



ФАКУЛЬТЕТ  
БИОИНЖЕНЕРИИ И  
БИОИНФОРМАТИКИ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА

*teach-in*  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ МИТОХОНДРИЙ

ЗИНОВКИНА Л. А.  
КАМЕНСКИЙ П. А.  
ФЕНЮК Б. А.

—  
ФББ МГУ

—  
КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН  
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ  
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ  
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.  
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ  
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ  
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,  
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,  
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ  
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА  
СТУДЕНТКУ ГЕОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ  
**ГИРЕНКО ЕЛЕНУ ЮРЬЕВНУ**



## Содержание

<b>Лекция 1. Структура и происхождение митохондрий</b> .....	4
1.1. Краткая история изучения митохондрий .....	4
1.2. Биохимия дыхания.....	5
1.3. Структура митохондрий.....	6
1.4. Энергетическая функция митохондрий.....	8
1.5. Не-энергетические функции митохондрий.....	10
<b>Лекция 2. Регуляторные участки мтДНК</b> .....	27
2.1. Регуляторные участки мтДНК.....	27
2.2. Модели репликации мтДНК .....	36
<b>Лекция 3. Ферменты, участвующие в репликации в митохондриях</b> .....	41
3.1. Ферменты, участвующие в репликации в митохондриях.....	41
3.2. Метод Mito-SMARD. ....	45
<b>Лекция 4. Метилирование митохондриальной ДНК</b> .....	52
4.1. Метилирование мтДНК.....	52
4.2. Взаимосвязь экспрессии ядерных и митохондриальных генов .....	62
<b>Лекция 5. Репарация мтДНК</b> .....	68
5.1. Мутации в мтДНК .....	68
5.2. Репарационные системы митохондрий .....	71
<b>Лекция 6. Репарация и транскрипция мтДНК</b> .....	84
6.1. Репарация однонитевых повреждений в мтДНК.....	84
6.2. Транскрипция мтДНК .....	92
<b>Лекция 7. Процессинг митохондриальных РНК</b> .....	108
7.1. Транскрипция митохондриальных РНК.....	108
7.2. Регуляция уровня мт-мРНК.....	114
7.3. Процессинг мт-рРНК.....	118
<b>Лекция 8. Митохондриальная трансляция. Импорт биомакромолекул в митохондрии</b> .....	120
8.1. Митохондриальная трансляция.....	120
8.2. Импорт биологических макромолекул в митохондрии .....	127
<b>Лекция 9. Импорт белков</b> .....	131
9.1. Импорт белков .....	131
9.2. Импорт РНК в митохондрии .....	134

## Лекция 1. Структура и происхождение митохондрий

### 1.1. Краткая история изучения митохондрий

Зачастую прорывы в биологии связаны с прорывами в физике. После появления первых микроскопов, когда люди довольно быстро разобрались в вопросе оптики – появился предел разрешения оптической микроскопии, который составляет примерно длину волны видимого света (0,5 микрон). После этого в биологии было открыто клеточное ядро, появилась клеточная теория. Помимо ядра в клетках эукариотов (млекопитающих, растений и т.д.) существуют еще и другие структуры (которые были названы «биобласты»).

- 1840-1890: первые наблюдения;
- 1890: Рихард Альтман вводит термин «биобласты» для цитоплазматических структур, напоминающих бактерий и обнаруживаемых в самых различных эукариотических клетках.

Книга Рихарда Альтмана до сих пор представляет значительный интерес. На рисунке 1.1. показаны клетки печени лягушки и клетки мышцы крыла насекомых. Позже «биобласты» стали называть «митохондриями».

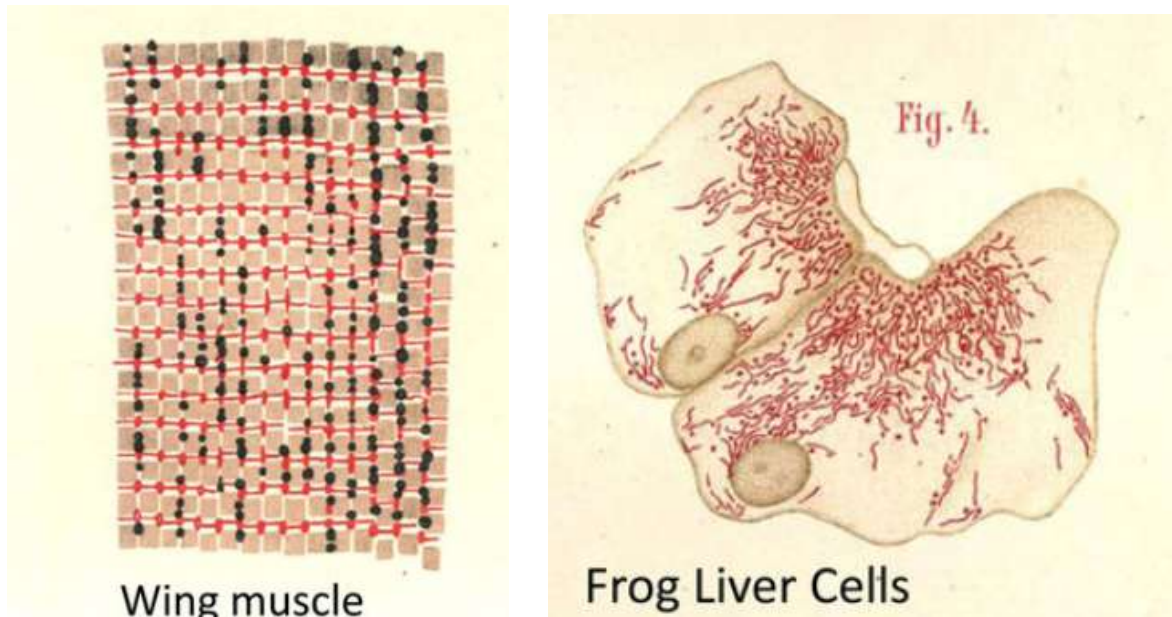


Рис. 1.1. Митохондрии (Рисунки из «Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen». Altmann, R. 1890. Veit, Leipzig)

Название митохондрия происходит от греческого *μίτος* – нить, *χόνδρος* – зёрнышко, крупинка

- В 1913 году немецкий ученый Warburg O. Экспериментально показал, что именно митохондрии отвечают за поглощение кислорода (Warburg O. (1913) Über sauerstoffatmende Körnchen aus Leberzellen und über Sauerstoffatmung in Berkefeld-Filtraten wässriger Leberextrakte, Pflüg Arch. 154: 599-617.)

- В 1930-32 гг. Владимир Энгельгардт экспериментально доказал образование АТФ из АДФ и фосфата за счет энергии, освобождающейся при окислении органических веществ в процессе клеточного дыхания.
- 1939: введен термин «Окислительное фосфорилирование» (Белицер Б. А., Цыбакова Е.Т. О механизме фосфорилирования, сопряженного с дыханием. Биохимия, 1939, т. 4, стр. 516.).

В военное время изучение митохондрий прервалось, однако затем продолжилось с появлением такого прибора у физиков, как высокоскоростные центрифуги, которые позволяют разделить по плотности клеточные фракции в определенный интервал времени – люди учатся делить клетку на фракции (ядер, клеточных мембран, митохондрий):

- 1946: Выделение и очистка митохондрий. (Claude A (1946) Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation: I. Problems, methods, and preparation of extract. J Exp Med 84: 51-89.)
- 1948-1949: Митохондрии могут окислять субстраты дыхания и вырабатывать АТФ.

## 1.2. Биохимия дыхания

Митохондрии захватывают богатые энергией субстраты (жирные кислоты, пируват, аминокислоты) из цитоплазмы.

В митохондриях в цикле Кребса углеродные атомы углеводов, жирных кислот и аминокислот окисляются до  $CO_2$ , а полученные таким образом электроны используют для образования  $NADH$ .

Примечание: Никотинамидадениндинуклеотид ( $NADH$ ) — кофермент, имеющийся во всех живых клетках.

$NADH$  окисляется молекулярным кислородом с образованием воды. Химическая энергия, выделяющаяся при этом, используется для синтеза АТФ из АДФ и фосфата.

Окисленный  $NAD^+$  восстанавливается до  $NADH$ , присоединяя два электрона и один протон. Затем, электроны от  $NADH$  попадают на кислород с образованием воды.

На рисунке 1.3 показан цикл Кребса – последовательная цепочка реакций, в которую входит пируват, происходят превращения. В некоторых реакциях цикла происходит восстановление  $NAD^+$  до  $NADH$ .

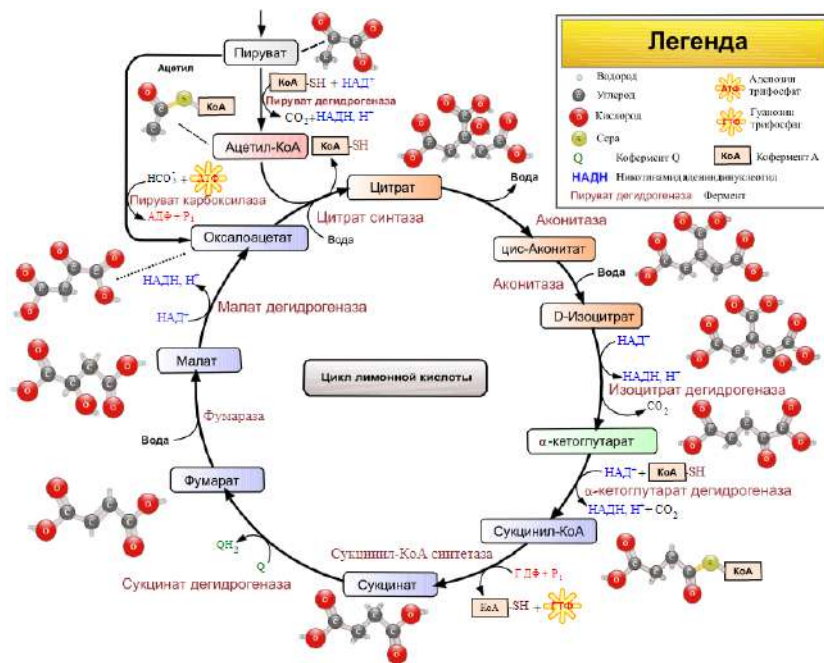


Рис. 1.2. Цикл Кребса

При окислении дыхательных субстратов происходит восстановление *NADH*. Рассмотрим структуру, при которой энергия окисления субстратов и *NADH* используется для синтеза АТФ.

### 1.3. Структура митохондрий

С изобретением электронного микроскопа была преодолена разрешающая способность оптического микроскопа: возможность наблюдения объектов в несколько нанометров.



Рис. 1.3. Митохондрия. Из атласа «The Cell», Don W. Fawcett (1981, Hardcover)

Для получения электронной микрофотографии была взята клетка, залитая твердой смолой, и нарезана на тонкие слои. Форма митохондрий на рисунке 1.4 получена в результате таких разрезов на тонкие слои, однако реально митохондрии выглядят, как рисовал их Альтманн.

На рисунке 1.4 видно, что митохондрии имеют две мембраны: внешнюю мембрану, отделяющую от цитоплазмы, и внутреннюю мембрану. Внутренняя мембрана многократно сморщена, и образует так называемые *кristы*, а внешняя мембрана гладкая. Ферменты, осуществляющие окисление *NADH* и дальнейший перенос электронов на кислород, расположены во внутренней мембране митохондрий.

В мембране митохондрий присутствуют белки, один из которых умеет окислять *NADH* и передавать электроны на промежуточный носитель *Q*, который переносит их на следующий белок. Далее электроны переносятся на белок *Cyt c* и приходят к белку, который работает с кислородом. Во всех трех реакциях выделяется энергия, которая запасается не в виде вещества, а в виде «*электрохимического градиента*». Т.к. мембрана представляет собой диэлектрик, то при переносе заряженных частиц через слой диэлектрика – возникает разница потенциала. В случае митохондрий отрицательный потенциал находится внутри. Этот заряд – значительный: разность потенциалов с разных сторон мембран составляет около 180 мВ. Толщина мембраны 6-8 нм – на таком расстоянии разница потенциалов в 180 мВ создает огромную напряженность электрического поля. Энергия разности потенциалов, а так же энергия разности концентраций ионов водорода используется для последнего шага в энергопроизводящей функции митохондрий – синтеза АТФ. Еще один фермент АТФ-синтаза, позволяющий протонам проходить обратно в митохондрию. Этот фермент устроен так что он пропускает протоны только сопрягая протонный транспорт с синтезом АТФ, для которого необходима энергия.

