaalien teoria vanhenemisessä perustuu olettamukseen, että elektroninsiirtoketjun tuottamat vapaat happiradikaalit (mtROS-molekyylit) vahingoittavat solun makromolekyyliä, kuten mitokondriaalista DNA:ta (mtDNA), ja siten kiihdyttää vanhenemistä oksidatiivisen stressin kautta. Ilmiötä selitetään noidankehäteoriolla, koska mtDNA koodaa elektroninsiirtoketjun kompleksien alayksiköitä. Sekvensointimenetelmien käyttöönotto on vaikuttanut mitokondrion toimintahäiriöiden teorioiden kehittymiseen. Sekvensointitulokset osoittavat, että mtROS-lajit eivät toimi mutageneesin laukaisevana tekijänä. Vastaavasti DNA-polymeraasi γ :n oikolukutoiminnon häiriöt puoltavat käsitystä, että pistemutaatioiden ja deleetioiden kertyminen mtDNA:ssa aiheuttaisi vanhenemisen fenotyyppien muutokset yksilössä. Päivitetty teoria ei kuitenkaan mitätöi mtROS-välitteisen vaurion osuutta vanhenemistä kiihdyttävänä tekijänä.

Teorioiden lisäksi, kirjallisuuskatsauksessa perehdytään molekyyli-tason mekanismeihin, jotka ylläpitävät solun homeostaasia. Näiden osatekijöiden tasot ovat myös kytköksissä vanhenemiseen. Antioksidanttientsyymit neutralisoivat tai muuntavat mtROS-lajeja. Lisäksi koentsyymit, kuten koentsyymi Q sekä merkittävin hapetus-pelkistys-tasapainoa ylläpitävä (NADPH)-linkittynyt antioksidanttijärjestelmä, suojelevat mitokondriota hapettavilta molekyyleiltä. Koentsyymi NAD:n vaikutus ilmenee yksittäin sekä sirtuiinien välityksellä. NAD⁺-riippuvaisilla entsyymeillä, kuten sirtuiineilla, on monipuolisia vaikutuksia soluun ja niitä jopa pidetään vanhenemisen avainentsyymeinä.

Tämä kirjallisuuskatsaus esittää ajankohtaisen tilan mitokondrion energiametabolian toimintahäiriöistä vanhenemisessä. On hyvä huomioida, että mitokondrion toimintahäiriöt ovat ainoastaan yksi ulottuvuus vanhenemisen biologiasta, eikä yksiselitteistä vastausta vanhenemisen biologiasta saada mitokondrioista. Tällä hetkellä mitokondrion replikaatiokoneiston toimintahäiriötä pidetään ensisijaisena tekijänä vanhenemiseen liittyvien mutaatioiden synnyssä. Mutaatiot voivat edesauttaa vanhenemiseen liittyvien sairauksien esiintyvyyttä ja etenemistä sekä suoraan vaikuttaa mutaatioiden kertymiseen, mikä heijastuu monipuolisella mitokondrion toimintahäiriöiden kirjolla. Havainto edesauttaa ymmärtämään monimutkaista vanhenemisen biologiaa.

Avainsanat: Vanhenemisen tunnusmerkit, mitokondrion toimintahäiriöt, energiametabolia, oksidatiivinen stressi ja antioksidanttijärjestelmä

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä kandidaatintutkielma on tehty bioteknologian ja biolääketieteen teknologian tutkinto-ohjelmassa Tampereen yliopistossa. Haluan kohdistaa suuret kiitokseni ohjaajalleni, Saara Marttilalle (Molekulaarisen Epidemiologian tutkimusryhmä), joka auttoi selventämään minulle haastavaa ja varsin moniulotteista vanhenemisen biologian teoriaa. Kiitos myös mielenkiintoisista keskusteluista vanhenemisen biologian saralla, mikä vahvisti jo kiitettävällä tasolla olevaa motivaatiotani aihetta kohtaan.

Tampereella, 13.04.2023

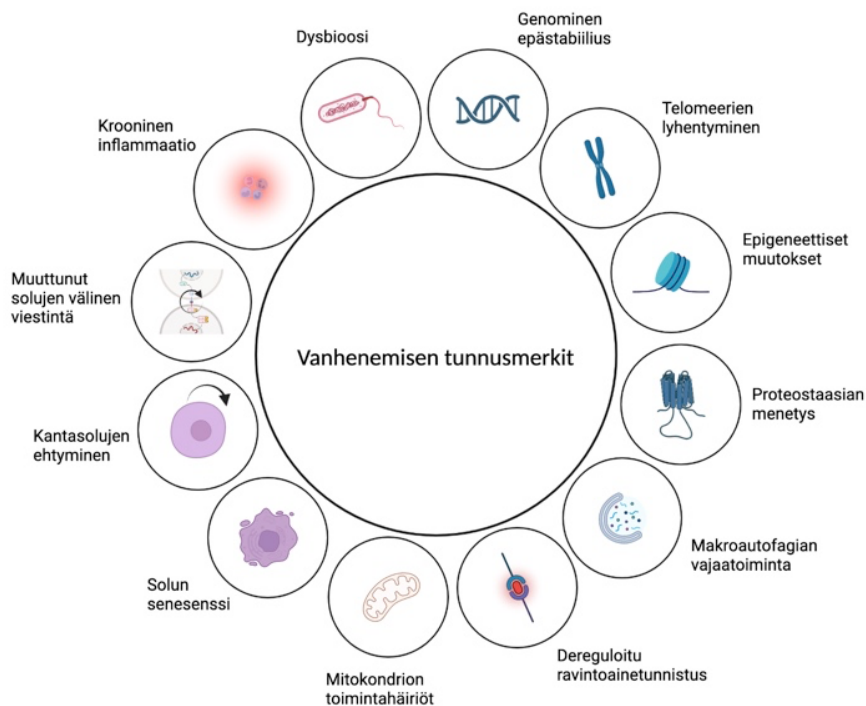
Kalle Keisu

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	4
2. MITOKONDRION ENERGIAMETABOLIAN TOIMINTA, YLLÄPITO JA SÄÄTELY.....	6
2.1 Oksidatiivinen fosforylaatio.....	6
2.2 Q-sykli ja koentsyymi Q.....	7
2.3 Reaktiiviset happiradikaalit (ROS).....	9
2.4 Antioksidanttijärjestelmä.....	9
3. ENERGIAMETABOLIA RAPPEUTUU VANHENEMISESSÄ.....	10
3.1 Mutaatioiden kynnsarvon saavuttaminen laukaisee energiametabolian häiriöt.....	10
3.2 Vapaiden radikaalien teoria vanhenemisessä ja oksidatiivinen stressi.....	11
3.3 Asteittainen ROS-vaste hypoteesi.....	13
3.4 ATP:n tuotanto vähenee vanhenemisessä.....	14
4. TASAPAINOISEN REDOX-TILAN SÄÄTELIJÄMOLEKYYLIT VANHENEMISESSÄ.....	15
4.1 NAD ⁺ -tasojen muutosten vaikutus vanhenemiseen.....	16
4.2 Sirtuiinit tarvitsevat toimintaansa NAD ⁺ -koentsyymiä.....	17
4.3 NADP ⁺ ja NADPH vanhenemisessä.....	19
5. GENEETTINEN EHEYS VAURIOITUU REPLIKAATIOKONEISTON VIRHEIDEN TAKIA.....	21
5.1 Mitokondriaalinen DNA (mtDNA).....	22
5.2 mtDNA:n genetiikka.....	22
5.3 Mitokondrion DNA-polymeraasi γ	23
5.4 DNA-polymeraasi γ vanhenemistä kiihdyttävien mutaatioiden aiheuttajana.....	23
5.5 mtDNA-mutaatioiden kertyminen solussa.....	24
6. YHTEENVETO.....	26
7. LÄHDELUETTELO.....	27

1. JOHDANTO

Vanheneminen on monitasoinen ilmiö, jossa fysiologinen eheys heikkenee asteittain. Lisäksi alttius vakaviin molekyyli- sekä elimistötason ilmiöihin, kuten sydän- ja verisuonitauteihin, lisääntyy kehossa. Lopulta sairauksien kertyminen, yleiskunnon heikkeneminen ja elimistön puute korjata erinäisiä toiminnallisia häiriöitä aiheuttavat luonnollisen jatkumon elinkaarelle eli kuoleman (Amorim ym., 2022). Mielenkiinto vanhenemisen biologiaan on kasvanut tiedeyhteisössä vahvasti tähän päivään saakka. Suurimpana arvoituksena pidetään sitä, miksi toiset yksilöt vanhenevat nopeammin ja kohtaavat vanhenemiseen liittyviä sairauksia paljon todennäköisemmin kuin toiset. Kronologinen ikä eli kalenteri-ikä on mittayksikkö, jota käytetään muuttujana eri ilmiöiden vertailuun yksilöiden välillä ja toisaalta koko populaation keskuudessa. Kronologinen ikä ei anna yksiselitteistä vastausta vanhenemiselle, vaikkakin se voi ennustaa kohtalaisen hyvin vanhenemiseen liittyviä sairauksia ja toimintahäiriöitä. Biologinen ikä kuvaa tarkemmin ihmisen biologista eheyden tilaa. Tämä havainto on edesauttanut tutkijoita löytämään molekyylitason selittäviä tekijöitä, miksi biologiset toiminnot heikkenevät vanhenemisessä.



Kuva 1. López-Otínin esittämät 12 vanhenemisen tunnusmerkkiä. Tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään osaan mitokondrion toimintahäiriöihin, energiametabolian ja siihen kytkeytyneiden säätelyreittien ylläpidon ja toimintahäiriöiden näkökulmasta. Kuva tehty biorender.com. Kuva perustuu lähteeseen (López-Otín ym. 2023).

López-Otín esittää artikkelissaan 12 biologista vanhenemista ohjaavaa tunnusmerkkiä, joiden tarkoituksena on kuvata ja selvittää, minkä takia ihminen vanhenee (kuva 1). Vanhenemisen tunnusmerkit käsitteenä on haastava määritellä, sillä kaiken kattavaa syytä vanhenemiseen ei ole pystytty todentamaan. Vanhenemista pidetään tunnusmerkkien integraationa; tunnusmerkit vaikuttavat toistensa ilmentymiseen ja kehittymiseen vanhenevassa yksilössä (López-Otín ym. 2023). López-Otín ehdottaa, että vanhenemisen tunnusmerkit ovat solu- ja molekyyli-tason ilmiöitä, jotka täyttävät seuraavat periaatteet: (i) ilmaantuvuus on yhteydessä vanhenemiseen, (ii) vaikutuksen korostaminen kiihdyttää vanhenemistä ja (iii) niihin kohdistuvat hoitomenetelmät voivat hidastaa, pysäyttää tai jopa kääntää vanhenemisen etenemistä (engl. anti-aging) (López-Otín ym. 2013, López-Otín ym. 2023). Vanhenemisen tunnusmerkkien luokittelu pyrkii jäsentämään ne ominaispiirteidensä mukaan. Primaarisia tunnusmerkkejä on viisi, joiden haitallinen vaikutus solujen eheyteen on väistämätöntä. Kolmen antagonistisen tunnusmerkin vaikutus on riippuvainen ilmiön voimakkuudesta. Lisäksi on esitetty neljä integroivaa tunnusmerkkiä, joiden toimintaympäristö on laajempi ja vaikuttaa koko kudoksen tasapainoiseen toimintaan. (López-Otín ym. 2013, Amorim ym. 2022, López-Otín ym. 2023)

Mitokondriot ovat eukaryoottisolun soluorganelleja, joiden ensisijaisena tehtävänä on tuottaa solun tarvitsema energia. Mitokondrioilla on myös useita muita tehtäviä solussa, kuten apoptoosin välittäminen, osallistuminen aineenvaihduntaan ja sytosolisen kalsiumkonsentraation säätely. (Andrieux ym. 2021, Stamerra ym. 2022). Mitokondriot ovat alkuperänsä takia kiehtovia soluorganelleja. Vuoden 1967 endosymbioositeorian mukaan aerobinen alfaproteobakteeri siirtyi arkeeseen (engl. Archean) isäntäsolun sisään ja muodosti ajan kuluessa symbioottisen suhteen organismien välille (Andrieux ym. 2021). Vuorovaikutuksellinen yhteiselo mahdollisti eukaryoottisolun syntymisen. Prokaryoottisen alkuperänsä takia, mitokondrio sisältää oman DNA:n (mtDNA) ja tämän takia kahden erillisen genomien on täytynyt mukautua toistensa toimintaan mutkattomasti. Mitokondrion genomi on myös alttiina ympäristön mutageeneille, jotka voivat pahimmassa tapauksessa aiheuttaa merkittäviä tuhoja mtDNA:ssa ja nämä muutokset voivat heijastua mitokondrion toimintahäiriöinä. (Andrieux ym. 2021)