Энергия электрического поля и градиент концентрации используется ферментом АТФ-синтаза для того, чтобы восстанавливать АТФ для того, чтобы клетка могла использовать его где-то еще.

*Основные пункты:*

- 1) Митохондрии дышат, дыхание разделено на биохимический цикл в матриксе и окисление *NADH* во внутренней мембране с образование электрической разности потенциалов.
- 2) Синтез АТФ.

Внутренняя мембрана митохондрий электрически заряженная, что автоматически означает, что она не проницаема для ионов. Для того, чтобы проходили протоны существует АТФ-синтаза, а другие белки обменивают нуклеотиды и др.

Пространство между мембранами по составу близко к цитоплазме: по низкомолекулярным соединениям одинаково. Во внешней мембране есть большие поры, через которые проходят ионы, АТФ, низкомолекулярные соединения и мелкие белки. Большие белки не проходят, поэтому белковый состав межмембранного пространства отличается от состава цитоплазмы.

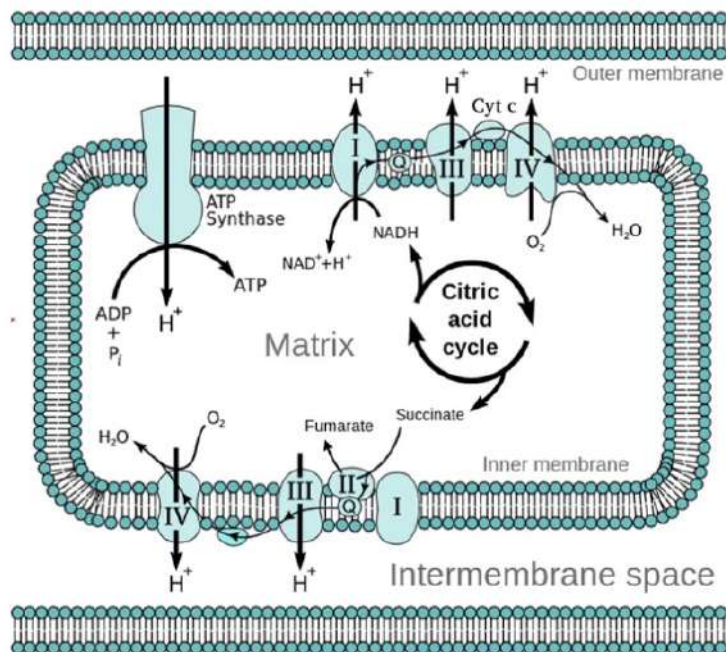


Рис. 1.4. Процессы, происходящие в митохондри

*Недочеты рисунка, показанные преподавателем: реально внешняя мембрана замкнутая; внутренняя мембрана имеет кристы, которые не нарисованы.*

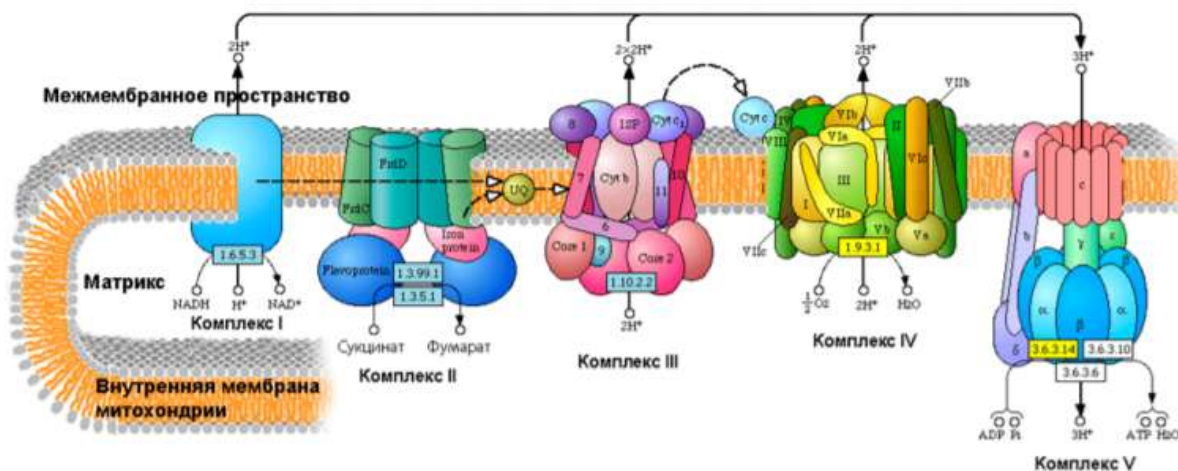


Рис. 1.5. Ферменты дыхательной цепи

### 1.4. Энергетическая функция митохондрий

В клетке зрительного эпителия много митохондрий. Это необходимо, потому что зрение является основным каналом информации о внешнем мире. Зрительные клетки устроены таким образом, что, получив «стимул», они дают разряд и посылают в мозг сигнал. Для того, чтобы получить следующий сигнал им нужно вернуться в исходное возбудимое состояние. Для этого необходимо много энергии.



Скорость, с которой возбудимая клетка возвращается в исходное положение, имеет большое значение, потому что это так называемое *разрешение* зрительного аппарата по времени (сколько кадров в секунду может распознавать организм). Отслеживание быстрых движений – один из важнейших компонентов выживания в мире.

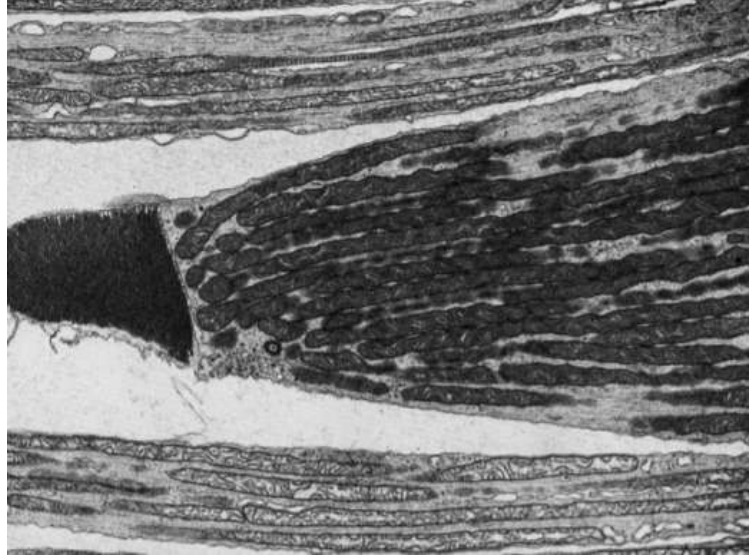


Рис. 1.6. Клетка зрительного эпителия

На рисунке 1.7 показана сердечная мышца кошки. Митохондрии дают АТФ для мышечных сокращений.

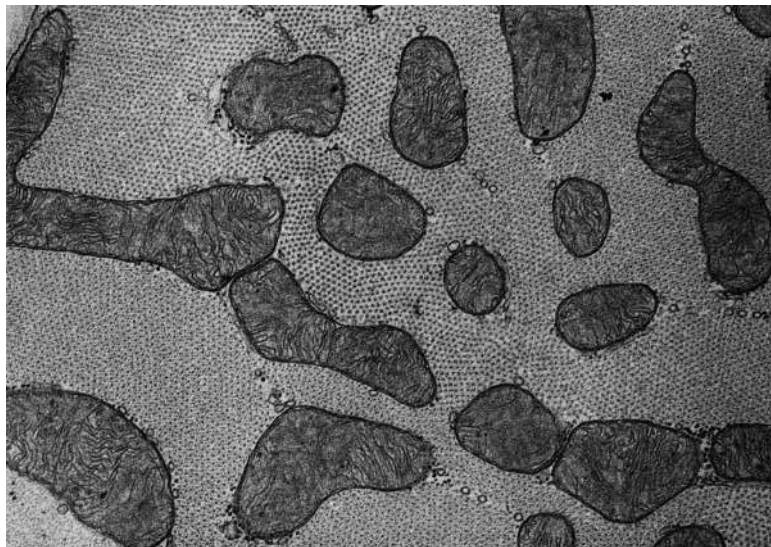
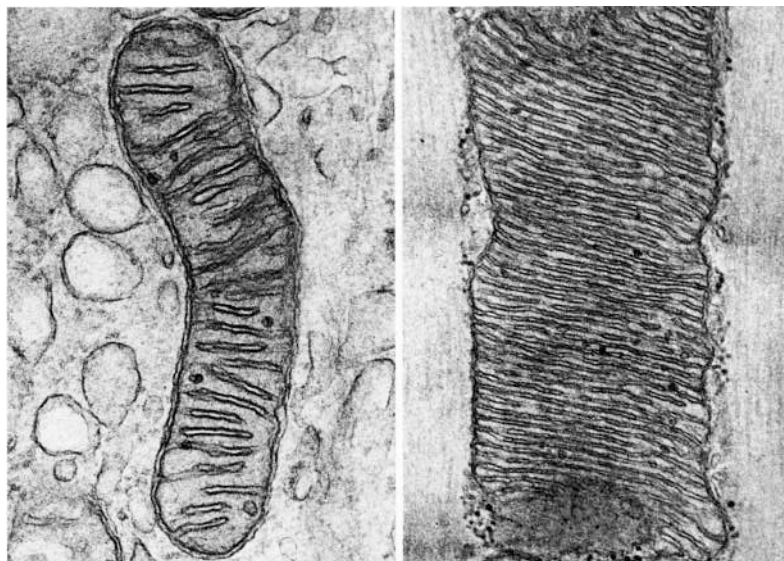


Рис. 1.7. Клетка сердечной мышцы (Из атласа «The Cell», Don W. Fawcett (1981, Hardcover) ISBN-10: 0721635849)

Количество ферментов дыхательной цепи можно нарастить за счет большего количества крист. Слева на рисунке 1.9. показана клетка эпителия, где не требуется больших энергетических затрат; кристы у нее расположены довольно редко. Справа показана клетка мышцы, в которой требуется достаточно много АТФ, что предполагает

большое количество митохондрий. Производительность такой митохондрии гораздо выше.



Клетка эпителия

Клетка мышцы

Рис. 1.8. (Из атласа «The Cell», Don W. Fawcett (1981, Hardcover))

Таким образом, митохондрии имеют следующую структуру: две мембраны, во внутренней мембране образуются кристы, находятся белки дыхательной цепи (АТФ-синтаза), в цикле Кребса белки окисляют  $NADH$  и создают разность потенциалов между матриксом и межмембранным пространством (цитоплазмой). Эта энергия используется для синтеза АТФ: на вход подается кислород, выход: АТФ + продукты распада.

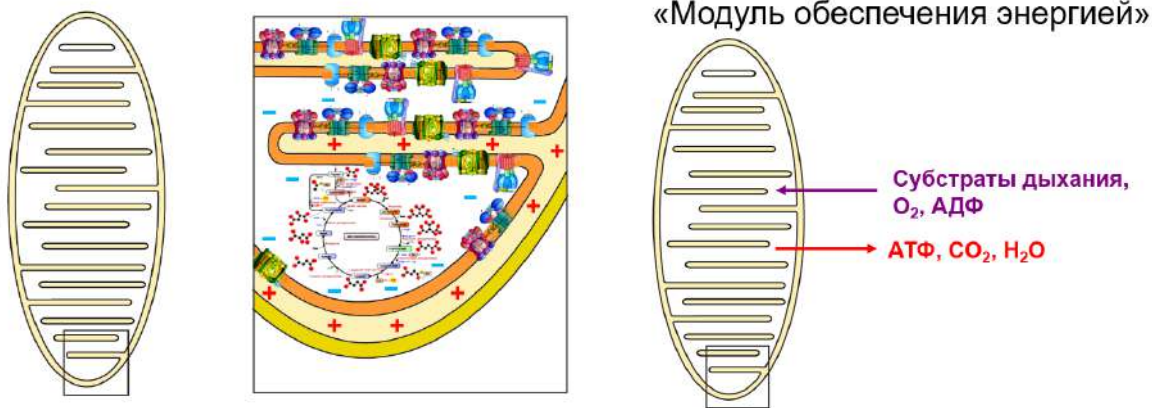


Рис. 1.9. Структура митохондрии

Рис. 1.10. Модуль обеспечения энергией

### 1.5. Не-энергетические функции митохондрий

Не-энергетическими функциями митохондрий являются:

- 1) Программируемая клеточная гибель.
- 2) Синтез FeS-кластеров.
- 3)  $Ca^{2+}$  – регуляция.