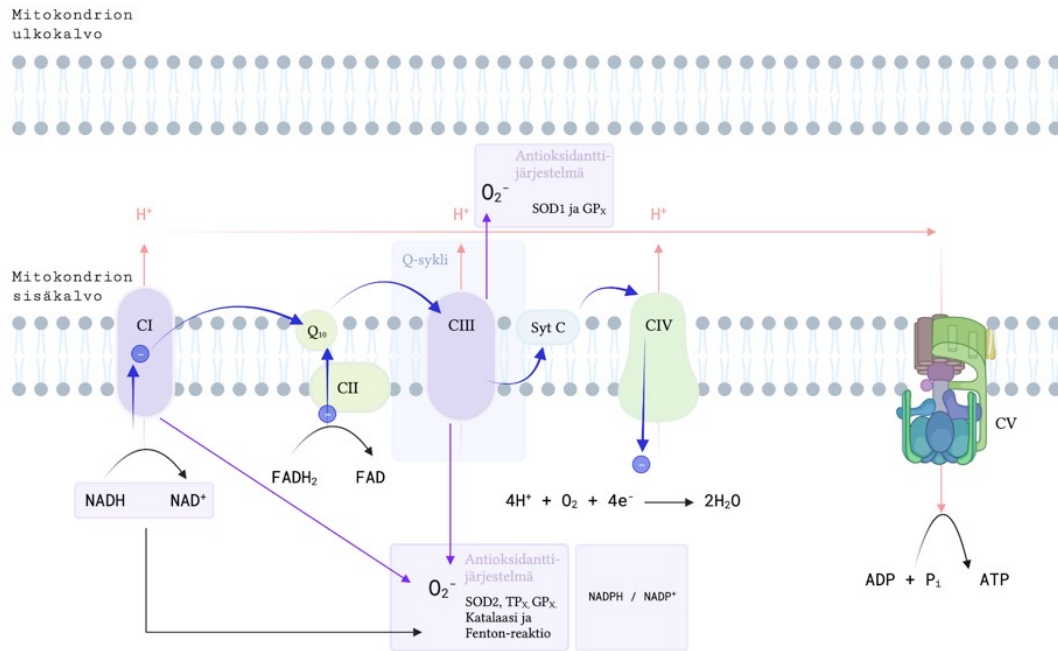
Mitokondrion toimintahäiriöt tarkoittavat sen viallisia molekyyli-tason prosesseja, joille on ominaista hengityskapasiteetin vähentyminen mitokondriota kohden sekä mitokondrion kalvopotentiaalini vähentyminen vakaassa tilassa (Miwa ym. 2022). Toimintahäiriöt voivat olla seurausta mtDNA:n tai nukleaarisen DNA:n (nDNA) mutaatioista tai ne voivat kehittyä sekundaarisesti jonkin patologisen tilan seurauksena, kuten vanhenemisen takia (Stamerra ym. 2022). Tässä kirjallisuuskatsauksessa esitetään vanhenemisen teorialat, jotka ovat kytköksissä mitokondrion energiametabolian toimintahäiriöihin. Lisäksi kirjallisuuskatsauksessa esitetään molekulaariset mekanismit näiden teorioiden taustalla ja kuinka mitokondrion energiametabolian tasapainon säätely muuttuu biologisen vanhenemisprosessin aikana.

2. MITOKONDRION ENERGIAMETABOLIAN TOIMINTA, YLLÄPITO JA SÄÄTELY

Mitokondrion normaali, terve toiminta on elämän edellytys, sillä se tuottaa monimutkaisella entsyymikompleksien muodostamalla reitillä koko solun tarvitseman energian ATP:n muodossa. Mitokondrion energiametabolia kulminoituu oksidatiiviseen fosforylaatioon ja sen toiminnan säätelyyn sekä ylläpitoon. Myös normaaleissa olosuhteissa mitokondrion energiametaboliassa muodostuu solulle vahingollisia molekyylejä, joiden haitallinen vaikutus pyritään neutralisoimaan tehokkaalla antioksidanttijärjestelmällä (redox-järjestelmä) (kuva 2). Mitokondrion eheästi toimiva energiametabolia tarkoittaa homeostaasin ylläpitoa; elektronivirtaus kompleksien läpi mahdollistaa ATP:n synteesin, ja elektronivuoto pyritään minimoimaan kompleksien korkealla hyötysuhteella sekä antioksidanttijärjestelmällä.

2.1 Oksidatiivinen fosforylaatio

Oksidatiivinen fosforylaatio jakautuu kahteen toiminnallisesti eroavaan mekanismiin, elektroninsiirtoketjuun sekä ATP:n synteesiin (kuva 2). Mitokondrion matriksissa tapahtuva Krebsin sykli muodostaa pelkistyneitä NADH- sekä FADH₂ -molekyylejä, jotka toimivat elektroninsiirtoketjun raaka-aineena; NADH ja FADH₂ vapauttavat elektroninsiirtoketjuun elektroneja, ja aerobisissa olosuhteissa elektronien tehtävänä on pelkistää terminaalinen happimolekyylä vedeksi. Elektronit etenevät elektroninsiirtoketjussa kompleksilta ja molekyyliltä toiselle pelkistyspotentiaaliarvon mukaisesti ja samalla vapauttavat energiaa. Vapautuva energia mahdollistaa protonien (H⁺) kuljetuksen kuljettajamolekyylin välityksellä sisäkalvon lävitse kalvojen väliseen tilaan. Protonien virtauksesta muodostuu korkea protonigradientti, joka vapautuu kompleksin V kautta, muodostaen solun tarvitseman ATP:n. (Protasoni ja Zeviani 2021)



Kuva 2. Oksidatiivinen fosforylaatio ja antioksidanttientsyymien muodostama säätelyjärjestelmä. Oksidatiivinen fosforylaatio alkaa NADH:n ja FADH₂:n hapettumisella. Elektroninsiirtoketjussa elektronien liike (siniset nuolet) pohjautuu entsyymien ja vastaanottajamolekyylin pelkistyspotentiaaliarvoihin ja komponenttien väliin hapetus-pelkistys-reaktioihin (redox-reaktiot). Elektronien kuljetuksessa vapautuva energia käytetään protonien kuljettamiseen (punaiset nuolet) kuljettajaproteiinien välityksellä mitokondrion kalvojen väliseen tilaan. Protonigradientti vapautuu CV kautta ja indusoi ATP:n synteesin. Kompleksin V *f*₁-alaysikkö vastaa adenosiinidifosfaatin (ADP) fosforylaatiosta, ja vastaavasti *f*₀-alaysikkön tehtävänä on sitoa protoneita (protonaatio) ja aiheuttaa kompleksin konformaatiomuutoksen. Konformaatiomuutos on välttämätön protonien takaisinvirtaukselle matriksiin ja sykliselle ATP:n synteesille *f*₁-alaysikkössä. Q-sykli on tärkeä säätelypiste elektroninsiirtoketjussa (vaaleansininen laatikko). Q-syklin komponentit toimivat myös antioksidanteina (Díaz-Casado ym. 2019). Antioksidanttijärjestelmän (violetit laatikot) tehtävänä on ylläpitää solun redox-tasapainoa neutralisoimalla vapaita happiradikaaleja, joita syntyy mm. CI ja CIII kautta (violetit nuolet). Elektroninsiirtoketjun kompleksit ja molekyylit: NADH-dehydrogenaasi (CI), Sukkinaattidehydrogenaasi (CII), Ubikinoni (Q₁₀), Sytokromi bc₁ kompleksi (CIII), Sytokromi C (Syt C), Sytokromi C oksidaasi (CIV) sekä *f*₁*f*₀ ATPaasi eli ATP-syntaasi (CV). Kuva tehty biorender.com. (Protasoni ja Zeviani, 2021)

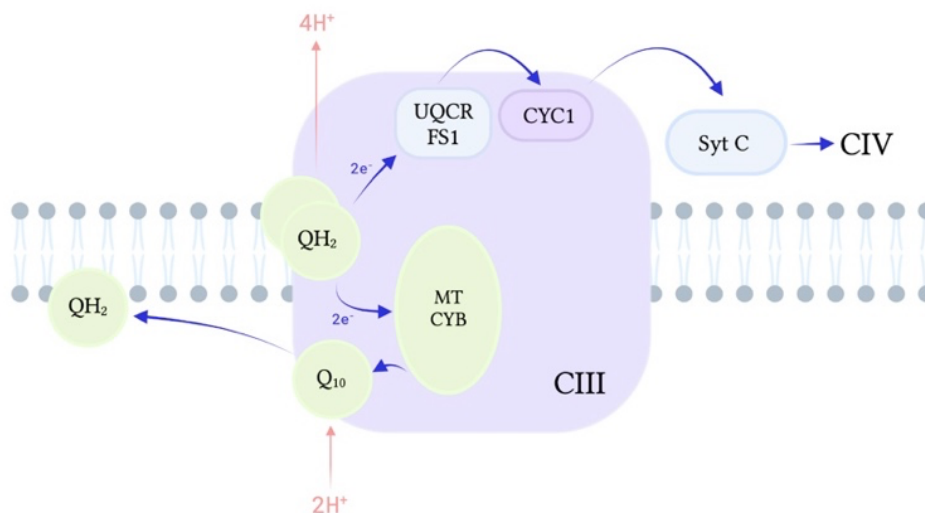
2.2 Q-sykli ja koentsyymi Q

Q-sykli on sarja hapetus-pelkistys-reaktioita, jonka keskeisenä tekijänä toimii koentsyymi Q (KoQ, ihmisellä KoQ₁₀). Yleensä KoQ:lla viitataan sen hapettuneeseen muotoon eli ubikinoniin (Q tai KoQ) ja vastaavasti pelkistynyt muoto on ubikinoli (QH₂). KoQ on myös yleisnimitys kaikille kyseisen koentsyymien alalajeille. KoQ sijaitsee mitokondrion sisäkalvolla ja sen ensisijaisena tehtävänä on yhdistää metaboliareitit mitokondrion energiantuotantoon. On kuitenkin huomattava, että KoQ:n tehtävät eivät rajoitu Q-sykliin, vaan koentsyymillä on useita tehtäviä solussa, kuten toiminta antioksidanttina (taulukko 1). KoQ:n yhteyttä pitkäikäisyyteen on myös arvuuteltu, koska tutkimukset ovat osoittaneet yhteyksiä vioittuneen KoQ:n biosynteesin ([KoQ] lasku) ja pitkäikäisyyden välillä. Osassa ihmisen kudoksia huomataan selvää Q₁₀-tason laskua vanhenemisen yhteydessä, mikä on ristiriidassa edellä todetun tuloksen kanssa – Q₁₀-kohdistunut tutkimus vaatii siis selvää lisätutkimusta. (Díaz-Casado ym. 2019, Protasoni ja Zeviani, 2021)

Taulukko 1. Koentsyymi Q:n tehtävät solussa. Molekyylit: Glyceroli-3-fosfaattidehydrogenaasi (G3PDH), Elektroninsiirto-flavoproteiinidehydrogenaasi (ETFDH) ja lipidiperoxyyliradikaali (LOO). Prosessit: Elektroninsiirtoketju (ETC) ja Lipidiperoxydaatio (LPO). Q₁₀ on ihmisen ubikinoni. (Díaz-Casado ym. 2019)

	Tehtävä	Kohdemolekyylit	Huomioita
Koentsyymi Q:n toiminta solussa	Q-syklin ja ETC:n toiminta	Sytokromi bc ₁ kompleksi	
	Metaboliareittien säätely ja integraatio	G3PDH	
	β-oksidaation ylläpito	ETFDH	
	LPO:n esto	Kalvolipidit	
	LPO:n esto ja toiminta antioksidanttina	Kalvolipidit ja LOO	
	DNA:n oksidatiivisen vaurion esto	Hapetetut emäkset (8-okso-G)	
	DNA:n korjausentsyymien aktivaatio (Q ₁₀)	DNA:n korjausentsyymit	Tarkka molekulaarinen mekanismi epäselvä (lymfosyytit)

Kompleksit I ja II luovuttavat kumpikin kaksi elektronia hapettuneille KoQ-molekyyleille eli ubikinoneille (ihmisillä Q₁₀), muodostaen pelkistyneet kaksi ubikinolia QH₂. QH₂ luovuttaa elektronit kompleksille III, jonka tehtävänä on hapettaa ubikinolit takaisin Q₁₀:ksi. Samalla elektronit siirtyvät sytokromi C-molekyylille. Q-syklin kaksi rinnakkaista reaktioreittiä on havainnollistettu yläpuolella (kuva 3). (Protasoni ja Zeviani, 2021)



Kuva 3. Q-syklin kaksi rinnakkaista reaktiota. Siniset nuolet kuvaavat elektronien liikettä. 1. reaktiossa QH₂:n elektroni siirtyy rauta/rikkiklusterin välityksellä sytokromi c₁:n hemiryhmään (CYC1). CYC1 siirtää elektronin sytokromi C:lle. QH₂:n toinen elektroni siirretään sytokromi b:n kahteen hemiryhmään (MTCYB) ja lopulta Q₁₀:lle, muodostaen osittain pelkistyneen semikinonin (Q). Q:n täydellinen pelkistyminen QH₂:ksi tapahtuu toisen rinnakkaisen reaktion jälkeen. Lopulta yksi QH₂ kierrätetään ja kaksi elektronia jatkaa elektroninsiirtoketjua kompleksille IV. Q-syklin komponentit: Ubikinoni (Q₁₀), Ubikinoli (QH₂), Sytokromi bc₁ kompleksin (CIII) hemiryhmät, Rieske-proteiini (UQCRFS1) ja sen rauta/rikkiklusteri sekä Sytokromi C (Syt C). Kuva tehty biorender.com. Kuva perustuu lähteeseen (Protasoni ja Zeviani, 2021).

2.3 Reaktiiviset happiradikaalit (ROS)

Terveen mitokondrion elektroninsiirtoketju muodostaa reaktiivisia ja epästabiileja happilajeja, jotka voivat hapettaa molekyyliä ja tuottaa toisia reaktiivisia ROS-molekyyliä (Kudryavtseva ym. 2016). ROS (engl. radical oxygen species) ovat mitokondrion normaalista toiminnasta muodostuneita vapaita radikaaleja, jotka vaurioittavat mitokondrion ja sytoplasman makromolekyyliä, kuten proteiineja, lipidejä (lipidiperoksidaatio) sekä nukleiinihappoja (Kudryavtseva ym. 2016). ROS-lajeja, esimerkiksi superoksidia, tuotetaan enimmäkseen mitokondrion sisäisessä kalvostossa, kun elektroneja vuotaa kompleksien I ja III kautta. Myös muissa solun sisäisissä osissa voi muodostua vapaita happiradikaaleja, mutta tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään vain mitokondriosta peräisin oleviin ROS-molekyyliin (mtROS). Merkittävimpiä mtROS-lajeja patofysiologian kannalta ovat superoksidianioni ($O_2^{\cdot-}$), hydroksyyliiradikaali ($OH^{\cdot-}$), vetyperoksidi (H_2O_2) sekä hydroksidi-ioni (OH^-). (Larsson 2010, Kudryavtseva ym. 2016)

2.4 Antioksidanttijärjestelmä

Antioksidanttijärjestelmän tehtävänä on suojata solua liialliselta oksidatiiviselta altistumiselta useiden eri tekijöiden toimesta. Antioksidanttijärjestelmään sisältyy muun muassa solun sisäiset antioksidanttiensyymit ja -molekyylit, joista suurimman osan toiminta lokeroituu mitokondrion (Kudryavtseva ym. 2016). mtROS:ien ja antioksidanttijärjestelmän keskinäinen suhde on pysyttävä tasapainossa (Sies 2015). On hyvä huomioida, että mtROS-lajien haitallinen vaikutus solun makromolekyyliä kohtaan vaihtelee, joten eri mtROS-lajeilla on omat vaatimuksensa neutralointia varten. Esimerkiksi $O_2^{\cdot-}$ tai H_2O_2 eivät ole kovinkaan reaktiivisia, eivätkä siten vahingoita mtDNA:ta suuria määriä (Kauppila ym. 2017). Vastaavasti Fenton-reaktion seurauksena syntynyt $OH^{\cdot-}$ on paljon haitallisempi mtROS-laji (Kauppila ym. 2017). Antioksidanttijärjestelmän toiminnallinen yhteys elektroninsiirtoketjuun on esitettyä kuvassa (kuva 2).

ROS-tuotanto alkaa hapen muunnoksesta superoksidianioniksi ksantiinioksidaasin tai elektroninsiirtoketjun kompleksien I (NADH-hydrogenaasi) sekä III (Sytokromi bc_1 kompleksi) kautta. Kompleksi III tuottaa superoksidianionin sekä mitokondrion kalvojen väliseen tilaan, että mitokondrion sisälle matriksiin. Tämän jälkeen superoksididismutaasi (SOD1/2) muuntaa superoksidianionin vetyperoksidiksi. SOD2 toiminta rajoittuu mitokondrion matriksiin, ja vastaavasti SOD1 aiheuttaa vetyperoksidin muodostusta mitokondrion ulko- ja sisäkalvon välisessä tilassa (Kauppila ym. 2017). Solussa on kehittynyt useita mekanismeja vetyperoksidin muuntamiseen muiksi metaboliiteiksi; ensinnäkin vetyperoksidi voidaan hajottaa vedeksi ja hapeksi glutationiperoksidaasin (GPx), katalaasin (CAT) tai tioredoksiiniperoksidaasin (TPx) toimesta. Lisäksi vetyperoksidi on mahdollista muuntaa hydroksyyliiradikaaliksi ja hydroksidi-ioniksi ominaisen Fenton-reaktion avulla. Fenton-reaktiossa tarvitaan vapaata ferroionia (Fe^{2+}) hydroksyyliiradikaalin muodostumiselle

(Kauppila ym. 2017). Glutanionilla (GSH) yksikseen on myös merkittävä tehtävä inhiboida solun ROS-tasojen haitallista nousua. (Hekimi ym. 2011, Wang ym. 2013, Kudryavtseva ym. 2016)

3. ENERGIAMETABOLIA RAPPEUTUU VANHENEMISESSÄ

Mitokondrion energiametabolian muutokset ja heikentyminen, kuten energiantuotannon kysynnän ja tarjonnan epätasapaino, on tiiviisti yhteydessä vanhenemiseen ja vanhetessa esiintyviin sairauksiin (Amorim ym. 2022). Tämän takia mitokondriota ei enää nähdä ainoastaan energiatehtaana, vaan se osallistuu perusteellisesti biologiseen vanhenemisprosessiin ja sairauksien esiintyvyyteen vanhuusiässä (Amorim ym. 2022). Mitokondrion energiametabolinen homeostaasi rappeutuu vanhenemisessä, mikä on seurausta toimintajärjestelmien (kuva 2) heikentyneestä kyvyistä toteuttaa tehtäväänsä ja entsyymien sekä säätelijämolekyylien tasojen muutoksista. Monet alkuperäiset tutkimushavainnot selkärangattomista kädellisiin puoltavat teoriaa, jonka mukaan mitokondrion toimintahäiriöt ovat merkittäviä tekijöitä vanhenemisessä. Havaintoja ovat esimerkiksi (i) kronologisen iän korrelaatio oksidatiivisen stressin edistämään soluvaurioon, (ii) mitokondrion toiminnan inhibointi voi kiihdyttää ROS-tuotantoa sekä (iii) useat vanhenemiseen liittyvät sairaudet kytkeytyvät oksidatiivisen stressin kasvuun. (Hekimi ym. 2011, Wang ym. 2013)

3.1 Mutaatioiden kynnsarvon saavuttaminen laukaisee energiametabolian häiriöt

mtDNA:n mutaatiotiheyden on saavutettava prosentuaalinen kynnsarvo, jotta vanhenemiseen liittyvät fenotyypit ilmestyvät yksilössä (Kauppila ym. 2017, Lawless ym. 2020, Ziada ym. 2020). Ilmiö ei ole riippuvainen vanhenemiseen linkittyneiden mutaatioiden laukaisevasta tekijästä, vaan ainoastaan solutyypin spesifisestä energiatarpeesta. Prosenttiosuus viittaa mutatoituneiden mtDNA:ien määrään mitokondriossa. Yleinen kynnsarvo patogeenisilla mtDNA:n mutaatioilla vaihtelee 60–90 % välissä (Larsson 2010, Kauppila ym. 2017). Kynnsarvon ylittäminen johtaa esimerkiksi oksidatiivisen fosforylaation häiriintymiseen ja siten aiheuttaa mitokondrion toimintahäiriöitä. (Wang ym. 2013)

Mitokondrion toimintahäiriö voi laukaista useita reittejä, joilla solu pyrkii kompensoimaan vähentynyttä energiansaantia kysynnän pysyessä vakiona tai minimoimaan haitallisten molekyylien vaikutuksen solun makromolekyyliä kohtaan; solu voi edetä kokonaisuudessaan vakavaan toimintahäiriöön ja siten laukaista apoptoosin solunsisäisen aktivointimekanismin kautta. Toinen vaihtoehto on aktivoida mitokondrion biogeneesiä eli uusien mitokondrioiden synteesiä, jotta oksidatiivi-

sen fosforylaation kapasiteetti lisääntyy ja ylläpidetään solun energiansaantia. Mitokondriaalinen biogeneesi tarkoittaa mitokondrion määrän kasvua solussa itsenäisen replikaation takia (Amorim ym. 2022). Tässä kirjallisuuskatsauksessa ei kuitenkaan syvennyttä mitokondrion biogeneesin säätelyyn ja sen muutoksiin vanhenemisen yhteydessä. (Kauppila ym. 2017)

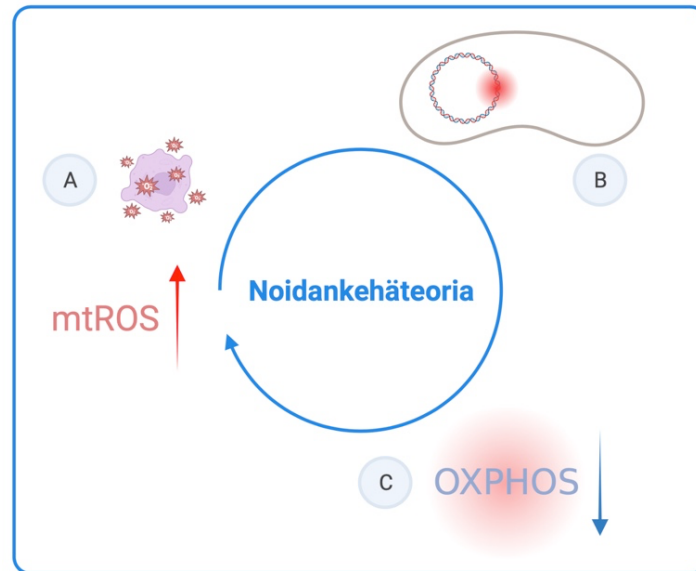
3.2 Vapaiden radikaalien teoria vanhenemisessä ja oksidatiivinen stressi

Denham Harman julkaisi vuonna 1956 ensimmäisen artikkelin vapaiden radikaalien teoriasta vanhenemisessä (engl. Free-Radical Theory of Aging, FRTA) (Wang ym. 2013). FRTA:n mukaan ROS-välitteinen mtDNA:n mutageneesi ja muut oksidatiiviset vauriot laukaisevat solun vanhene- misprosessin, joka kiihtyy mutaatioiden kertymisen seurauksena. Elektroninsiirtoketjun komplek- sit I ja III muodostavat pienen määrän reaktiivisia sivutuotteita, joiden haitallinen hapettava vaiku- tus voidaan kuitenkin kompensoida antioksidanttien avulla. Teorian mukaan elektroninsiirtoketjun tai muu energiametabolinen häiriötila johtaa sivutuotteiden kertymiseen solussa. Elektroninsiirto- ketjun homeostaasin häiriöllä on merkittävä vaikutus solun oksidatiivisessa stressissä. Oksidatiiv- inen stressi viittaa solun reaktiivisten happilajien (ROS) ja antioksidanttien epätasapainoon, jol- loin hetkellinen tai pysyvä ROS:in kertyminen aiheuttaa redox-signaloinnin ja -kontrollin häiriöitä, mikä johtaa molekyyli- tason fysiologisiin vaurioihin. (Hekimi ym. 2011, Sies 2015)

Oksidatiivisen stressin on ehdotettu olevan mtDNA:n mutaatioiden ja deleetioiden pääasiallinen aiheuttaja, ja siten se vaikuttaisi vanhenemisen patofysiologian etenemiseen. Oksidatiivisten vau- rioiden tunnusmerkit – proteiinien hapettuminen, lipidiperoksidaatio ja DNA:han kertyneet mutaa- tiot (8-okso-dG) – on yhdistetty vanhaan kudokseen (Kauppila ym. 2017). ROS aiheuttaa monien proteiinien vaurioitumista. Esimerkiksi rautarikki-ryppäitä sisältävät Krebsin sykliin ja oksidatiivi- seen fosforylaation osallistuvat entsyymit ovat hyvin alttiita oksidatiiviselle stressille. Akonitaasi on yksi Krebsin syklin entsyymeistä ja sen ROS-välitteinen rautarikki-ryppäiden hajoaminen van- henneissa kudoksissa aiheuttaa Fe^{2+} vapautumisen. Vastaavasti Fe^{2+} kiihdyttää Fenton- reaktioita, mikä lisää ROS-tasoa mitokondriossa. (Wang ym. 2013)