## Программируемая клеточная гибель.

Помимо энергетической функции у митохондрий существуют и другие. Неэнергетической функцией митохондрий является *программируемая клеточная гибель*.

На рисунке 1.11 зеленой показана митохондрия, фиолетовым цветом – ядро. В клеточной мембране присутствуют молекулы-рецепторы, которые в ответ на сигналы снаружи запускают каскад изменений во внутриклеточных белках (*каспазах*), и затем передаются в митохондрию или напрямую на другие каспазы цитоплазмы. В итоге сигнал передается в ядро. Правый путь называется внешним, левый путь называется внешним-митохондриальным.

Кроме того, митохондрии способны запустить каскад сами (без сигнала снаружи). Например, в ответ на мощный стресс (ультрафиолетовое излучение и др.).

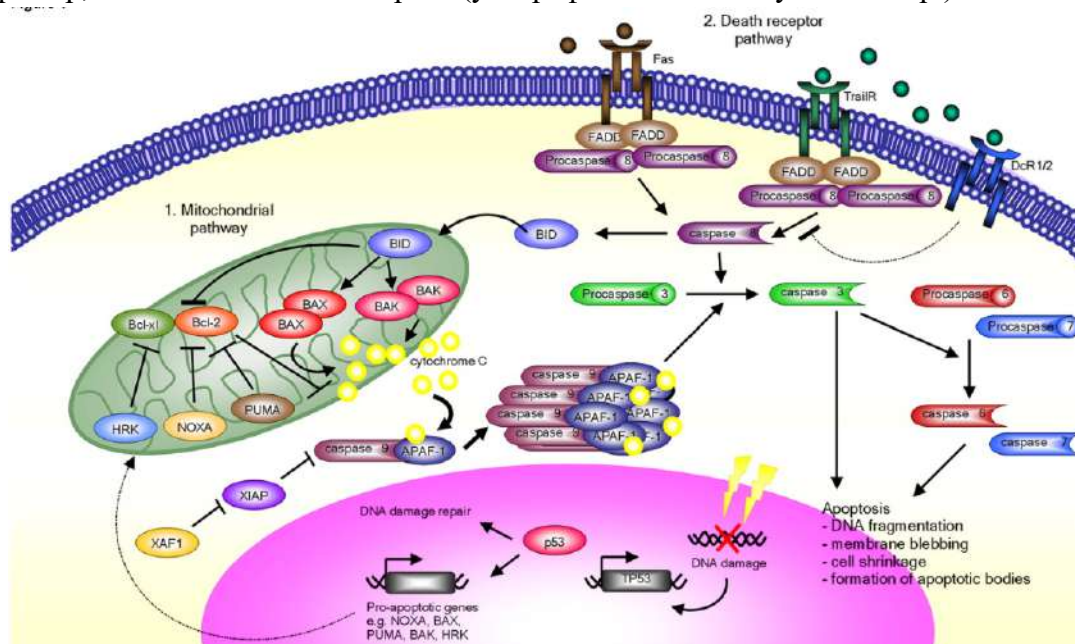


Рис. 1.11. Схема каскада программируемой гибели

На рисунке 1.12 показаны два варианта программируемой клеточной гибели.

Первый вариант – *апоптоз*: в ответ на некий сигнал клетка претерпевает внутри себя разрушительные процессы и разбивается на мелкие части, упакованные в мембранные пузырьки, которые потом поедаются другими клетками. В момент, когда образуются пузырьки, меняются свойства клеточной мембраны и на них появляются сигнальные молекулы, которые дают клеткам-фагоцитам сигнал.

Второй вариант – *некроз*: в ответ на некий стимул клетка разрушается (лопается мембрана, разваливается ядро, рушатся цитоплазматические структуры). Это дает многоклеточному организму сигнал «тревоги». На появление внутриклеточных тел в кровотоке наш организм реагирует воспалением. Такой процесс считается патологией, поэтому организм считает необходимым мобилизовать иммунную систему, поднимать температуру, начинать экспрессировать различные белки, свидетельствующие об

инфекционном заражении и мобилизоваться на борьбу с патогеном. Такой вариант (некроза) задействован при разнообразных болезнях, вирусных инфекциях – когда, умирая, клетка сигнализирует организму об угрозе.

Таким образом, есть две функции программируемой клеточной гибели:

- 1) Замена клеток.
- 2) Ответ на вторжение патогенов.

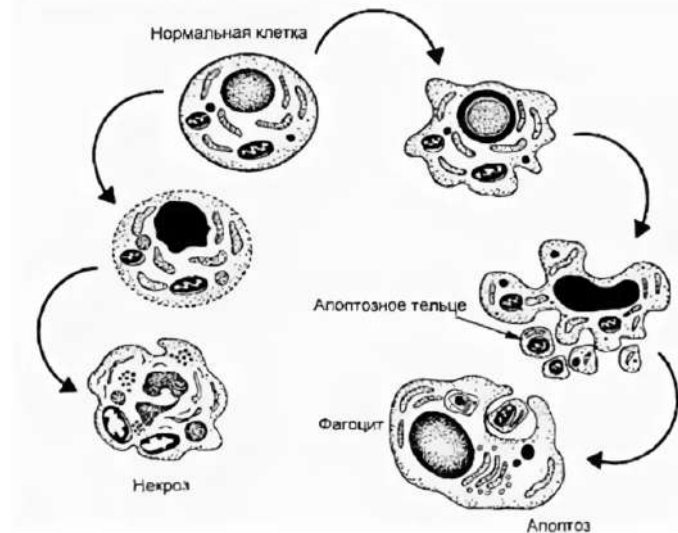


Рис. 1.12. Две функции программируемой клеточной гибели

### Синтез FeS-кластеров.

Помимо программируемой клеточной гибели митохондрии играют важную роль в процессе сборки FeS-кластеров и гемов.

*Пример:* в крови есть железо и гемоглобин. В случае гемоглобина железо – это гем.

*Функции белков, содержащих железо-серные кластеры:*

- Дыхание;
- Фотосинтез;
- Репарация ДНК;
- Катализ метаболических реакций;
- Модификация тРНК;
- Посттранскрипционная регуляция метаболизма железа.

### Ca<sup>2+</sup> – регуляция.

Не все организмы регулируют свой кальций с помощью митохондрий.

Митохондрии отрицательно заряжены внутри. У них на мембране 180 мВ электрического потенциала. Поэтому если они имеют в мембране переносчик, способный пропускать кальций (положительно-заряженный) – кальций будет стремиться попасть в митохондрии.

В таких клетках, как например, возбудимые клетки глаза, это важная функция, потому что при возбуждении происходит вброс кальция в цитоплазму. Для того чтобы

клетка вернулась в исходное возбуждаемое состояние, ей необходимо кальций из цитоплазмы убрать.

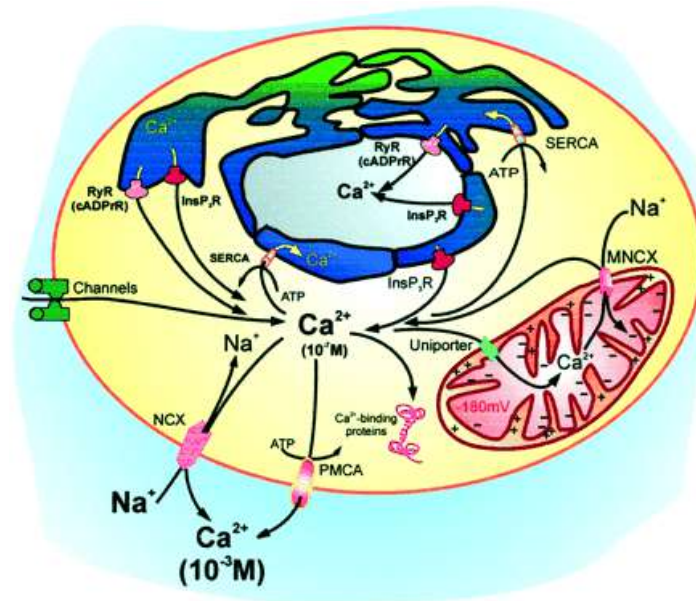


Рис. 1.13. Ca<sup>2+</sup> – регуляция

### Митохондриальная теория старения.

Побочным продуктом окисления дыхательных субстратов кислородом митохондрии вырабатывают активные формы кислорода – продукты неполного окисления, когда кислород принимает не 4 электрона и превращается в химически нейтральную воду, а когда он принимает 1/2/3 электрона и образуются нестабильные реакционно-способные соединения, которые называются активными формами кислорода.

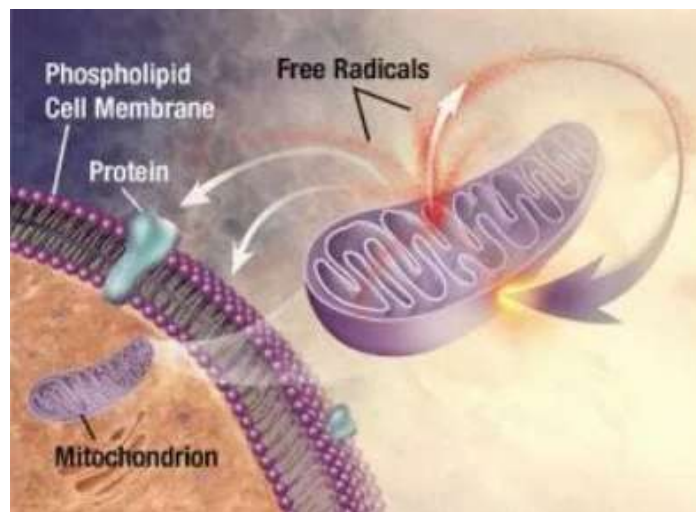


Рис. 1.14. Митохондриальная теория старения

Активными формами называются те, которые гораздо легче вступают в реакции и могут окислить то, что в норме не окисляется кислородом. Они наносят повреждения ДНК, липидам, мембранам, белкам и др. Одна из теорий старения утверждает, что свободные радикалы активной формы кислорода играют важную роль в процессе старения.

#### Происхождение митохондрий.

Митохондрии произошли от бактерий. Этот факт имеет как косвенные, так и прямые свидетельства.

Рихард Альтман утверждал, что митохондрии являются внутриклеточной формой жизни, потому что они могут делиться подобно бактериям.

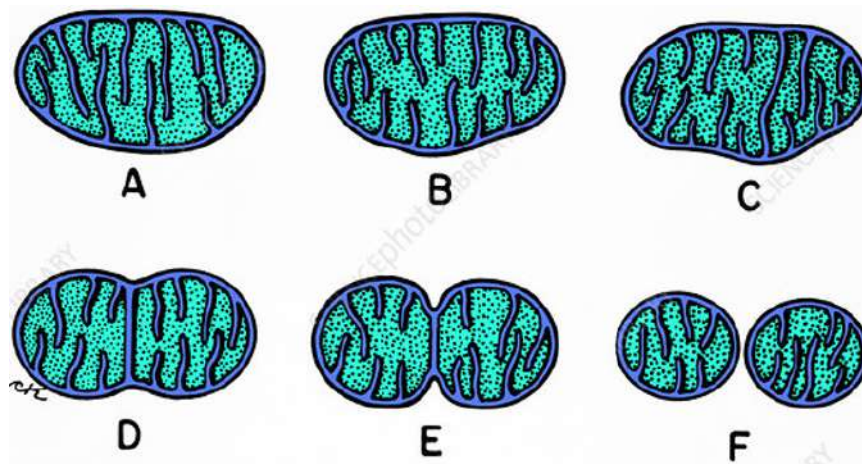


Рис. 1.15. Схематическое представление последовательных стадий деления митохондрий

Однако митохондрии могут не только делиться, но и сливаться.

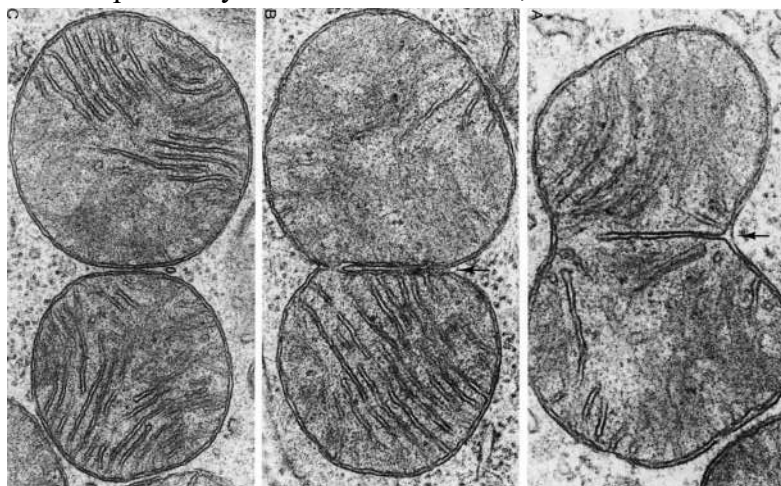


Рис. 1.16. Слияние митохондрий (Из атласа «The Cell», Don W. Fawcett (1981, Hardcover) ISBN-10: 0721635849)

Ближе к 1960-70 годам выяснилось, что у трипаносом есть кинетопласт – удивительная митохондрия, содержащая ДНК. Было установлено, что ДНК – кольцевая. Длина окружности митохондриальной ДНК млекопитающих – около 5-6 мкм. Это соответствует 15-17 тыс. п.о.

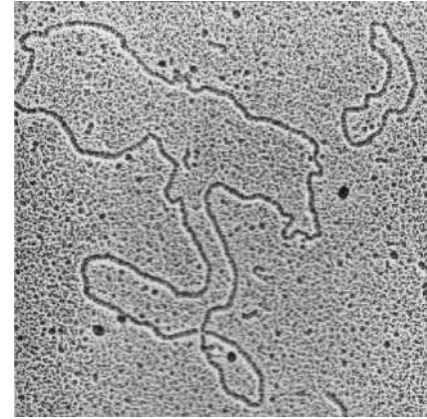
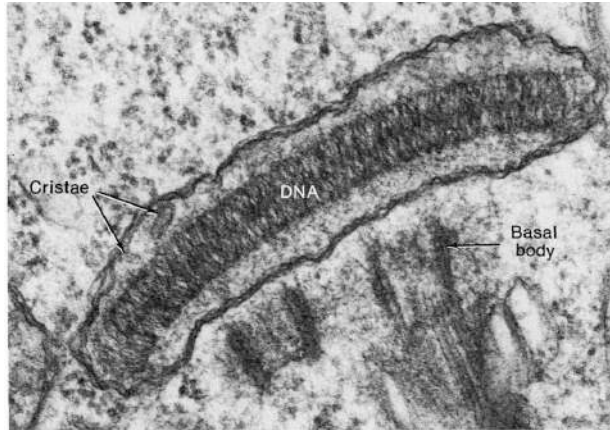


Рис. 1.17. Наличие ДНК у митохондрий. (Из атласа «The Cell», Don W. Fawcett (1981, Hardcover) ISBN-10: 0721635849)

### ДНК и РНК в митохондриях.

ДНК и РНК (рибосомы) есть почти во всех митохондриях.

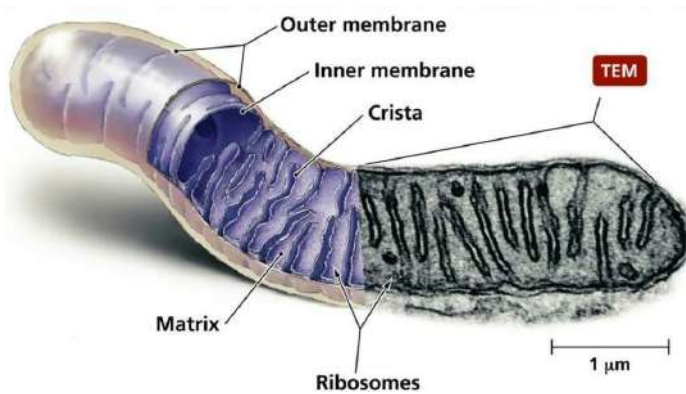


Рис. 1.18. Строение митохондрии

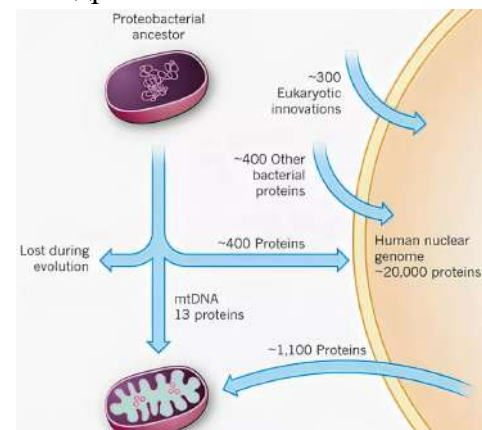


Рис. 1.19. Бактериальный предок и современная митохондрия

Митохондрии произошли от  $\alpha$ -протеобактерии:

- Часть белков эндосимбионта до сих пор функционирует в митохондриях (ферменты окислительного фосфорилирования, компоненты рибосом).
- Часть белков потеряна в ходе эволюции (например, белок, ответственный за синтез клеточной стенки).
- Добавились новые белки (белки системы митохондриального импорта).

Потеря белков митохондрией в ходе эволюции в основном происходила на ранних этапах:

- Из 370 белков бактериального предка 161 не найдены в митохондриях Млекопитающих.
- Из 161 потерянного белка 115 (71%) не найдены ни в одном организме => потеря произошла еще до дивергенции эукариот.

Ортологичная группа (COG): совокупность всех потомков данного предкового гена.

LECA – last eukariotic common ancestor.

Opisthokonts – общий предок грибов и многоклеточных животных.

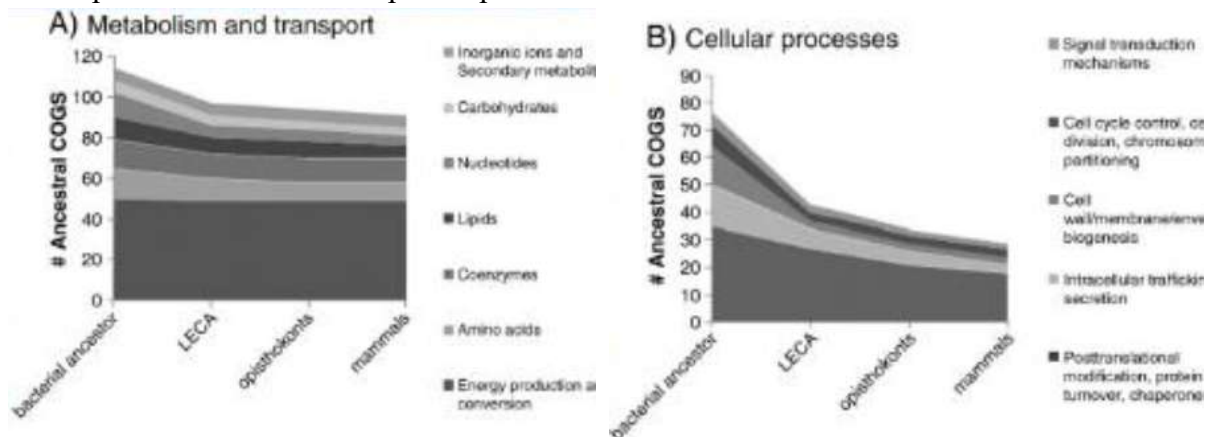


Рис. 1.20. Разделение белков по функциям

От бактериального предка до LECA происходит падение количества белков.

Потеря белков митохондрией:

- Часть белков потеряна полностью в связи с потерей функции (ферменты ответственные за синтез компонентов клеточной стенки).
- Часть белков локализованы и функционируют в других клеточных компартментах, поскольку их гены перенесены в ядро → их продукты могут выполнять свои функции не в митохондриях (ферменты биосинтеза гема и жирных кислот частично работают в митохондриях, частично в цитоплазме).

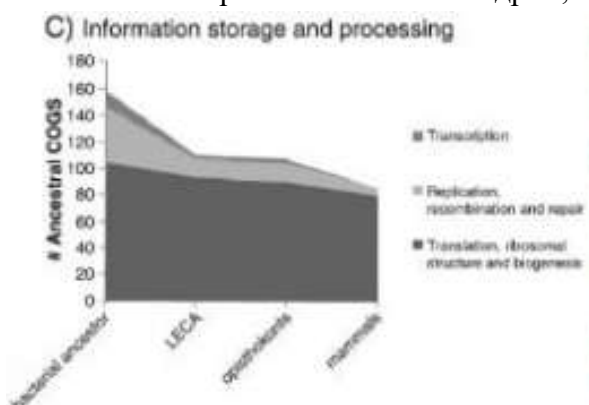


Рис. 1.21. Хранение и обработка информации



Потерянные бактериальные белки часто заменялись другими неортологичными белками.

Например, *DNA polymerase γ*, *POLRMT* и *TWINKLE* имеют высокую гомологию с ферментами ТЗ/Т7 фагов.

COG	Bacterial gene name	Function	Human gene	EC number	Origin of the new protein
COG1138	ccmE	Cytochrome C biogenesis	HCCS	-	LECA [8]
COG0592	dnaN	DNA polymerase processivity factor	POLG2	-	Metazoa [41]
COG0587	dnaE	DNA polymerase	POLG	2.7.7.7	Opisthokonts [78]
COG0847	dnaO	3-5 exonuclease	POLG	3.1.13	Opisthokonts [78]
COG1651	dsbA	Protein disulfide isomerase	CHCHD4	5.3.4.1	LECA [103]
COG0492	trxB	Thioredoxin reductase	TXNRD2	1.8.1.9	Metazoa
COG0358	dnaG	DNA primase	POLRMT	2.7.7.-	LECA [104]
COG0751	glyS	Glycyl-tRNA aminoacyltransferase	GARS	6.1.1.14	LECA [17]
COG0752	glyQ				
COG0805	tatC	Protein translocation	BCS1L	-	LECA [105]
COG1826	tatA				
COG0272	ligA	DNA ligase	LIG3	6.5.1.2	Filozoa [106]
COG0202	rpoA	RNA polymerase	POLRMT	2.7.7.6	LECA [104]
COG0164	rnhB	Ribonuclease	RNASEH1	3.1.26.4	Metazoa [107]
COG1158	kho	Transcription termination	MTERF	-	LECA [108]
COG0782	greA	Transcription elongation	TEFM	-	Metazoa [42]
COG0691	smpB	Recycling stalled ribosomes	mRF17	-	Vertebrates [96]
COG0625	Gst	Glutathione-S-transferase	GSTK1	2.5.1.18	Metazoa [109]
COG0305	dnaB	Replicative helicase	TWINKLE	3.6.1.-	LECA [78]

Рис. 1.22. Список неортологичных замен

*COG* – кластеры ортологичных групп (генов). Желтым выделены *COG*, которые имеют отношение к передаче наследственной информации (*ДНК-polymerase* и др).

**Перенос бактериальных генов** из митохондриального генома в ядерный.

Перенос происходит из-за высокой частоты мутаций в связи с близостью дыхательной цепи.

Ортологичные гены у разных видов организмов могут находиться в разных геномах – митохондриальном или ядерном.