Hieman myöhemmin Harman uudisti FRTA:n mitokondrion vapaiden radikaalien teoriaksi vanhe- nemisessä (engl. Mitochondrial Free-Radical Theory of Aging, MFRTA), sillä hän tajusi ROS:in tuotannon tapahtuvan pääasiallisesti mitokondrioissa ja vaikuttavan heikentävästi mtDNA:n ehey- teen. mtDNA sisältää geneettisen informaation elektroninsiirtoketjun proteiinien ja pienempien alayksiköiden synteessille (Protasoni ja Zeviani 2021). Tämän takia on ehdotettu, että mtDNA:han kohdistuneet pistemutaatiot ja deleetioidet – jotka mtROS:it ovat teorian mukaan aiheuttaneet – ovat laukaisevia tekijöitä mitokondrion toimintahäiriöille (Ziada ym. 2020). Seurauksena positiivinen palautesilmukka (kuva 4) edistää ilmiötä; mitokondrion toimintahäiriöt kiihdyttävät energiametabo- lian kautta muodostuneiden haitallisten sivutuotteiden syntyä ja siten solun oksidatiivista vaurioi-

tumista sisältäpäin. Lisäksi on todettu, että vanhenemisprosessissa oksidatiivinen fosforylaatio heikkenee sekä antioksidanttientsyymien ilmentyminen muuttuu, joilla on myös vahva yhteys noidankehään, MFRTA:n perustaan. (Wang ym. 2013, Ziada ym. 2020)



Kuva 4. Denhan Harmanin MFRTA:n perustana on noidankehän esiintyminen. A) Teorian mukaan mtROS on laukaiseva tekijä mitokondrion toimintahäiriöiden esiintymisessä. mtROS-tasojen nousu aiheuttaa oksidatiivisen stressitilan, joka muun muassa B) vaurioittaa solun mtDNA:ta. mtDNA sisältää elektroninsiirtoketjun kompleksien alayksiköiden geneettisen materiaalin, joten sen mutageneesi kiihdyttää C) oksidatiivisen fosforylaation (OXPHOS) toimintahäiriötä. Viallinen oksidatiivinen fosforylaatio muodostaa lisää reaktiivisia vapaita happiradikaaleja (mtROS). Kuva tehty biorender.com. (Ziada ym. 2020)

Vaikkakin MFRTA on teoreettisesti – sekä osin kokeellisesti – pätevä ja se on luonut pohjaa mitokondrion toimintahäiriöille vanhenemisessä, teoria on saanut myös paljon kritiikkiä. Yhtenä arvoituksena pidetään sitä, onko ROS:illa kausaliitteinen vaikutus vanhenemiseen vai onko sen ylituotanto kytköksissä vanhenemiseen muilla tavoin (Hekimi ym. 2011). Kritiikin takia ROS-ylituotantoa ja sen aiheuttamaa oksidatiivista stressiä ei enää pidetä ensisijaisena vanhenemistä kiihdyttävänä tekijänä, vaikka korrelaatioita eliniän pituuden ja ROS-tuotannon tehokkuuden välillä on havaittu. Lisäksi jatkotutkimuksissa on ilmennyt muutama MFRTA:n teoreettista pohjaa muertava havainto: (i) ROS-tuotannon ja eliniän pituuden välillä ei ole todettu korrelaatiota useilla eliölajeilla, (ii) antioksidanttien antaminen aiheuttaa enemmän terveyshaittoja kuin -hyötyjä selkärangattomista ihmisiin sekä (iii) on löydetty pitkäikäisiä lajeja, joilla on kohtalaisen suuri ROS-tuotanto ja oksidatiivisen stressin tila. (Hekimi ym. 2011)

Eriyksen kiinnostava kritiikki kohdistuu MFRTA:n ydinlauseeseen, jonka mukaan oksidatiivisen stressin pitäisi kiihdyttää vanhenemistä. Vuodelta 2009 olevan tutkimuksen mukaan *C. elegans* -lajille *knockout*-menetelmällä tehty *sod2*-mutaatio aiheuttaa kohonnutta oksidatiivisen stressin tilaa, mutta se ei lyhennä elinikää vaan vastaavasti pidentää sitä (Raamsdonk ja Hekimi 2009). On

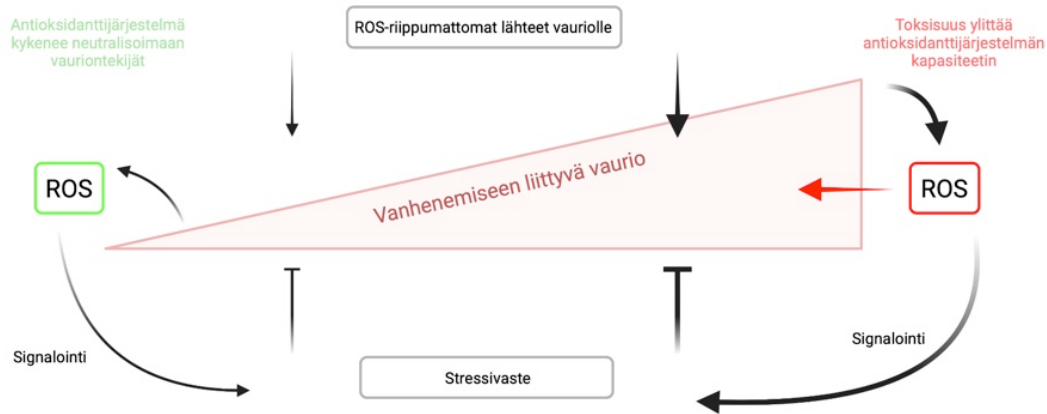
myös kokeellisesti todistettu, että antioksidanttientsyymien (SOD1/2 tai katalaasi) yli-ilmentyminen sekä antioksidanttien C- tai E-vitamiinin lisäännostus, eivät pidennä elinikää useissa malliorganismeissa. Merkittävin poikkeus lienee olevan mitokondrioon kohdistettu katalaasin yli-ilmentyminen hiirimallissa, joka pidentää elinikää. (Hekimi ym. 2011, Bradshaw 2019)

3.3 Asteittainen ROS-vaste hypoteesi

Homeostaasin ylläpito on solun elinehto. ROS-ylituotanto tai vastaavasti antioksidanttien puute voi johtaa solun makromolekyylien vaurioihin ja jopa apoptoosiin (Hekimi ym. 2011, Wang ym. 2013). Normaalisessa fysiologisessa tilassa, ROS:illa on myös solun toimintaa edistäviä tehtäviä, esimerkiksi toiminta solunsisäisenä viestimolekyylinä eli toisiolähtettinä. Ilmiöstä käytetään nimeä mitohormeesi ja ROS-riippuvaisen mitohormeesin on todettu pidentävän elinikää useissa malliorganismeissa, kuten banaanikärpäsessä sekä hieessä (Kudryavtseva ym. 2016). Ihmisillä samantyyppistä hyötyä ei ole vielä varmistettu, ja siten tutkimukset etenevätkin kiivaasti klinisiä kokeita kohti. (López-Otín ym. 2023)

Mitohormeesi perustuu pitkäikäisyyttä edistäviin fysiologisiin terveyshyötyihin, jotka syntyvät glukosirajoituksen tai makroravinteiden vähentämisen takia ROS-signaloinnin välityksellä (Kudryavtseva ym. 2016). ROS:it aktivoivat useita transkriptiotekijöitä, jotka osallistuvat stressireaktion edistämiseen. Esimerkiksi FOXO-transkriptiotekijä säätelee *sod1/2*-geenien ja katalaasi-geenien ilmentymistä, joiden tehtävänä on ROS:in detoksifikaatio, ja vastaavasti HSF-1-transkriptiotekijä vaikuttaa lämmön noususta eli lämpöstressistä riippuvaisten geenien ilmentymiseen (engl. heat shock genes). ROS:it ovat siis solun molekyyliä, joilla on sekä negatiivisia että positiivisia vaikutuksia solun toimintaan, riippuen niiden hetkellisestä konsentraatiosta. (Hekimi ym. 2011, Wang ym. 2013, Kudryavtseva ym. 2016)

Edellä olevat havainnot synnyttivät asteittaisen ROS-vaste -hypoteesin (kuva 5) (Hekimi ym. 2011). ROS-vaste-hypoteesin edistämisen oksidatiivisen vaurion on jopa ehdotettu olevan yksi vanhenemisen tunnusmerkeistä, sillä sen vaikutukset ovat yhtä moniulotteiset solutasolla verrattuna muihin vanhenemisen tunnusmerkkeihin (Ziada ym. 2020). Hekimi ehdottaa artikkelissaan, että vanhenemisessä soluun ja solun molekyyliin kertyy erilaisia vaurioita, joiden kehittyminen on riippumatonta oksidatiivisesta stressistä (Hekimi ym. 2011). Vanhenemiseen liittyvät vauriot voivat laukaista ROS-riippuvaisen stressivasteen, jonka tehtävänä on suojata solua. Matalat ROS-tasot pystytään neutralisoimaan solun tehokkaalla antioksidanttijärjestelmällä, joten prosessi ei ole haitallinen. Järjestelmän epätasapaino voi muodostaa ongelman; antioksidanttijärjestelmä ei kykene aina suojaamaan ROS-riippumattomilta vaurioilta, mikä johtaa niiden kertymiseen. ROS-vaste kasvaa vaurioiden kertymisen myötä. Vanhenemisessä järjestelmän epätasapaino kasvaa ja ROS:ien haitallinen vaikutus edistää juuri niitä toimintoja, joita ROS-riippuvainen stressireaktio pyrkii neutralisoimaan. (Hekimi ym. 2011)



Kuva 5. Hekimin asteittainen ROS-vaste-hypoteesi. Hypoteesin mukaan ROS:in hyödyllinen tai haitallinen vaikutus on riippuvainen sen intensiteetistä. Antioksidanttijärjestelmän epätasapaino edistää ROS-välitteisiä haitallisia vaikutuksia solussa, mikä voi heijastua mitokondrion toimintahäiriöinä. Yksityiskohtainen toiminta on selitettyinä leipätekstissä. Kuva tehty biorender.com. Perustuu lähteeseen (Hekimi ym. 2011)

3.4 ATP:n tuotanto vähenee vanhenemisessä

Vaikka elektroninsiirtoketjun toiminnan rappeutuminen ei välttämättä ole pääasiallinen syy ATP:n tuotannon vähenemiselle, niin näiden prosessien välillä ilmenee usein korrelaatiota. Elektroninsiirtoketjun entsyymit osallistuvat elektronien kuljetukseen sekä ATP-synteesille välttämättömän protonigradientin luontiin. Tämä protoneita ajava voima mitokondrion sisäkalvon läpi heikkenee vanhenemisessä (Bradshaw 2019).

Prinzinger julkaisi vuonna 2005 teorian (engl. maximum metabolic slope theory), jonka mukaan elinikä korreloi energiantuotannon kanssa. Vuodelta 2018 on tehty tilastollisia analyysejä sisältävä tutkimus, joka puoltaa tätä teoriaa (Schniertshauer ym. 2018). Teoria ehdottaa, että vanheneminen on seurausta solun heikentyneestä kyvystä tuottaa solun energiantarve. Ihmisen lihaksissa ATP-tasot laskevat 8 % vuosikymmenessä, mikä edesauttaa esimerkiksi sydämen vajaatoimintojen kehittymiseen tai vastaavasti se voi johtaa neuronien rappeutumiseen, joka edistää neurodegeneratiivisten sairauksien (esimerkiksi Alzheimerin tauti) kehittymistä (X.-Y. Chu ym. 2021). AMPK (engl. AMP-activated protein kinase) on ensisijainen entsyymi reagoimaan $[A(M/D)P]/[ATP]$ -suhteen kasvuun ja toimii avainmolekyylinä solun energiametaboliassa ja homeostaasin ylläpidossa (Amorim ym. 2022). Hiirimallien luurankolihasissa tehty tutkimus osoitti ATP-tasojen vähentymisen lisäävän AMPK:n aktiivisuutta ja siten mitokondrioiden biogeneesiä, mikä johtaa energian kompensaatioon (Amorim ym. 2022). (Schniertshauer ym. 2018)

ATP ei ole vain solun energiaa. ATP osallistuu makromolekyyliden synteesiin, aminohappojen aktivaatioon proteiinisynteesin aloituksessa sekä solusignaalointiin. ATP:n tehtävänä on myös ylläpitää makromolekyyliden liukoista muotoa fysiologisessa tilassa sekä säädellä solun eri