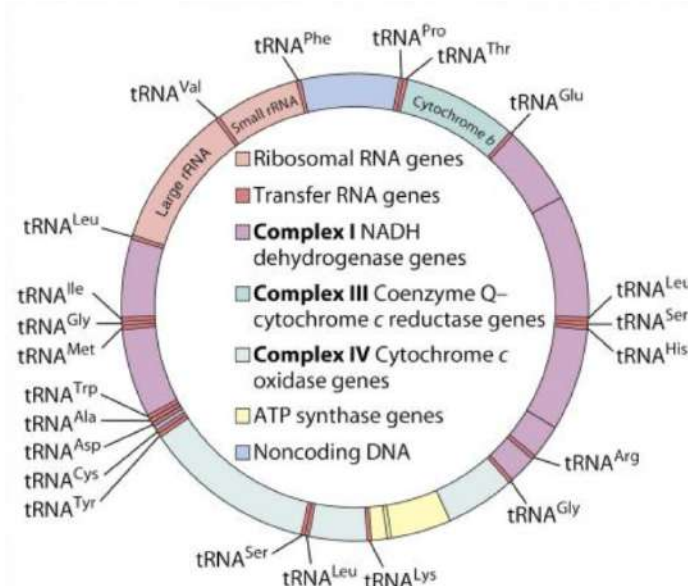


Рис. 1.23. Перенос бактериальных генов

Все белки, необходимые для репликации, транскрипции и трансляции мтДНК расположены в ядерном геноме.

Для репликации и экспрессии мт генома, в котором сохранились всего несколько генов, необходима сложная ферментативная система.

В мтДНК вообще остались гены (не все были перенесены в ядро) в силу того, что:

- Гидрофобным белкам трудно транспортироваться в митохондрии от места их синтеза. В мт ДНК остались гены двух самых гидрофобных из всех митохондриальных белков – субъединицы 1 цитохром с оксидазы и цитохрома *b*.
- Из-за разницы в генетическом коде трудно переместить некоторые гены в ядро.
- Регуляция экспрессии генов митохондрий важна для контроля обмена веществ. На эту экспрессию могут непосредственно влиять компоненты дыхательной цепи, а также электрохимический потенциал.

В ходе эволюции происходило увеличение числа субъединиц в больших мультиферментных митохондриальных комплексах.

Новые субъединицы добавлялись в комплексы:

- Это может скомпенсировать мутации в старых субъединицах. В единственном комплексе, гены всех компонентов которого локализованы в ядре – комплексе II – не менялось число субъединиц.
- Новые субъединицы участвуют в регуляции работы комплексов.

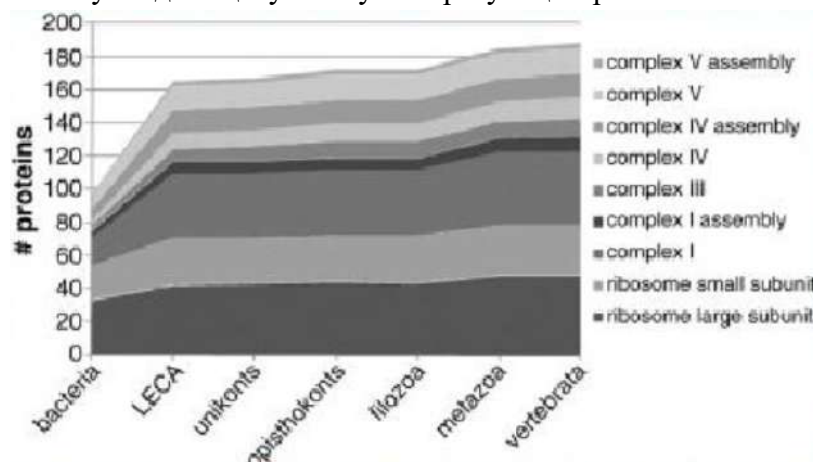


Рис. 1.24. Увеличение числа субъединиц

На этапе от бактериального предка до *LECA* (первый этап становления симбиоза) комплексы дыхательной цепи (I, III, IV, V) происходило резкое увеличение числа субъединиц. Все субъединицы второго комплекса закодированы у человека в ядре и в нем не менялось число субъединиц.

Таким образом:

1. Митохондрии произошли от  $\alpha$ -протеобактерий.

2. Часть белков эндосимбионта до сих пор функционирует в митохондриях.
  - Большая часть предковых генов перенесена в ядерный геном.
  - В геноме митохондрий человека осталось закодировано 13 белков.
3. Часть белков эндосимбионта потеряна в ходе:
  - Потеря белков митохондрией в основном происходила на ранних этапах эволюции.
  - Некоторые утраченные белки заменены неортологичными.
4. В митохондриальный протеом в ходе эволюции добавились новые белки.
  - В связи с возникновением новых функций у митохондрий по сравнению с бактериальным предком.
  - В ходе эволюции происходило увеличение числа субъединиц в больших мультиферментных митохондриальных комплексах.

### Нуклеоиды.

МтДНК организована в ДНК-белковые комплексы – *нуклеоиды*.

Нуклеоид млекопитающих имеет размер около 100 нм в диаметре.

Нуклеоид состоит из мтДНК (1-2 копии) и белков, образующих 2 уровня - коровый и внешний. Соматические клетки млекопитающих содержат 1000-10.000 молекул мтДНК.

На рисунке 1.24 (B) желтыми кружками показан белок, который называется TFAM – транскрипционный фактор  $\alpha$ -митохондрий.

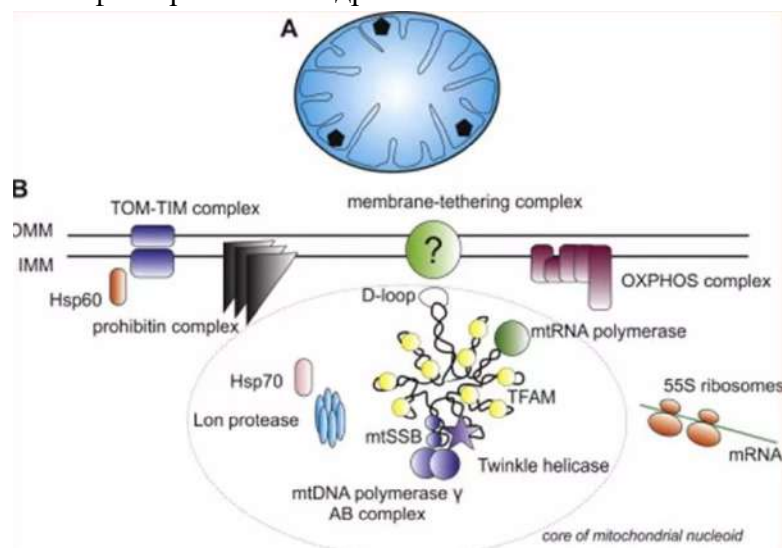


Рис. 1.25. Нуклеоид

Нуклеоид и его белки принято делить на два уровня.

*Коровый уровень:* белки, непосредственно взаимодействующие ДНК – ферменты репликации, репарации, транскрипции

*Периферический уровень:* в основном белки, осуществляющие процессинг РНК и трансляцию.

Нуклеоиды прикреплены к внутренней митохондриальной мембране с помощью нескольких белков: ATAD3, прохибитин и др.

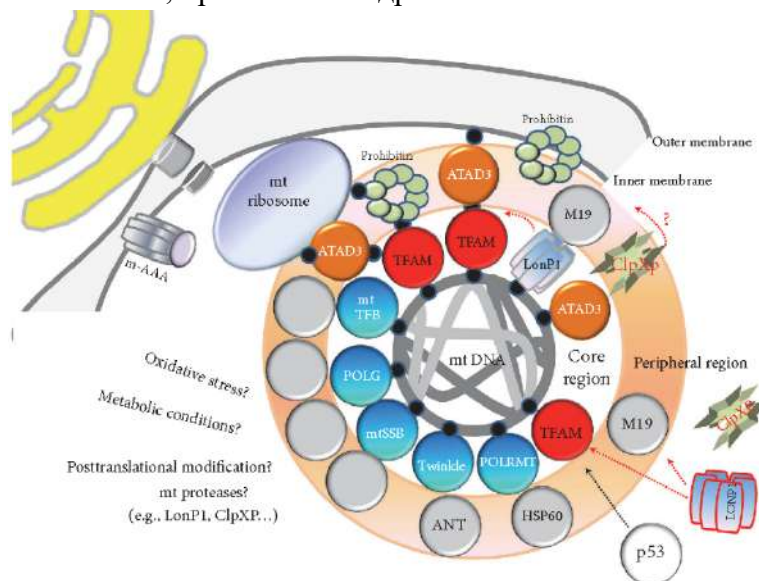


Рис. 1.26. Структура нуклеоида млекопитающих

*TFAM* (mitochondrial transcription factor A) участвует в пространственной организации нуклеоида: имеет гомологию с ДНК-связывающими белками *HMG* (high mobility group), которые участвуют в пространственной организации ядерного хроматина.

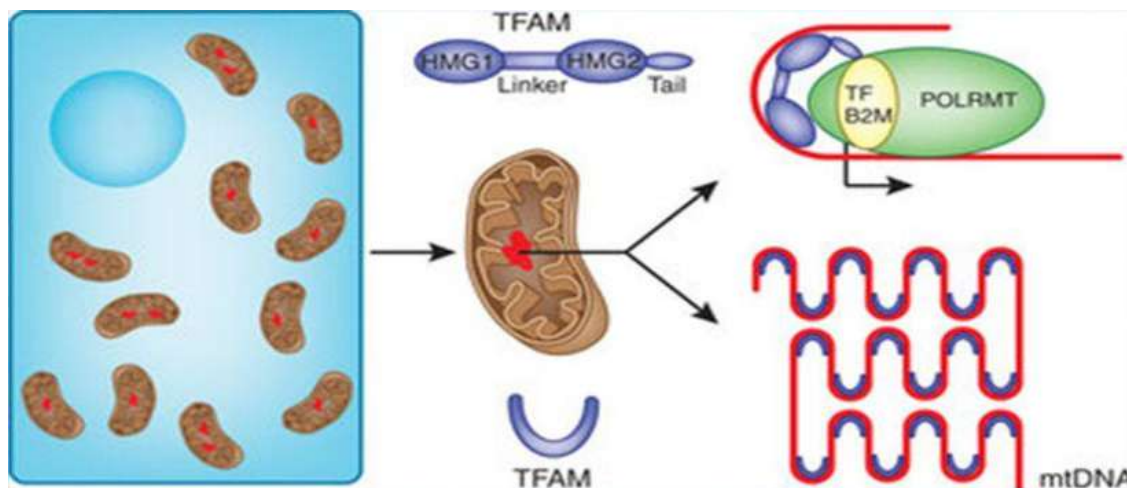


Рис. 1.27. TFAM (mitochondrial transcription factor A)

TFAM имеет сродство как к неспецифической последовательности ДНК, так и к промотору. На промоторах он работает как транскрипционный фактор. В правой части рисунка показано, как TFAM связывается с промотором, изгибает ДНК и после этого добавляется РНК-полимераза и транскрипционный фактор. До того момента, пока TFAM не изогнет область промотора – транскрипция начаться не может.

Кроме того, TFAM связывается по всей длине с митохондриальной ДНК.

На рисунке 1.28 показано два промотора (желтый и красный). Когда TFAM мало, он садится на промоторы и начинает транскрипцию. Чем его больше, тем он сильнее соединяется с митохондриальной ДНК. Когда его очень много, он полностью «залепляет» митохондриальную ДНК, которая начинает называться «молчащей». В таком виде она не доступна никаким ферментам и никакие процессы происходить не могут (ни транскрипция, ни репликация, ни репарация).

У некоторых исследователей есть предположение, что TFAM является регулятором репарации. Если происходят сильные повреждения с митохондриальной ДНК, то наступает пауза во всех действиях, потому что она «облепляется» TFAM. У TFAM высокое сродство к поврежденным азотистым основаниям, поэтому перед репарацией такое состояние достигается. Далее отдельные регуляторные факторы могут отделять TFAM.

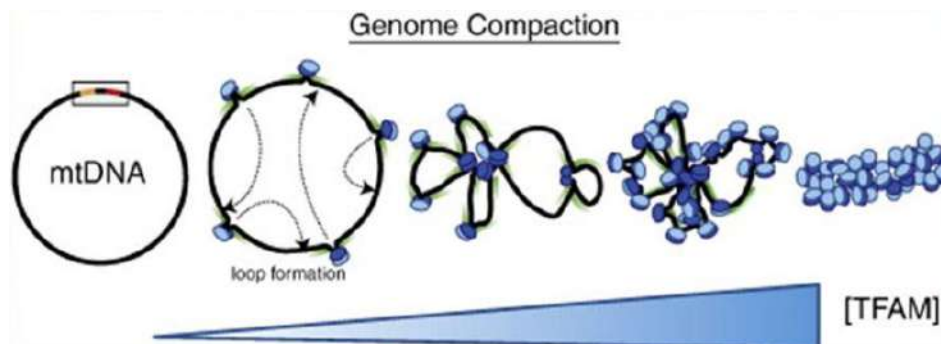


Рис. 1.28. TFAM (mitochondrial transcription factor A)

### Устройство митохондриальной ДНК.

В клетках млекопитающих показано наличие мтДНК в нескольких формах:

- Open circle (открытая кольцевая форма);
- Supercoiled circle (скрученная форма);

Эти две формы составляют большинство у многоклеточных животных.

- Head-to-tail circular dimer;

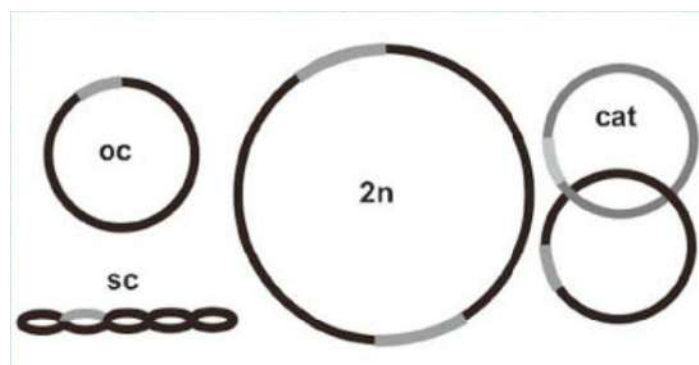


Рис. 1.29. Устройство митохондриальной ДНК

- Catenane.

Их количество значительно варьирует: 10% у мыши, более 30% в клетках человека линии НЕК. У мыши не обнаружено катенанов из более чем 4х молекул ДНК. В человеческих клеточных линиях встречаются катенаны из 8ми молекул ДНК. У человека количество катенанов коррелирует с числом копий мтДНК.

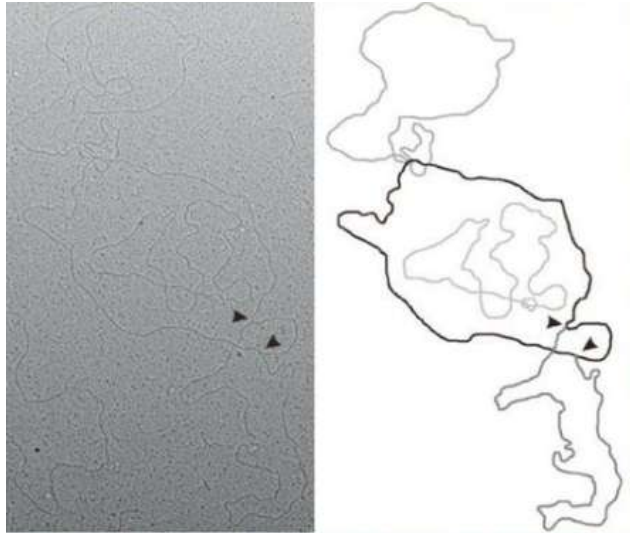


Рис. 1.30. Catenane

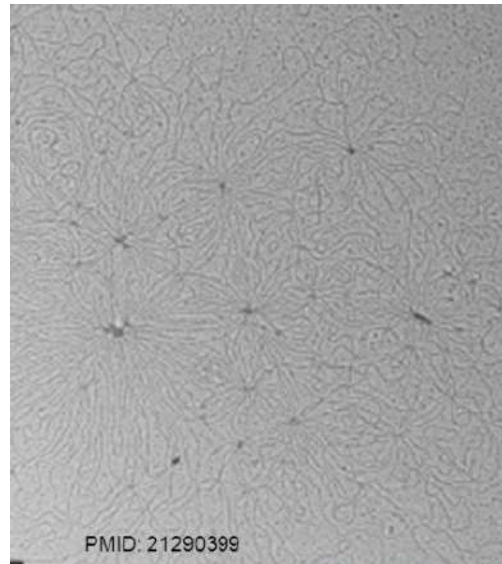


Рис. 1.31. МтДНК в сердечной мышце взрослого человека

МтДНК в сердечной мышце взрослого человека организована в многомерную сеть, содержащий множество геномов.

Также организована мтДНК у некоторых растений, малярийного плазмодия и некоторых грибов: линейные геномы, соединенные Head-to-tail, формируют многомерную сеть, в которой постоянно происходит репликация и рекомбинация.

Структуры, образованные при рекомбинации найдены также в мозге человека и мыши, но не обнаружены в других тканях.

МтДНК из сердца крысы, мыши, кролика, а также человеческих младенцев не образует сети, а имеет нормальную кольцевую двуцепочечную структуру.

Подведем итог:

1. МтДНК Млекопитающих организована в ДНК-белковые комплексы - нуклеоиды
  - В одной клетке около 1000 нуклеоидов;
  - TFAM (mitochondrial transcription factor A) участвует в пространственной организации мтДНК в нуклеоидах.
2. В клетках Млекопитающих мтДНК имеет разные формы:
  - Open circle;
  - Supercoiled circle;
  - Head-to-tail circular dimer;
  - Catenane, в тканях человека их количество коррелирует с числом копий мтДНК.

- МтДНК в сердечной мышце взрослого человека организована в многомерную сеть, содержащий множество линейных геномов.

### Генетический код в мтДНК.

Генетический код в мтДНК несколько отличается от универсального.

		Second letter				Third letter
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Trp UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA Stop AGG Stop	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

		SECOND LETTER				THIRD LETTER
		U	C	A	G	
FIRST LETTER	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA Stop AGG Stop	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Рис. 1.32. Митохондриальный генетический код

Рис. 1.33. Универсальный генетический код

Для двух аминокислот существует 2 тРНК: серин и рибин.

МтДНК кольцевая двуцепочечная молекула. Её цепи называются *L (light)* и *H (heavy)* из-за разницы в плавучей плотности в градиенте хлористого цезия.

Н-цепь богата G, в L-цепи G значительно меньше.

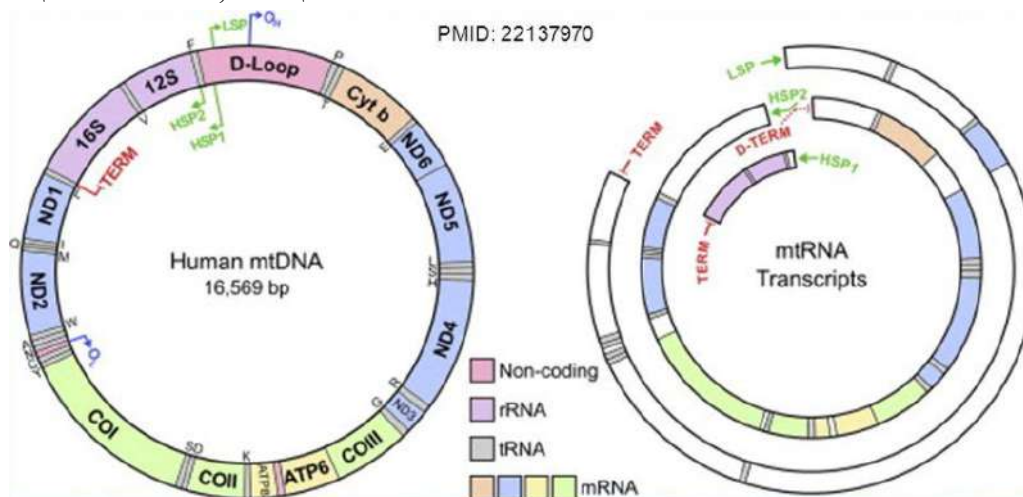


Рис. 1.34. МтДНК кольцевая двуцепочечная молекула

Некоторые кодоны редки или отсутствуют в мтДНК:

Из 111 геномов:

- в не менее, чем 76 нет одного или более кодонов (в среднем отсутствует 1.6 кодонов);

- в 101 хотя бы 1 кодон встречается менее трех раз (в среднем 4.3 кодона).

Митохондриальный геном человека содержит 37 генов:

- На L-цепи - 8 тРНК + 1 мРНК
- На H-цепи - 2 рРНК + 14 тРНК + 12 мРНК.

Гены мтДНК у животных не содержат интронов.

Таким образом:

1. МтДНК кольцевая двуцепочечная молекула.
  - Её цепи сильно отличаются по нуклеотидному составу и называются L (light) и H (heavy);
  - Генетический код в мтДНК отличается от универсального;
  - Некоторые кодоны редки или отсутствуют в отдельных мтДНК.
2. Митохондриальный геном человека содержит 37 генов:
  - 2
  - 22 тРНК
  - 12 мРНК (13 белков).

### Генетика митохондрий.

МтДНК подвержена мутациям.

- *Гомоплазмия* - ни в одной молекуле мтДНК нет мутаций или во всех молекулах мтДНК присутствует мутация
- *Гетероплазмия* - мутация присутствует в некоторых молекулах мтДНК.

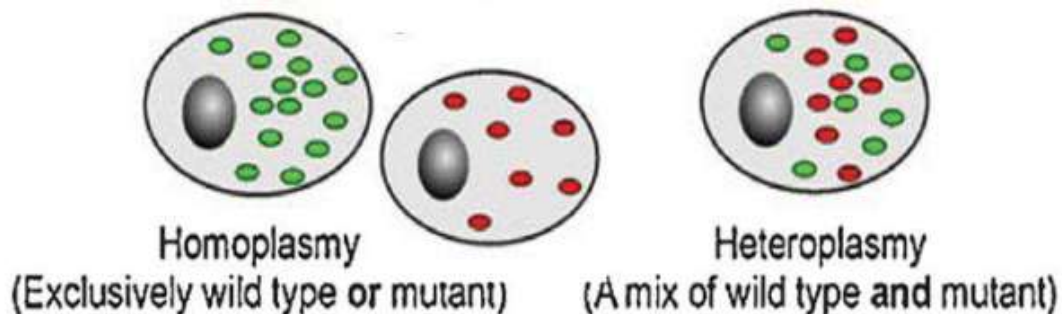


Рис. 1.35. Генетика митохондрий

МтДНК реплицируется в течение всего клеточного цикла, независимо от репликации в ядре, поэтому мутации в мтДНК при гетероплазмии накапливаются.

При делении клетки с гетероплазмией возникает мозаичное распределение ДНК с мутацией.

Пациенты с гетероплазмией часто имеют разный уровень содержания мутантной ДНК в разных органах и даже в клетках одного органа.



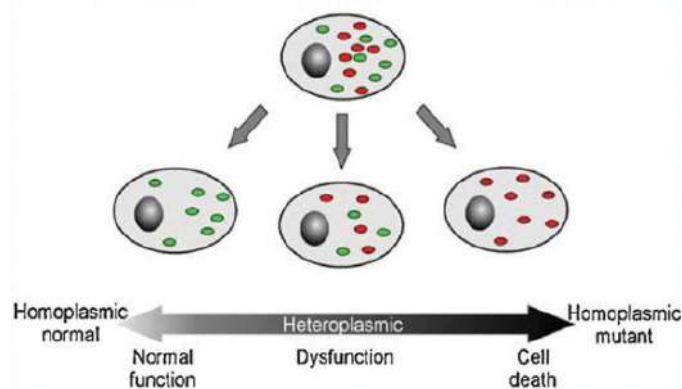


Рис. 1.36. Гетероплазмия

Дисфункция возникает при превышении определенного порога содержания мутантной мтДНК. Этот порог различен при разных заболеваниях. В среднем заболевание проявляется, когда:

- 50-60% мтДНК несет делецию;
- более 90% тРНК несет мутацию.