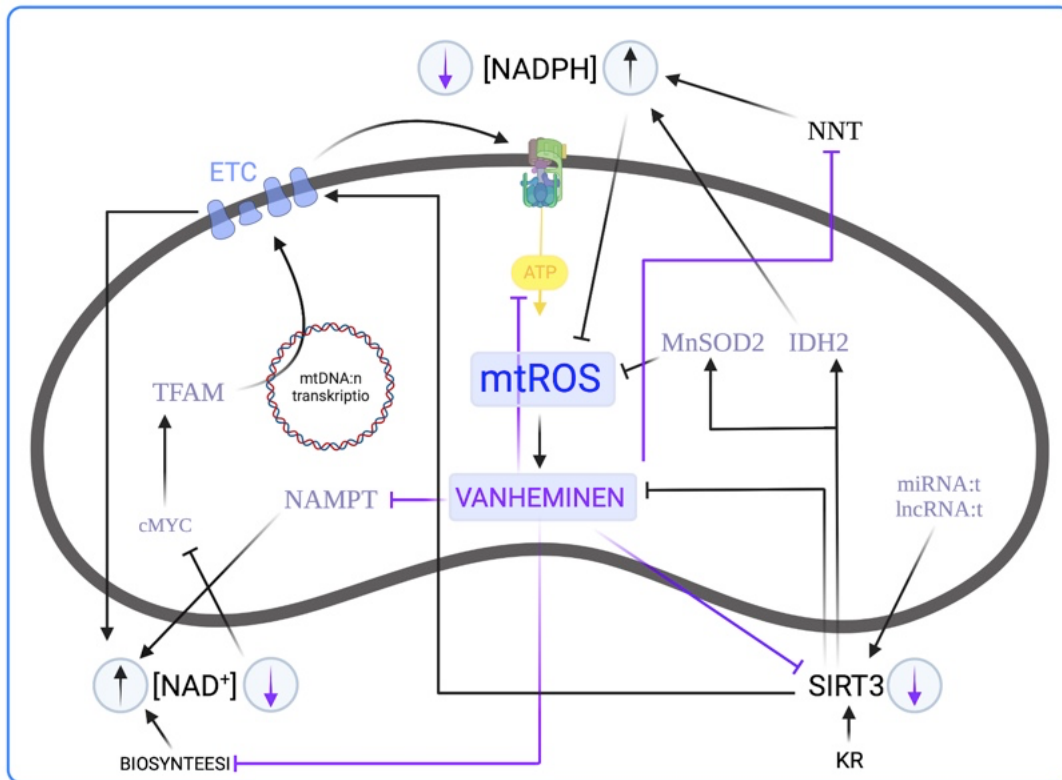
faasikomponenttien, kuten proteiinien, erottamista toisistaan (aggregaation esto). Näiden prosessien on ehdotettu osallistuvan vanhenemiseen liittyvien sairauksien patogeneesiin, sillä prosessin ylläpito on erityisen tärkeää solussa. Prosessin toimintahäiriö johtaa väärinlaskostuneisiin proteiineihin ja niiden aggregaatioon, mikä edesauttaa proteostaasian menetystä, joka on yksi vanhenemisen tunnusmerkeistä (López-Otín ym. 2013, X.-Y. Chu ym. 2021, López-Otín ym. 2023).

Myös Q-syklin (kuva 2) molekyylit osallistuvat ATP-tasojen ylläpitoon ihmisellä. Kohdennettu ubikinihoito vähensi vanhenemiseen liittyvää elektroninsiirtoketjun toiminnan heikkenemistä, ja siten nosti solun ATP-tasoa. Lisäksi uskotaan, että ubikinohoidot (Q_{10}) kykenevät vähentämään oksidatiivisen stressin edistämiä soluvaurioita ja hidastamaan MFRTA:n mukaista vanhenemistä ja vanhenemiseen liittyvien sairauksien esiintyvyyttä, sillä alhaiset ubikinonitasot vaikuttavat tähän päinvastaisesti. (Schniertshauer ym. 2018)

4. TASAPAINOISEN REDOX-TILAN SÄÄTELIJÄMOLEKYYLIT VANHENEMISESSÄ

Vanhenemisen tunnusmerkit eivät ole itsenäisiä kokonaisuuksia, sillä niiden toiminta- ja vaikutusmekanismit säätelevät toisiaan (López-Otín ym. 2013, López-Otín ym. 2023). Tunnuksmerkkien molekyylitason integroivia mekanismeja ei ole kuitenkaan täysin tunnistettu. Tämä osio yhdistää mitokondrion energiametabolian toimintahäiriöt vanhenemisessä koentsyymien muodostamaan antioksidanttijärjestelmään, sillä ne toimivat tiiviissä yhteistyössä (Abdellatif ym. 2021). Lisäksi tarkastellaan koentsyymiriippuvaisten entsyymien toimintaa solun energiametabolian ja homeostaasin säätelyssä, vanhenemisen näkökulmasta.

Useilla mitokondrion energiametaboliaan ja antioksidanttijärjestelmään osallistuvilla molekyyleillä on todistettu tasojen muutoksia (kuva 6) vanhenemisen yhteydessä useissa malliorganismeissa, mikä voi viitata niiden vaikutukseen vanhenemistä kiihdyttävänä tekijänä (Bradshaw 2019). Mitokondrion energiametabolian säätelijämolekyylit, kuten antioksidantit ja ekvivalentisti toimivat muut molekyylit, suojaavat solua mtROS-riippuvaisilta vaurioilta ja siten hidastavat solun tai kudoksen vanhenemistä. Mitokondriot vapauttavat signaalintimolekyylejä (mtROS, ATP, Ca^{2+} ja NAD^+), jotka voivat säädellä solun metabolista tilaa eri soluvasteiden kautta. Soluvasteet voivat tapahtua nDNA:n geenien ilmentymisen kautta, mikä voi johtaa moniin toimintoihin, kuten antioksidanttijärjestelmän tai oksidatiivisen fosforylaation edistämiseen. Mitokondrion entsyymit hyödyntävät myös suoraan kyseisiä molekyylejä. (Wang ym. 2013)



Kuva 6. Koentsyymien NADPH:n ja NAD⁺:n sekä Sirtuiini 3:n (SIRT3) yhteys vanhenemisessä. Violettit nuolet kuvastavat vanhenemisen edistämiä tai inhiboivia toimintoja, jotka vaikuttavat koko signaalintakarttaan. Mustat nuolet kuvaavat solun normaaleja toimintoja, joihin vanheneminen vaikuttaa. Nuolimerkinnät koentsyymien ja sirtuiini 3:n vieressä tarkoittavat tasojen nousua tai vastaavasti laskua. Vanhenemisessä [NADPH] laskee, SIRT3:n aktiivisuus vähenee sekä [NAD⁺] laskee. Sirtuiini 3:sta aktivoi KR sekä useat epigeneettiset tekijät, joiden mekanismi on vielä tutkimuksen alla. Toimintaa on avattu leipätekstissä (kappale 4). Molekyylien sijainnit eivät edusta oikeaa toimintaympäristöä. Lyhenteet: KR (kalorirajoitus), ETC (elektroninsiirtoketju), NNT (NAD(P)⁺-transhydrogenaasi), TFAM sekä cMYC (transkriptiofaktorit), NAMPT (NAM-fosforibosyyli transferaasi), MnSOD2 (mangaanisuperoksididismutaasi 2) ja IDH2 (isositraattidehydrogenaasi 2). Kuva tehty biorender.com.

4.1 NAD⁺-tasojen muutosten vaikutus vanhenemiseen

Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidin (NAD) patofysiologinen vaikutus on oivallettu viimeisen vuosikymmenen aikana. NAD on välttämätön koentsyymi monissa energiametabolian redox-reaktioissa, kuten Krebsin syklistä tai glykolyysissä. NAD:n muodot – hapetettu NAD⁺ sekä pelkistetty NADH – ylläpitävät solun energiatasapainoa ja säätelevät solun redox-tilaa, joilla on merkittävä vaikutus solun homeostaasiin ja vanhenemiseen (Abdellatif ym. 2021, Covarrubias ym. 2021). Lisäksi NAD⁺:n tehtäviin kuuluu solusignaalointi, osallistuminen entsyymien posttranslationaliseen muokkaukseen sekä toiminta entsyymien rajoittavana tekijänä DNA:n korjauksessa (PARPs, poly(ADP-riboosi)-polymeraasit) ja epigeneettisessä säätelyssä (Abdellatif ym. 2021). (Covarrubias ym. 2021)

NAD⁺ on osallinen reaktioissa, joissa ei tarvita hapettuneita- tai pelkistyneitä substraatteja tai tuotteita. Esimerkiksi NAD⁺ toimii useiden NAD⁺-riippuvaisten entsyymien, esimerkiksi sirtuiinien

tai PARP:ien kofaktorina ja edistää niiden katalyyttistä toimintaa. NAD⁺-riippuvaisten entsyymien toiminta tuottaa nikotiiniamidia (NAM) sivutuotteena, joka toimii myös NAD:in biosynteesin esias- teena (X. Chu ja Raju, 2022). NAD⁺:ien kulutus on jatkuvaa, joten NAD⁺-tasojen ylläpito syklimäi- sen biosynteesin kautta on merkittävää solun toiminnan kannalta. NAM-sivutuotteet voidaan syn- tetisoida takaisin NAD⁺-molekyyleiksi kierrätysreitit kautta (engl. NAM salvage pathway). (Covarrubias ym. 2021)

Vanheneminen aiheuttaa katabolisten ja anabolisten reaktioiden tasapainon pirstaloitumista siten, että NAD⁺:n hajoamisnopeus ohittaa sen biosynteesin nopeuden. NAD⁺-tasojen lasku on seu- rausta virheellisesti toimivasta kierrätysreitistä, joka johtuu NAMPT:n (NAM- fosforibosyyli transferaasi) vähentyneestä ilmentymisestä vanhenemisessä (Bradshaw 2019). NAD⁺:n konsentraatioon voi myös vaikuttaa sen heikentynyt biosynteesi tai NAD⁺-riippuvaisten entsyymien kasvava kulutus vanhenemisessä (Abdellatif ym. 2021). On ehdotettu, että alentu- neet NAD⁺-tasot vaikuttavat heikentävästi elektroninsiirtoketjun aktiivisuuden muutoksiin sirtui- nien välityksellä tai ilman, mistä seuraa kohonnut oksidatiivisen stressin tila (Bradshaw 2019). Tapahtumaketju voi aiheuttaa mtROS-riippuvaisia nDNA-vaurioita ja genomisen epästabiiliuden lisääntymistä, mikä on yksi todiste vanhenemisen tunnusmerkkien integraatiosta (López-Otín ym. 2013, Bradshaw 2019, López-Otín ym. 2023).

NAD⁺-tasojen lasku korreloi vanhenemisen kanssa jyrksijöissä ja jopa ihmisissä (Covarrubias ym. 2021, X. Chu ja Raju, 2022). Useat tutkimukset jyrksijämalleissa osoittavat, että NAD⁺-tasojen as- teittainen nousu voi viivyttää useampaa vanhenemisen tunnusmerkkiä ja vähentää vanhenemi- seen liittyvien sairauksien esiintymistä (Abdellatif ym. 2021). NAD⁺-tasojen parantaminen terveen yksilön tasolle on myös edistänyt solussa korjaustoimintoja vanhenemiseen liittyviä sairauksia ja ilmiöitä kohtaan sekä pidentävän elinikää useissa eläinmalleissa, kuten hiirimalleissa (X. Chu ja Raju, 2022).

Mielenkiintoinen havainto saatiin hiiren luurankolihaksessa; NAD⁺-tasojen lasku (kuva 6) vähensi c-Myc-transkriptiotekijän säätelynalaisena olevan TFAM:n ilmentymistä, jota tarvitaan elektronin- siirtoketjun toiminnan ylläpidossa mtDNA:n transkription välityksellä (Bradshaw 2019). Elektro- ninsiirtoketjun kompleksien aktiivisuuksien vajuus johtaa vähentyneeseen [NAD⁺]/[NADH] (Bradshaw 2019). NAD⁺-tasojen palauttamista on kehitetty terapeuttiseksi lähestymistavaksi ikääntyvän väestön hoidossa, mikä mahdollisesti antaa työkaluja eliniän pidentämiseen ei vain sairaiden yksilöiden keskuudessa mutta myös terveissä yksilöissä. (Covarrubias ym. 2021)

4.2 Sirtuiinit tarvitsevat toimintaansa NAD⁺-koentsyymiä

NAD⁺-tasojen vaje vanhenemisessä vaikuttaa myös sen säätelien entsyymien aktiivisuuteen, sillä NAD⁺ toimii niiden tärkeänä ko-aktivaattorina (Zhang ym. 2020, Covarrubias ym. 2021). Sir-

tuiinit ovat NAD⁺-riippuvaisia entsyymejä, joiden on ehdotettu reagoivan ROS- ja energiatasojen muutoksiin ja säätelevät täten solun metabolisia toimintoja (Wang ym. 2013). Sirtuiinit ovat myös keskeisiä proteiineja vanhenemisen säätelyssä ja pitkäikäisyydessä (X. Chu ja Raju, 2022). Michaelis vakio (K_m) määrittelee sirtuiinien aktiivisuuden riippuvuuden NAD⁺:sta; esimerkiksi SIRT1/3 ovat hyvin riippuvaisia solun hetkellisestä NAD⁺-tasosta (Abdellatif ym. 2021). Sirtuiinit on yksi tutkituimpia lysiinideasetylaasien alaluokkia nisäkkäissä ja yhteensä seitsemän sirtuiinia (SIRT1-SIRT7) on löydetty nisäkkässoluista. Kaikki sirtuiinit eivät kuitenkaan toimi deasetylaasiaktiivisuuden kautta, vaan sisältävät ADP-ribosylaasi (SIRT4) tai desukkiinylaasi -aktiivisuuden (SIRT5). Sirtuiinit yhdistetään vanhenemiseen, sillä niiden geenien yli-ilmentyminen on osoittanut hyödyllisiä vaikutuksia eliniän pidentämisessä useissa hiirimalleissa. (Kauppila ym. 2017)

Taulukko 2. Sirtuiini 3:n keskeisimmät vaikutukset solun energiametaboliaan. Kohdemolekyylit: isositraattidehydrogenaasi 2 (IDH2), mangaanisuperoksididismutaasi (MnSOD), NADH-dehydrogenaasi 1 α alakompleksi 9 (NDUFA9), sukkiinaattidehydrogenaasi alayksikkö A (SDHA) sekä ATP-syntaasialayksikkö O (ATP5O). Aktiivisuudessa + tarkoittaa toiminnan lisäämistä. Suluissa oleva (esim. CI) viittaa elektroninsiirtoketjun kompleksiin, johon alayksikkö sisältyy. Perustuu lähteeseen (Wang ym. 2013).