Существует еще одно заболевание, которое называется оптическая нейропатия Лебера (LHON, от Leber's hereditary optic neuropathy). Болезнь, как правило, связана с одной из трех точечных мутаций в мтДНК:

- 11778  $G>A$  (ND4, 50-70 % случаев);
- 14484  $T>C$  (ND6, 10-15 % случаев);
- 3460  $G>A$  (ND1, 8-25 % случаев).

Заболевание характеризуется резко наступающей слепотой. Оно может начаться в возрасте от 5 до 75 лет; не лечится.

Мт ДНК передается только по материнской линии, т.к. мтДНК попадает в зиготу только из яйцеклетки, а мтДНК спермия деградирует в цитоплазме ооцита. При гомоплазмии все потомки больной матери будут также больными.

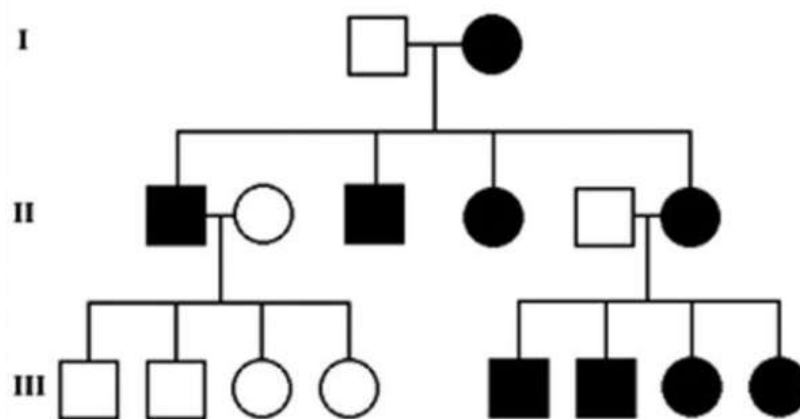


Рис. 1.37. 90% наследственной оптической нейропатии Лебера

Мать с гетероплазмией может передать потомству разный уровень мутантной мтДНК, а может вообще не передать мутацию.

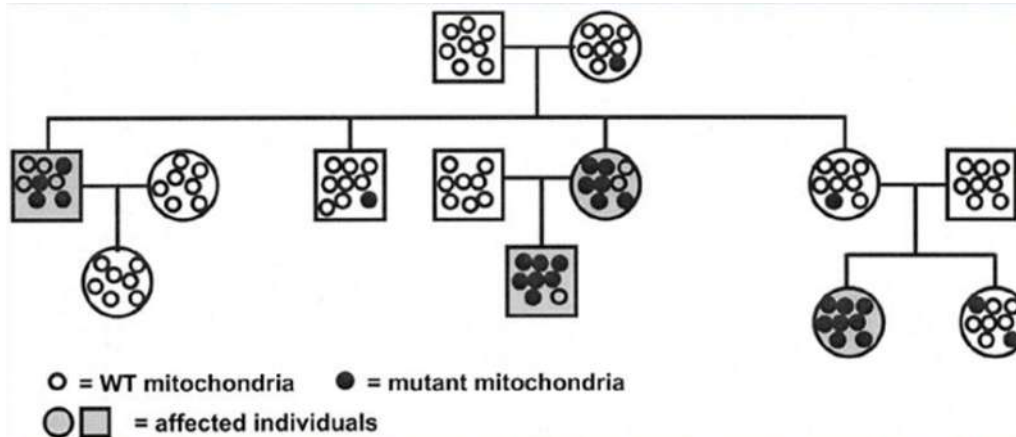


Рис. 1.38. 10% нейропатий Лебера: вероятность передачи заболевания потомству неизвестна

Таким образом:

1. МтДНК в клетке может присутствовать в двух состояниях: гомоплазмия и гетероплазмия.
2. Мутации в мтДНК при гетероплазмии накапливаются.
3. При делении клетки с гетероплазмией возникает мозаичное распределение ДНК.
4. Пациенты с гетероплазмией часто имеют разный уровень содержания мутантной ДНК в разных клетках.
5. Мт ДНК передается только по материнской линии.
6. При гомоплазмии все потомки больной матери будут также больными.
7. Мать с гетероплазмией может передать потомству разный уровень мутантной мтДНК, а может вообще не передать мутацию.

## Лекция 2. Регуляторные участки мтДНК

### 2.1. Регуляторные участки мтДНК

#### Репликация мтДНК.

При репликации необходим определенный набор ферментов:

- праймаза – POLRMT;
- ДНК-полимераза – DNA pol  $\gamma$ ;
- SSB (single strand DNA binding protein) – Mt SSB;
- ДНК-хеликаза – TWINKLE;
- Топоизомеразы (сбрасывание супервитков+разделение катенанов) – TOP1mt, TOP2Bmt, TOP3Amt;
- РНКаза – RNase H1;
- ДНК-лигаза – DNA ligase 3.

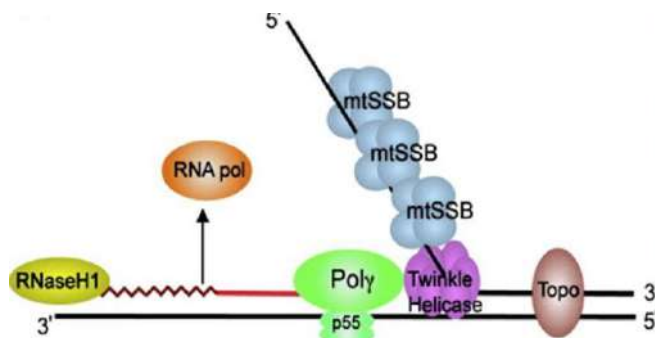


Рис. 2.1. Репликация мтДНК

#### Регуляторные участки в мтДНК.

В мтДНК есть протяженный некодирующий участок *NCR* (*non-coding region*), расположенный между генами *tRNA<sup>Pro</sup>* и *tRNA<sup>Phe</sup>*.

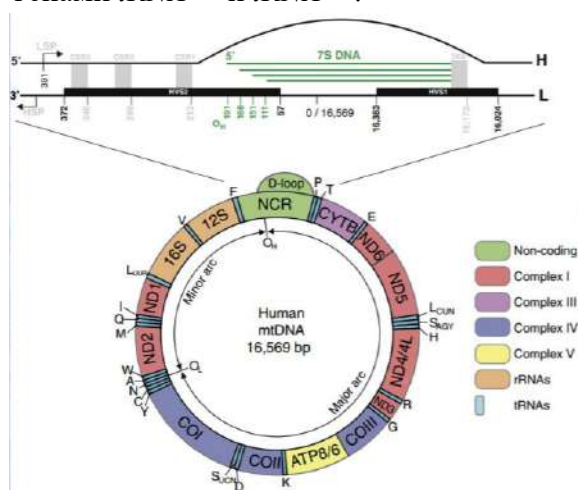


Рис. 2.2. Регуляторные участки в мтДНК: D-петля

В некоторых молекулах мтДНК присутствует оцДНК (650нт), которая гибридизуется с материнской L-цепью в районе NCR, при этом формируется трицепочечная структура, которая называется *D-loop* (displacement loop).

*D-loop* впервые обнаружен на ЭМ мтДНК мыши и цыпленка более 40 лет назад (Arnberg et al, 1971; Kasamatsu et al, 1971; Robberson et al, 1972)

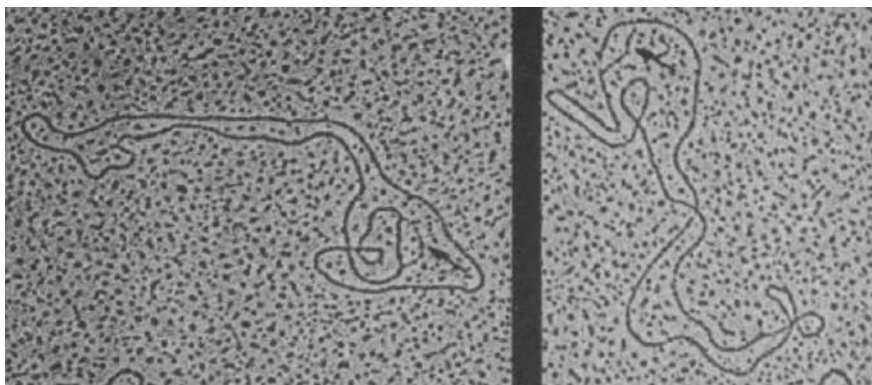


Рис. 2.3. МтДНК мыши и цыпленка

D-loop содержится не во всех молекулах ДНК. Его содержание колеблется в широких пределах 1-95%. Есть организмы, у которых D-loop не встречается, например, дрозофила.

Таблица 2.1. Frequencies of mtDNA genomes containing D-loops/7S DNA.

Organism	Cells/tissues
	% mtDNA with D-loop
<i>Xenopus</i>	Oocytes: 80-95%
<i>Xenopus</i>	Oocytes 30-70%
	Unfertilised eggs: 32-39%
	HCG 'stimulated' eggs: 40-66%
	Tadpoles: 70-81%
Mouse	LA9 cells: 34-51%
	LD cells: 42%
Mouse	LA9 cells: 71%
	LMTK cells: 82%
Various mammals	Rabbit skeletal muscle: 1%
	Rabbit heart: 40%
	Mouse C2 myotubes: 5%
	Mouse heart: 65%
	Bovine heart: 12%
Human	HeLa cells: 5-12%
	Human placenta: 55%
Human	HeLa cells: 33%
	Normal skin fibroblasts: 14%

*NCR* содержит регуляторные элементы:

- Ориджин репликации *O*, и дополнительные ориджины (*ori b*). Это основной ориджин, с которого начинается синтез цепи.
- Промоторы для обеих цепей *LSP* и *HSP1*.
- Участки регуляции репликации *CSB* (conserved sequence blocks).
- Участок терминации репликации *TAS* (termination-associated sequence). Предположительно один из белков *MTERF* может с *TAS*.

Считается, что *D-loop* образован репликацией, инициированной в *O*, и терминированной в *TAS*.

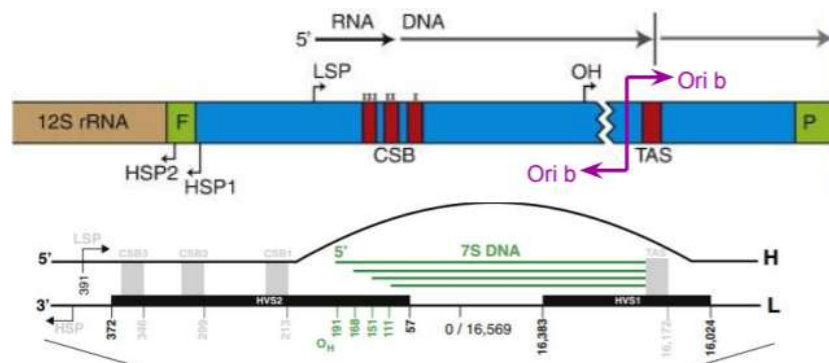


Рис. 2.5. Структура NCR

Образование *D-loop*: репликация с участием ДНК-полимеразы  $\gamma$  (*PolgA+PolgB*), TFAM, *mtSSB*

Деградация *D-loop*: нуклеаза *MGME1*.

*D-loop* связаны белки: и *ATAD3p*.

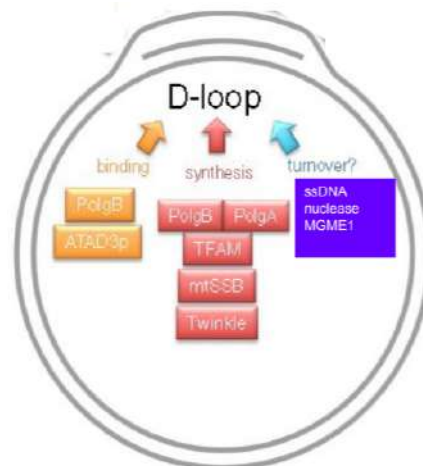


Рис. 2.5. Структура NCR

### Предположительные функции *D-loop*.

1. *D-loop* – преждевременно терминированная Н-цепь, образованная при репликации (модель *Strand displacement*) (механизм образования).