	Kohdemolekyylit	Aktiivisuus (+/-)	Toiminta	Eläinmalli
SIRTUIINI 3	IDH2	+	TCA-syklin sääntelyn lisääminen	Hiirimalli
	MnSOD	+	ROS:n vähentäminen	Hiirimalli
	NDUFA9 (CI)	+	Edistää OXPHOS	Hiirimalli
	SDHA (CII)	+	Edistää OXPHOS	Hiirimalli
	ATP5O (CV)	+	Edistää OXPHOS	Ihmisen solut

Tutkituin sirtuiini (SIRT1) toimii tumassa. Riippumatta sen pääasiallisesti toimintaympäristöstään, SIRT1 vaikuttaa myös tärkeisiin mitokondrion toimintoihin, kuten mitokondrion biogeneesin PGC1 α :n kautta. Mitokondrion biogeneesin muutokset ovat myös yksi mitokondrion toimintahäiriöistä. SIRT1 edistää pitkäikäisyyttä useissa hiirimalleissa, mutta myös kritisoivia tutkimuksia on esitetty, minkä takia SIRT1 ei pidetä pitkäikäisyyttä määräävänä tekijänä (Wang ym. 2013). (Kauppila ym. 2017)

Mitokondrion proteiinien säätely perustuu sirtuiini-riippuvaan palautuvaan asetylaatioon ja deasetylaatioon. Nisäkkään mitokondrion sirtuiinien (SIRT3-SIRT5) on osoitettu osallistuvan lähes kaikkiin metabolisiin reaktioihin ja homeostaasin säätelyyn mitokondrionissa, mikä suojaa mitokondrioita erinäisiltä vaurioilta (Zhang ym. 2020, Abdellatif ym. 2021). Esimerkiksi SIRT3 estää mahdollisesti vanhenemista kalorirajoituksen kautta, sillä kalorirajoitus korreloi lisääntyneihin

SIRT3-tasoihin hiirien useissa kudoksissa (Wang ym. 2013, Kauppila ym. 2017). Kalorirajoituksen edistämä SIRT3-aktivaatio johtaa myös IDH2:n aktiivisuuden kasvuun. Vastaavasti IDH2 lisää NADP⁺:n pelkistymistä eli vaikuttaa mitokondrion antioksidanttijärjestelmän aktiivisuuteen mtROS:ia kohtaan. SIRT3:a aktivoi useat – osin myös tuntemattomat – epigeneettiset tekijät (miRNA:t ja lncRNA:t), mikä on osoitus vanhenemisen tunnusmerkkien vahvasta integraatiosta. (Wang ym. 2013, Zhang ym. 2020, López-Otín ym. 2023)

Sekvensoinnin avulla on myös löydetty yhteys SIRT3-geenin tehostajajakson ja vanhenemisen välillä; tehostajajakson sekvenssin vaihtelu liittyy iäkkäiden koehenkilöiden eloonjäämiseen (Wang ym. 2013). SIRT3 vaikuttaa myös suoraan elektroninsiirtoketjun kompleksien I, II sekä V toimintaan, vasteena suurempaan energiatarpeeseen vanhenemisessä eli toisin sanoen SIRT3 säätelee ATP-tasoa useissa kudoksissa (taulukko 2) (Ahn ym. 2008, Amorim ym. 2022). Tutkimuksen mukaan ATP:n tuotanto romahti hiirimallin korkean SIRT3-ilmentymän omaavissa kudoksissa (maksat, sydän ja munuaiset), kun deasetylaasiaktiivisuus inaktivoitiin *knockout*-menetelmällä (Ahn ym. 2008). Kliinisten tutkimusten avulla on todistettu, että SIRT3-taso laskee vanhenevassa kudoksessa ja lisäksi vanhenemiseen liittyvissä sairauksissa (Tyypin II diabetes), jotka ovat yhteydessä kohonneeseen oksidatiivisen stressin tilaan. (Wang ym. 2013)

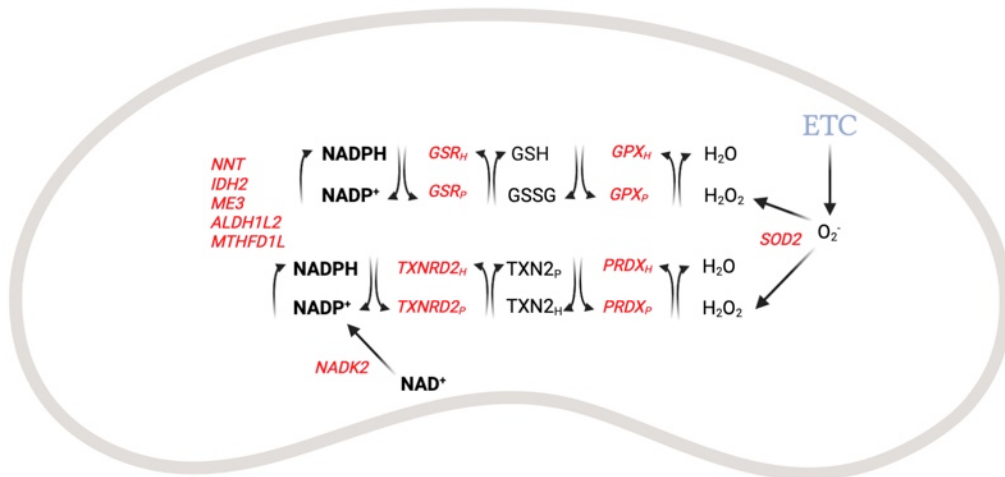
SIRT3:n aktiivisuus vaikuttaa useaan vanhenemiseen liittyvien sairauksien esiintymiseen sekä syövän kehittymiseen, joten sen potentiaalista näyttöä hoitomenetelmänä tutkitaan kiivaasti (Zhang ym. 2020). Lisäksi edellä mainitut lukuisat havainnot SIRT3:n vaikutuksesta eri lajien pitkäikäisyyteen antavat lupaavia tulevaisuuden kuvia. Tulosten mukaan SIRT3:n geeninilmentymien väheneminen solun oksidatiivisen tilan kasvaessa. Havainto viittaa siihen, että myös solun proteiinien asetylaatiotila on siitä riippuvainen. Asetylaatiotilan muutokset edistävät mitokondrion toimintahäiriöiden esiintymistä. NAD⁺-kuluttavia entsyymejä on sirtuiinien lisäksi PARP:it. Vaikka niiden molempien toiminta perustuu NAD⁺-kofaktoreiden kulutukseen, sirtuiinien aktivoinnilla on todettu ainoastaan elinikää pidentäviä vaikutuksia ja vastaavasti PARP:it voivat jopa kiihdyttää vanhenemisen aiheuttamia patofysiologisia solu-, kudoks- ja elinvaurioita. (Wang ym. 2013, Covarrubias ym. 2021)

4.3 NADP⁺ ja NADPH vanhenemisessä

NAD⁺ voi esiintyä myös fosforyloituneessa muodossa NADP⁺, toimien elämälle välttämättömien reaktioiden substraattina ja antioksidanttijärjestelmän säätelijämolekyylinä. NADPH:n keskeisenä tehtävänä solussa on minimoida oksidatiivisen stressin negatiivisia vaikutuksia toimien antioksidanttien ekvivalenttina, mikä estää solukuolemaa, sekä osallistua lipidien anaboliaan hapettavana substraattina (Bradshaw 2019, Covarrubias ym. 2021). Vanhenemisessä solut hyödyntävät kasvavissa määrin glykolyysiä energiantuotannossa, mikä johtuu kyseisen metaboliareitin entsyymien yli-ilmentymisestä vanhenemisessä (tutkimus on tehty ihmisen fibroblasteissa). Glyko-

lyysin kiihdyttäminen vanhenemisessa aktivoi myös pentoosifosfaattireitin, jonka seurauksena syntyy NADPH:ta. NADPH:ta tarvitaan glutationin pelkistämiseen, jotta se voi toimia antioksidanttina ja kompensoida mtROS-välitteistä oksidatiivista stressiä. (Wang ym. 2013)

IDH2:ta pidetään yhtenä tärkeimpänä NADPH:ta muodostavista entsyymeistä monien tutkimustulosten ansiosta; IDH2:n yli-ilmentyminen hiiren fibroblasteissa lisää antioksidanttijärjestelmän hyötysuhdetta ja vastaavasti ihmisen fibroblasteissa *IDH2:n knockdown* lisäsi solun [ROS] sekä laski [NADPH]/[NADP⁺]-tasoja (White ja Someya, 2023). NADPH:ta tuottavien entsyymien geeneistä manipulointia voidaan siis pitää varteen otettavana vaihtoehtona maksimoimaan antioksidanttijärjestelmän hyötysuhde. Erityisen mielenkiintoinen osoitus kohdistuu ilmiöön, joka korreloi hyvin vahvasti vanhenemisen kanssa; IDH2:n puutos johti oksidatiivisen vaurion edistämään kuulonmenetykseen hiirten sisäkorvissa (White ja Someya, 2023).



Kuva 7. (NADPH)-linkittynyt antioksidanttijärjestelmä. Heikentynyt oksidatiivinen fosforylaatio aiheuttaa muutoksia myös kyseisessä antioksidanttijärjestelmässä. [NADP⁺]/[NADPH]-suhteen kasvu on seurausta: (i) NADK2:n aktiivisuuden vähenemisestä, sillä oksidatiivisen fosforylaation häiriön indusoima [NAD⁺] toimii rajoittavana tekijänä sekä (ii) NNT-välitteisen entsyymikatalyyysin vähenemisestä. Tämä aiheuttaa GSR:n ja TXNRD2:n aktiivisuuksien vähenemisen, mikä johtaa hapettuneen tilan kasvuun (GSSG/GSH) -redoxparissa sekä (TXN2_H/TXN2_P) -redoxparissa. Tästä seuraa muun muassa GPX:n aktiivisuuden väheneminen. Antioksidanttijärjestelmän hapettuminen aiheuttaa myös eksogeenisten aineiden (E- ja C-vitamiinin) hapettumisen. Yhdessä nämä tekijät aiheuttavat kohonneen oksidatiivisen stressin tilan ja siten kiihdyttää vanhenemista. Järjestelmän keskeisimmät komponentit (entsyymit punaisella kursivoidulla kirjaimella): NAD(P)⁺-transhydrogenaasi (NNT), glutationireduktaasi (GSR), glutationiperoksidaasi (GPX), tioredoksiinireduktaasi (TXNRD2), tioredoksiini (TXN2) sekä peroksiredoksiini (PRDX). Kuva tehty biorender.com. Perustuu lähteeseen (Bradshaw 2019).

NADPH-tasot laskevat monissa kudoksissa vanhenemisen aikana, mutta vielä ei ole varmistettu, onko sillä kausaaliteettinen vaikutus vanhenemiseen. Tässä välin on hyvä selvittää, että NAD⁺-tasojen lasku (pienentynyt [NAD⁺]/[NADH]) kasvattaa NADP⁺-tasoja (suurentunut [NADP⁺]/[NADPH]) siten, että vanhenemisessä vähentynyt protonigradietti – eli oksidatiivisen

fosforylaation vajaatoiminta – vähentää NNT-välitteistä entsyymireaktiota mitokondrion matriksissa. Oksidatiivisen fosforylaation vajaatoiminta viittaa heikentyneeseen protonigradientin muodostamiseen, ja mitokondrion sisäkalvoon sijoittunut NNT käyttää juurikin tätä energiaa katalyysireaktioonsa: NADH:n ja NADP⁺:n muuntaminen NAD⁺:ksi ja NADPH:ksi (White ja Someya, 2023). NADPH-tasot laskevat vanhenemisessä siis kahden syyn seurauksena: ensisijainen syy on vanhenemiseen liittyvä NAD⁺-tasojen lasku, koska NADK2:n substraattia on vähemmän saatavilla. Lisäksi NADP⁺/NADPH-suhdetta kasvattaa elektroninsiirtoketjun häiriön ja inflammaation edistämä oksidatiivisen stressin tila. (Bradshaw 2019)

Mitokondrion (NADPH)-linkittynyt antioksidanttijärjestelmä on tärkein solun neutralointimekanismi mtROS:ia kohtaan. Yksityiskohtainen toiminta on selitetty kuvassa (kuva 7). Terveissä soluissa [NADP⁺]/[NADPH]-järjestelmä on 99% pelkistyneessä muodossa ja järjestelmä hapettuu asteittain vanhenemisessä. Epätasapainon molekulaarinen pohja ei ole vielä tiedossa, mutta NAMPT:n ja NNT:n tasojen lasku hiirten aivoissa vanhenemisen yhteydessä osoittaa puoltavia merkkejä entsyymien liittymisestä järjestelmän häiriöön. Redox-parien manipulointia on tutkittu myös pitkäikäisyyden saavuttamisen takia. Esimerkiksi NADPH:ta hyödyntävän tioredoksiinireduktaasin (TXNRD2) tasot korreloivat pitkäikäisyyden kanssa jyrksijöissä ja kädellisissä. Havaintoa pidetään potentiaalisena lähtökohtana tutkia antioksidanttijärjestelmän molekyyllitason muutoksien vaikutusta vanhenemiseen. (Bradshaw 2019)

5. GENEETTINEN EHEYS VAURIOITUU REPLIKAATIOKONEISTON VIRHEIDEN TAKIA

MFRTA on kohdannut tiedeyhteisöltä laajaa kritiikkiä ROS-välitteisen oksidatiivisen stressin merkittävydestä vanhenemisen fenotyypin liittyneiden mutaatioiden aiheuttajana (Hekimi ym. 2011). On kuitenkin laaja yhteisymmärrys siitä, että Harmanin MFRTA-teorian pohja – sattumanvaraiset *de novo*- tai somaattiset mtDNA-mutaatiot – kertyvät vanhenemisessä samaan tapaan kuin nDNA:ssa ja muodostavat patofysiologisia ilmiöitä elimistössä (Ziada ym. 2020). Laukaiseva tekijä on vielä tuntematon asia ja uusien kausaaliteettisten suhteiden ymmärrys mtDNA:n mutaatioiden aiheuttajana on laajan tutkimuksen kohteena. Tässä osiossa syvennytään MFRTA:n kehittymiseen kritisoivien tutkimustulosten seurauksena ja käsitellään vaihtoehtoista tekijää – mitokondrion oman replikaatiokoneiston vaurioitumista – mutaatioiden taustalla.

5.1 Mitokondriaalinen DNA (mtDNA)

Genetiikka mahdollisti endosymbioositeorian vahvistamisen, kun löydettiin merkittäviä yhtäläisyyksiä alfaproteobakteerin genomien ja mitokondrion mtDNA:n väliltä (Andrieux ym. 2021). Mitokondriaalinen DNA (mtDNA) on kaksijuosteinen sirkulaarinen molekyyli (16,569 bp), joka sisältää geneettisen informaation eri RNA-lajien synteetille. mtDNA ei sisällä nDNA:n tapaan kromatiinia pakkaavia histoniproteiineja, eikä siten muodosta nukleosomirakenteita. mtDNA:n järjestäytymisestä ja geenien ilmentymisestä vastaa mitokondriaalinen transkriptiotekijä A (TFAM), joka muodostaa mitokondrion nukleoidirakenteita eli pakkautuneita konformeereja. TFAM:lla on myös tärkeä tehtävä suojata mtDNA:ta reaktiivisilta ROS-molekyyleiltä. TFAM sitoutuu mtDNA:han ja vähentää ROS:ien haitallista vuorovaikutusta mitokondrion genomien kanssa. (Larsson 2010, Kauppila ym. 2017, Sharma ym. 2019)

Geneettinen runsaus vaihtelee tuman ja mitokondrion nukleiinihappojen välillä. mtDNA:n geenit ovat hyvin tiheästi pakkautuneet ja mtDNA sisältää ainoastaan yhden ei-koodaavan alueen (~1,1 kb), jota kutsutaan syrjäytyssilmukaksi (engl. Displacement loop, D loop) (Larsson 2010). Geneettisen runsauden suhteesta mtDNA:n kokoon nähden, mitokondrion genomi on erittäin altis mutaatioille, jotka aiheuttavat patofysiologisia haittoja (Lawless ym. 2020). Syrjäytyssilmukka sisältää molempien mtDNA-juosteiden promoottorit ja transkriptioiden aloituskohdat polykristonisten transkriptien muodostusta varten, sekä replikaation aloituskohdan, ORI-alueen (engl. Origin of replication). (Larsson 2010, Sharma ym. 2019)

mtDNA koodaa 13 proteiinia, jotka ovat välttämättömiä oksidatiivisen fosforylaation toiminnalle. Kyseiset proteiinit ovat elektroninsiirtoketjun kompleksien I-IV kriittisiä alayksiköitä (Larsson 2010). mtDNA koodaa 7 alayksikköä NADH-dehydrogenaasi kompleksista (ND1-6, sisältäen molemmat ND4 sekä ND4L), sytokromi c oksidaasin kolme alayksikköä (CO1-3), f_1f_0 ATP:aasin eli ATP-syntaasin kaksi adenosiinifosfaatti alayksikköä (ATP6 ja ATP8) sekä sytokromi B:n (CYB). mtDNA:sta syntetisoidaan myös ribosomaalisia RNA:ita (12S rRNA ja 16S rRNA) sekä 22 tRNA-molekyyliä, joita tarvitaan mtDNA:iden translaatioon. (Larsson 2010, Sharma ym. 2019)

5.2 mtDNA:n genetiikka

mtDNA eroaa merkittävästi nDNA:sta mitokondrion evolutiivisen alkuperän takia. Tästä syystä myös genetiikka eroaa ja se kuinka genotyypin muutokset aiheuttavat erilaisia fenotyyppisiä vanhenemisessa ja siihen liittyvien patofysiologisten tilojen seurauksena (Protasoni ja Zeviani, 2021). mtDNA kahdentuu jokaisen solusyklin aikana nDNA:n tavoin, mutta lisäksi se kykenee jatkuvaan itsenäiseen replikaatioon. (Lawless ym. 2020). mtDNA:n periytyminen tapahtuu maternaalisesti eli jälkeläisen mtDNA on peräisin sen äidiltä. Tämän seurauksena myös äidin mtDNA:n mutaatiot ja mahdolliset sairausgeenit periytyvät yksilöön. (Protasoni ja Zeviani, 2021)

Toinen merkittävä eroavaisuus liittyy mtDNA:n kopiomäärään; tumassa on vain kaksi alleelia kutakin geeniä kohden ja yksinkertaistettuna näiden alleelien välinen dominoiva tai resessiivinen suhde määrää yksilön fenotyypin. Mitokondrion genomi on polyploidinen eli solussa voi olla 1000–10 000 kopiota mtDNA:ta. mtDNA:n genetiikka ei siis noudata Mendelin lakeja periytymissä. mtDNA:n kopioiden sekvenssit voivat olla keskenään homologisia, jolloin ilmiöstä käytetään nimitystä homoplasmia. Vastaavasti sekvenssien emäskoostumus voi vaihdella laajasti polymeeraasien viallisuuden tai ROS-välitteisen DNA:n vaurioiden aiheuttamien mutaatioiden takia ja täten ilmiöstä käytetään nimitystä heteroplasmia. Heteroplasmian esiintyvyydellä on suuri vaikutus patologisten fenotyyppien muodostumisessa. (Protasoni ja Zeviani, 2021)

5.3 Mitokondrion DNA-polymeraasi γ

Nisäkkään mitokondrion DNA-polymeraasi on heterotrimeerinen holoentsyymi (Pol γ), joka koostuu katalyyttisestä alayksiköstä (Pol γ A) sekä dimeerisestä avustavasta alayksiköstä (Pol γ B), jonka tehtävänä on vahvistaa replikaatio prosessia ja Pol γ A katalyyttistä toimintaa. Kompleksi ei sisällä helikaasia, vaan mitokondrion helikaasi (engl. Twinkle helicase) on erillinen proteiini, joka avaa mtDNA:ta 5'3'-suunnassa. Pol γ A sisältää 3'-5' -eksonukleaasiaktiivisuuden, joka tunnetaan myös polymeeraasin oikolukutoimintona (engl. proofreading), jolla on tärkeä tehtävä korjata emäpariutusvirheitä replikaation aikana. Sharma esittää artikkelissaan, että useat tuoreimmat tutkimukset ovat osoittaneet mitokondriossa toimivan muitakin DNA-polymeraaseja, jotka ylläpitävät mtDNA:n eheyttä (DNA-polymeraasi β , PrimPol sekä DNA-polymeraasi θ). Näiden polymeeraasien yhteydestä vanhenemiseen ei ole laajaa kokeellista näyttöä. (Larsson 2010, Sharma ym. 2019)

5.4 DNA-polymeraasi γ vanhenemista kiihdyttävien mutaatioiden aiheuttajana

Tutkimukset ja niistä tehdyt kirjallisuuskatsaukset osoittavat, että mtDNA:n pistemutaatiot ja deleetiot kertyvät vanhenemisessä, mutta näiden yhteydestä vanhenemiseen kiistellään, onko kyseessä kausaliiteettinen yhteys vai korrelaatio (Kauppila ym. 2017). mtDNA:ssa ilmenevä heteroplasmia vaikeuttaa mutaatioiden kausaliiteettisen vaikutuksen arvioimista vanhenemiseen (López-Otín ym. 2023). Ziada ja Kauppila esittävät katsausartikkeleissaan teorian mtDNA:n mutaatioiden syntytavalle, jonka mukaan DNA-polymeraasi γ ja sen toimintahäiriöt replikaation aikana ovat juurisyy mutaatioiden kehittymiselle (Kauppila ym. 2017, Ziada ym. 2020). Hiirimalleissa, joilla toimii puutteellinen DNA-polymeraasi γ , on yhteys kiihtyneeseen vanhenemiseen ja lyhentyneeseen elinikään (López-Otín ym. 2023). Laajimmin *in vivo* ja *in vitro* tutkittu oksidatiivinen vaurio mtDNA:ssa on guaniinin kohdentunut vaurio (8-okso-dG) ja se edistää transversio mutaatioiden kehittymiselle ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$ tai $G \leftrightarrow T$) (Kudryavtseva ym. 2016).

Useat tutkimukset ovat kuitenkin todistaneet, etteivät oksidatiivisen stressin indusoimat transver-sio mutaatiot vanhenemisessä edusta enemmistöä koko mutaatiopoolissa, vastaavasti transitio mutaatiot (A ↔ G ja C ↔ T) ovat dominoivana edustajana (Lawless ym. 2020, Ziada ym. 2020). Tämän havainnon uskotaan olevan merkittävä osoitus siitä, ettei oksidatiivinen stressi ole pääasiallinen aiheuttaja vanhenemisessä mtDNA:han kertyneille mutaatioille. Tällä hetkellä uskotaan, että mitokondriossa ominaisen toimivan proteiinien, DNA-polymeraasi γ :n, viallisuus oikolu-kutoiminnossa on mitokondrion toimintahäiriöiden laukaiseva tekijä (Kauppila ym. 2017). Havainnot heikentävät myös noidankehäteorian pohjaa (Wang ym. 2013). Se ei kuitenkaan poista näkemystä, etteikö ROS-välitteinen oksidatiivinen stressi voisi vahingoittaa DNA-polymeraasien toimintaa ja sitä kautta vaikuttaa mutaatioiden kehittymiseen (Ziada ym. 2020). (Kauppila ym. 2017)

Vaikka hiirimalleilla tehdyt tutkimukset osoittavat kausaliiteettisen yhteyden DNA-polymeraasi γ :n heikentyneen toiminnan ja ennenaikaista vanhenemistä kiihdyttävien mutaatioiden välillä, saadut tulokset ja MTFRA:aa tukevat päätelmät ovat herättäneet myös kritiikkiä. Wang mukaan, kritisointi kohdistuu siihen, että mutaatioista aiheutuneet patologiset muutokset eivät ole luonnollisen vanhenemisen aiheuttamia. Lisäksi mtDNA-mutaatioiden määrät hiirimallien eri kudoksissa ovat kohtuuttoman suuria (Wang ym. 2013). Hiirimalleilla ei ole myöskään kunnollista kokeellista näyttöä, vaikuttaako mtDNA:n korjausmekanismien lisääminen elinikään tai vanhenemisen etenemiseen (López-Otín ym. 2023). Lisäksi mutaatioiden määrä normaaleissa vanhenevissa kudoksissa on alle mitokondrion toimintahäiriöitä aiheuttavan kynnsarvon (Kauppila ym. 2017, Amorim ym. 2022). Kyseisen teorian suurimmaksi arvoitukseksi jää, onko mtDNA-mutaatioiden kertymisellä merkittävä rooli luonnollisen vanhenemisen kanssa vai onko niillä yhteys vain keinotekoisesti luotujen sairauksien ja siitä aiheutuvan ennenaikaisen vanhenemisen kanssa. (Wang ym. 2013)

5.5 mtDNA-mutaatioiden kertyminen solussa

Satunnaisesti hankitulla mtDNA:han kohdistuneella mutaatioilla on kaksi kohtaloa: mutaatio voi kadota solusta vähitellen peräkkäisten replikaatiosyklien seurauksena tai monistua klonaalisesti (Kauppila ym. 2017, Lawless ym. 2020). mtDNA:n mutaatioiden ensisijaisena aiheuttajana pidetään DNA-polymeraasi γ :n toiminnanhäiriöitä replikaation aikana. Lisäksi MFRTA:n uskotaan kiihdyttävän mtDNA:n epästabiliutta ja siten aiheuttavan mitokondrion toimintahäiriöitä. Kyseiset teo-riat eivät kuitenkaan anna kokonaisvaltaista selitystä vanhenemiseen liittyvien mtDNA:n mutaatioiden kertymiselle yksittäisessä solussa. Paynen hypoteesin mukaan vanhenemiseen liittyvät mtDNA-mutaatiot eivät kerääny kronologisesti, vaan mitokondrion klonaalinen laajentuminen (engl. clonal expansion) toimii kiihdyttävänä tekijänä (Ziada ym. 2020). (Lawless ym. 2020)

Klonaalisen laajentumisen ymmärrystä vanhenemisessä monimutkaistaa kaksi tekijää: eroavaisuudet mitokondrion pistemutaatioiden ja deleetioiden sekä mitoottisten ja post-mitoottisten solujen välillä. Esimerkiksi mtDNA:n pistemutaatioiden muodostama kertymä on tyypillisempää mitoottisissa soluissa, ja vastaavasti deleetit ovat tyypillisempiä postmitoottisissa soluissa eli soluissa, jotka eivät kykene enää jakautumaan. (Lawless ym. 2020)

mtDNA-mutaatiotiheyden kynnsarvon saavuttaminen on välttämätöntä energiametabolian toimintahäiriön kehittymiselle vanhenemisessä (Kauppila ym. 2017). Mitokondriotutkijat ovat pyrkineet selvittämään, kohdistuuko minkäänlaista valintapainetta viallisille, mutaatioiden omaaville mitokondrioille vai onko mutaatioiden kertyminen solussa ainoastaan sattumanvaraista. Todisteet osoittavat, että mtDNA:n pistemutaatioiden kertyminen noudattaa satunnaisen geneettisen ajautumisen -teoriaa – teoria ei kuitenkaan päde deleetioille. (Larsson 2010, Lawless ym. 2020)

Deleetioille on luotu omat vaihtoehtoiset teoriat. Ensimmäisen teorian mukaan valintapaine kohdistuu yksilöihin, joissa on deleetion aiheuttama pienempi mitokondriogenomi ja siten aiheuttaa nopeamman replikoitumisen ja kyseisen mtDNA-kloonin dominanssin solussa. Toisen teorian mukaan deletoitunut mtDNA tuottaa vähemmän proteiinituotteita, jotka normaalisti inhiboivat omaa transkriptiota ja replikaatiota. Tämä aiheuttaa DNA-polymeraasi γ :n aktiivisuuden kasvun ja kasvattaa replikaatiotiheyttä. Lisäksi on ehdotettu, että ATP- tai $[NAD^+]/[NADH]$ -tasojen muutokset voivat indusoida samanlaisia takaisinkytkentämekanismejä. On hyvä huomioida, että teorioita on muitakin, eikä mikään niistä ole saanut yhdenmukaista vastaanottoa. (Larsson 2010, Lawless ym. 2020)

6. YHTEENVETO

Vanheneminen on meitä jokaista koskeva ilmiö, mikä voi olla osittain tai kokonaan parannettavissa tulevaisuudessa. Mitokondrion toimintahäiriöt on yksi vanhenemisen tunnusmerkeistä, joka on osoittanut merkittäviä kokonaisvaikutuksia solun fysiologiassa, kuten oksidatiivisen fosforylaation häiriintymisessä (Hekimi ym. 2011, Ziada ym. 2020, López-Otín ym. 2023). Mitokondrion toimintahäiriöt eivät ole itsenäisiä kokonaisuuksia, vaan ne integroituvat myös muihin vanhenemisen tunnusmerkkeihin, kuten genomiseen epästabiiliuuteen, epigenetiikan muutoksiin sekä ravintoainesignalointiin – vuorovaikutussuhteiden molekulaarinen ymmärrys on vielä kuitenkin heikkoa (Wang ym. 2013, Bradshaw 2019, Zhang ym. 2020, López-Otín ym. 2023).

Tässä kirjallisuuskatsauksessa perehdyttiin mitokondrion energiametabolian toimintahäiriöihin, joita esiintyy normaalin vanhenemisen yhteydessä. Aihetta lähestyttiin teorioiden (vapaiden radikaalien teoria vanhenemisessä sekä mitokondrion replikaatiokoneiston toimintahäiriöt mtDNA:n mutaatioiden taustalla) näkökulmasta, joiden tarkoituksena on selvittää mutageneesin ensisijainen aiheuttaja. Teorioiden todentaminen perustuu korrelaatioiden ja kausaliiteettien tutkimiseen ja analysointiin, minkä takia saadaan hyvinkin ristiriitaisia tuloksia useissa eri eläinmaleissa (Wang ym. 2013, Kauppila ym. 2017). Tilastollisten analyysien tulokset ovat hyvin alttiita tutkimusasetelman ja näkökulman muutoksille, mistä johtuukin eriävät havainnot. Lisäksi kirjallisuuskatsauksessa syvennyttiin monimutkaisiin molekyyllitason säätelyjärjestelmiin, jotka ovat mahdollisesti vanhenemisen fenotyyppissä ilmentyvien ilmiöiden taustalla.

Mitokondrion energiametabolian homeostaasi kulminoituu oksidatiivisen stressin (mtROS-ylikuormitus) sekä sitä neutralisoivan antioksidanttijärjestelmän tasapainoiseen toimintaan (Sies 2015). Merkittävin solun antioksidanttijärjestelmä on (NADPH)-linkittynyt antioksidanttijärjestelmä, johon sisältyy myös monet mitokondrion antioksidanttientsyymeistä (esimerkiksi SOD2 sekä GP_x) (Bradshaw 2019). Solun homeostaasi voi kohdata epätasapainon ja synnyttää oksidatiivisen stressin tilan, mikä tuhoaa solun makromolekyylejä, esimerkiksi mtDNA:ta (Hekimi ym. 2011, Sies 2015). Noidankehäteoria aiheuttaa ilmiön kiihtymistä, sillä mtDNA sisältää materiaalia oksidatiivisen fosforylaation kompleksien alayksiköiden synteesille (Larsson 2010, Sharma ym. 2019, Ziada ym. 2020). Edellä mainitut kaksi teoriaa keskittyvät mtDNA:n mutageneesin laukaisen tekijän määrittämiseen, sillä vanhenemisessä mtDNA-mutaatioiden kertyminen soluun aiheuttaa mitokondrion toimintahäiriöitä (Wang ym. 2013, Kauppila ym. 2017). Tämän hetkisen käsityksen mukaan DNAPol γ :n oikolukutoiminnon häiriöitä pidetään ensisijaisena tekijänä ilmiön taustalla (Ziada ym. 2020).

Mitokondrion eheän energiametabolian säätelytekijänä toimivat [NADP⁺]/[NADPH]- ja [NAD⁺]/[NADH]-tasot sekä sirtuiinit (SIRT3). Kirjallisuuskatsauksessa selvitettiin molekyylien (koentsyymit NADH ja NADPH sekä SIRT3) välisiä yhteyksiä, ja miten vanheneminen liittyy niiden tasojen muutoksiin. Lukuisten eläinmalleilla – sekä osin ihmisillä – tehtyjen tutkimusten mukaan koentsyymeillä sekä sirtuiineilla on todettu tasojen tai aktiivisuuden asteittaista vähenemistä vanhenemisen myötä (Bradshaw 2019, Covarrubias ym. 2021, X. Chu ja Raju, 2022). On tärkeää ymmärtää, kuinka tiiviissä yhteydessä näiden molekyylien tasojen sekä aktiivisuuden laskut ovat; NADP⁺:ta voidaan fosforyloidia NAD⁺:sta, ja sirtuiinit käyttävät kofaktorinaan NAD⁺:aa (Wang ym. 2013, Bradshaw 2019, Covarrubias ym. 2021). Tämän vuoksi varsinkin NAD⁺:n tutkimus patofysiologiassa sekä vanhenemisessä on suuren kiinnostuksen alaisena.

Vaikka vanhenemisen biologian ymmärrys on vielä alkutekijöissä, tutkimusalan kehityksessä on näkyvissä suurta potentiaalia ihmisen terveyden parantamiseksi. Tällä hetkellä on esitetty 12 biologista vanhenemistä ohjaavaa tunnusmerkkiä, mutta luku voi vielä kasvaa tai vastaavasti vähentyä tulevaisuudessa. Hyvänä esimerkkinä voidaan pitää López-Otín:in kattavia artikkeleita, sillä vain 10 vuodessa on löydetty kolme uutta, lupaavaa vanhenemisen tunnusmerkkiä (López-Otín ym. 2013, López-Otín ym. 2023). Syövän kattavat tunnusmerkit on tiedostettu jo aikaisemmin ja siten syöpähoidot ovat kehittyneet valtavasti – sama lienee tapahtuvan myös vanhenemiselle tulevaisuudessa.

7. LÄHDELUETTELO

Abdellatif M, Sedej S ja Kroemer G (2021). NAD⁺ Metabolism in Cardiac Health, Aging, and Disease. *Circulation*, 144(22), 1795–1817. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056589>

Ahn B-H, Kim H-S, Song S ym. (2008). A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14447–14452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803790105>

Amorim JA, Coppotelli G, Rolo A ym. (2022). Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nature Reviews. Endocrinology*, 18(4), 243–258. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7>

Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E ym. (2021). Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms222111338>

Bradshaw PC (2019). Cytoplasmic and Mitochondrial NADPH-Coupled Redox Systems in the Regulation of Aging. *Nutrients*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nu11030504>

Chu X ja Raju RP (2022). Regulation of NAD⁺ metabolism in aging and disease. *Metabolism*,

126, 154923. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154923>

Chu X-Y, Wang G ja Zhang H-Y (2021). ATP as an anti-aging agent: Beyond the energy reservoir. *Drug Discovery Today*, 26(12), 2783–2785. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.022>

Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A ym. (2021). NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x>

Díaz-Casado ME, Quiles JL, Barriocanal-Casado E ym. (2019). The Paradox of Coenzyme Q10 in Aging. *Nutrients*, 11(9), 2221. <https://doi.org/10.3390/nu11092221>

Hekimi S, Lapointe J ja Wen Y (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.008>

Kauppila TES, Kauppila JHK ja Larsson N-G (2017). Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metabolism*, 25(1), 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.017>

Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA ym. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879–44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>

Larsson N-G (2010). Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 683–706. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060408-093701>

Lawless C, Greaves L, Reeve AK. ym. (2020). The rise and rise of mitochondrial DNA mutations. *Open Biology*, 10(5), 200061. <https://doi.org/10.1098/rsob.200061>

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L ym. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L ym. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

Miwa S, Kashyap S, Chini E ym. (2022). Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(13). <https://doi.org/10.1172/JCI1158447>

Protasoni M ja Zeviani M (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>

Raamsdonk JMV ja Hekimi S (2009). Deletion of the Mitochondrial Superoxide Dismutase sod-2 Extends Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics*, 5(2), e1000361. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000361>

Schniertshauer D, Gebhard D ja Bergemann J (2018). Age-Dependent Loss of Mitochondrial Function in Epithelial Tissue Can Be Reversed by Coenzyme Q10. *Journal of Aging Research*, 2018, 6354680. <https://doi.org/10.1155/2018/6354680>

Sharma N, Pasala MS ja Prakash A (2019). Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(8), 668–682. <https://doi.org/10.1002/em.22319>

Sies H (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

Stamerra CA, Di Giosia P, Giorgini P ym. (2022). Mitochondrial Dysfunction and Cardiovascular Disease: Pathophysiology and Emerging Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, e9530007. <https://doi.org/10.1155/2022/9530007>

Wang C-H, Wu S-B, Wu Y-T ym. (2013). Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging. *Experimental Biology and Medicine*, 238(5), 450–460. <https://doi.org/10.1177/1535370213493069>

White K ja Someya S (2023). The roles of NADPH and isocitrate dehydrogenase in cochlear mitochondrial antioxidant defense and aging. *Hearing Research*, 427, 108659. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2022.108659>

Zhang J, Xiang H, Liu J ym. (2020). Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics*, 10(18), 8315–8342. <https://doi.org/10.7150/thno.45922>

Ziada AS, Smith M-SR ja Côté HCF (2020). Updating the Free Radical Theory of Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.575645>