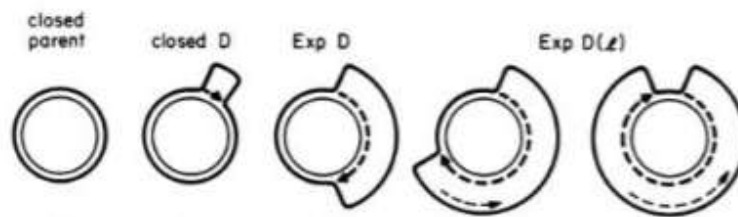


Рис. 2.6. Модель Strand displacement

2. D-loop необходима для того, чтобы 2 вилки репликации могли разойтись.
3. Третья цепь ДНК в области D-loop создает более открытую конформацию ДНК, делая её доступной для ферментов.
4. Синтез и деградация *D-loop* может регулировать содержание нуклеотидов в митохондрии, а этот фактор в свою очередь влияет на репликацию и другие процессы.
5. *D-loop* – элемент, необходимый для сборки нуклеоида и его связывания с внутренней мембраной через белок *ATAD3p*.

Таким образом:

1. *NCR* содержит регуляторные элементы:
  - ориджин репликации, промоторы *LSP* и *HSP1*;
  - участки регуляции репликации *CSB*, участок терминации репликации *TAS*
2. В *NCR* некоторых мтДНК за счет образования 7S ДНК длиной около 650 нуклеотидов формируется трицепочечная структура, которая называется *D-loop* (displacement loop)
3. Считается, что *D-loop* образована репликацией, инициированной  $O_H$  и терминированной в *TAS*.
4. Функции *D-loop* неизвестны. Они могут быть связаны с:
  - регуляцией репликации
  - рекомбинацией мтДНК
  - образованием открытой конформации для доступа ферментов
  - формированием нуклеоида и его ассоциацией с внутренней мембраной

#### Инициация репликации.

Хеликаза *TWINKLE* не обладает праймазной активностью => РНК-полимераза *POLRMT* синтезирует РНК-праймеры для ДНК-полимеразы  $\gamma$ . *POLRMT* связывается с *LSP*, чтобы синтезировать полноразмерный транскрипт. Он разрезается или терминируется с образованием РНК-праймера длиной 25-75 нуклеотидов.

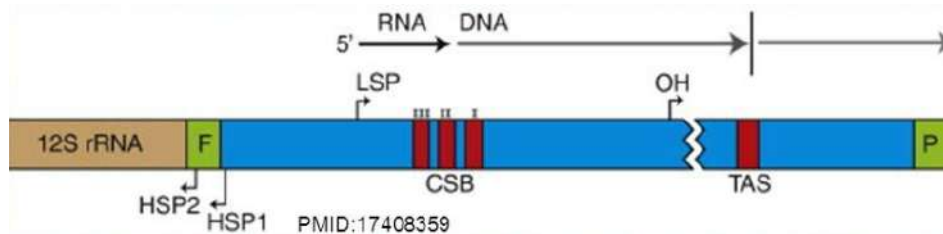


Рис. 2.7. Инициация репликации

Терминация транскрипции при синтезе праймеров для транскрипции POLRMT происходит за счет образования G-квадруплекса на РНК.

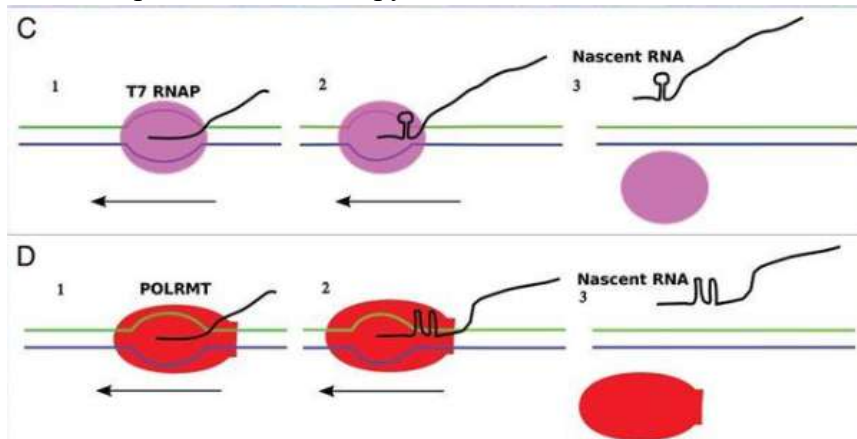


Рис. 2.7. Терминация транскрипции

Это напоминает механизм терминации транскрипции бактериофага Т7: РНК образует тРНК подобную структуру полимераза имеет низкое сродство к дцНК.

Структура G-квадруплекса.

Квадруплексы – прочные структуры, образованные пластинами гуанина, положенными в несколько плоскостей. Они координируются одновалентным металлом (обычно калием), возникают водородные связи между гуанином.

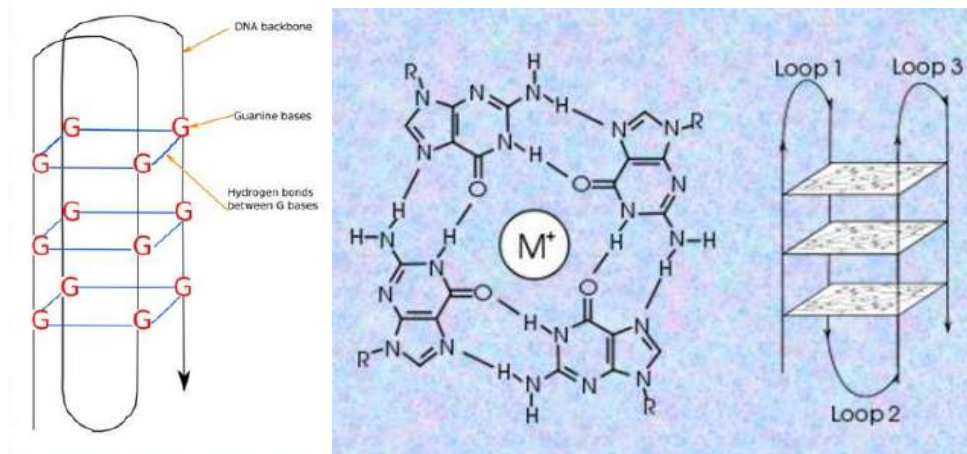


Рис. 2.8. Структура G-квадруплекса

В CSB II есть последовательность (у большинства людей)  $G_6AG_8$ , которая образует квадруплекс. *TEFM* (mitochondrial transcription elongation factor) связывается с *POLRMT* и препятствует терминации транскрипции в области *CSB II*.

Роль квадруплекса: у некоторых людей присутствует полиморфизм ( $G_6AG_7$ ); был проведен эксперимент, в котором участвовали люди без полиморфизма и имеющие полиморфизм. Без *TEFM* срабатывает квадруплекс и продукт – короткий. Люди, у которых хуже образуется квадруплекс – образуется 40% длинного продукта и в 60% случаев происходит торможение.

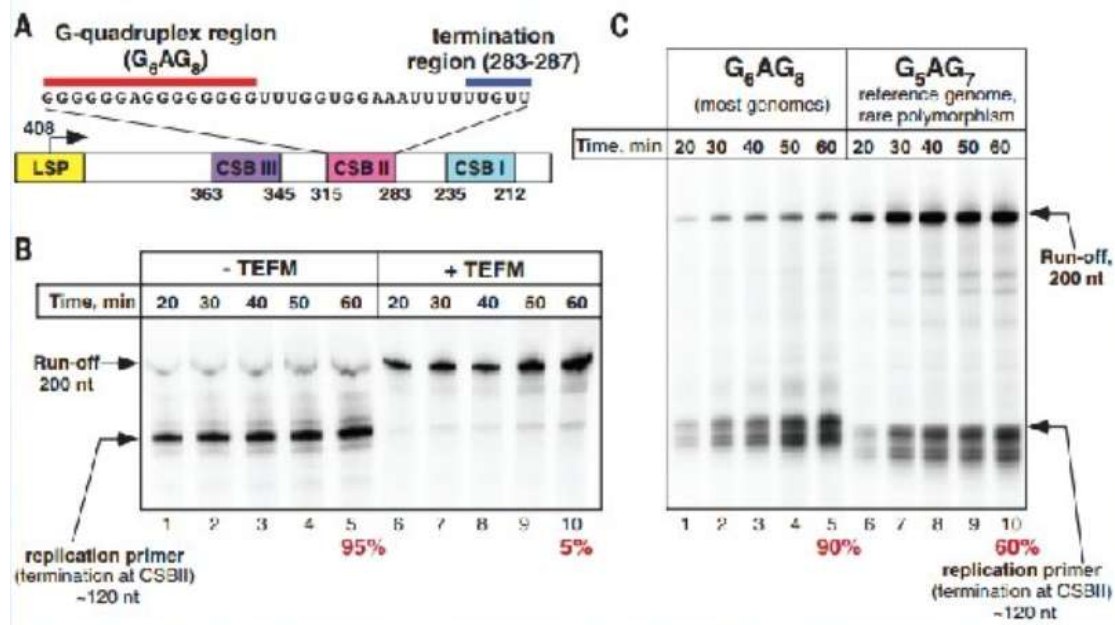


Рис. 2.8. TEFM (mitochondrial transcription elongation factor)

TEFM взаимодействует со всеми компонентами транскрипционного комплекса:

- с РНК;
- с матрицей ДНК;
- с *POLRMT* (с субдоменом palm вблизи домена PPR).

Это взаимодействие каким-то образом мешает образованию G-квадруплекса.

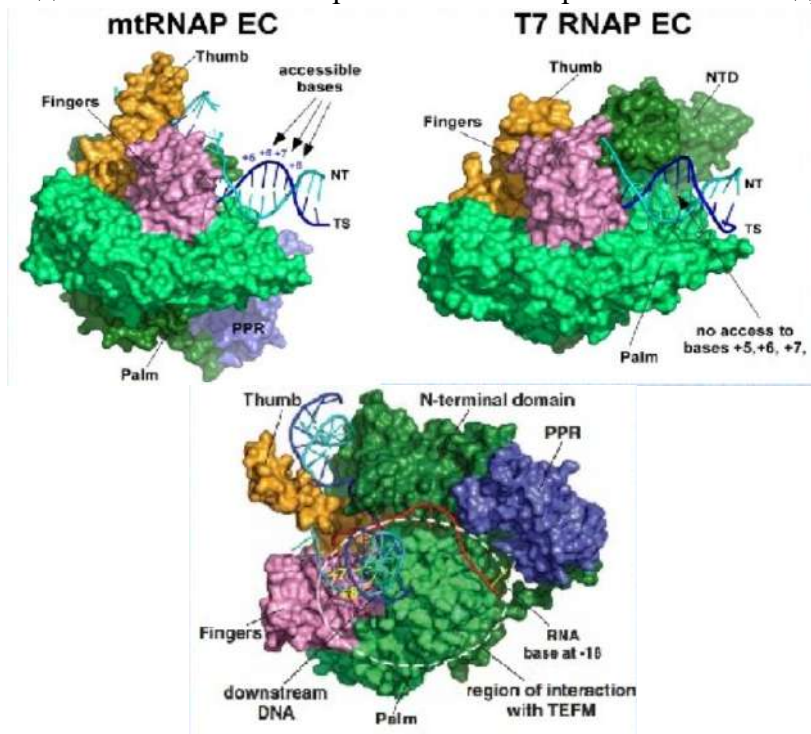


Рис. 2.9. TEFM-фактор



Когда *TEFM* отсутствует, образуются короткие праймеры – тогда вместе с *oriH* начнется репликация. А если *TEFM* присутствует, то квадруплекс не срабатывает: с *LSP* идет полноразмерная транскрипция. Таким образом митохондрия может переключаться с репликации на транскрипцию. *TEFM*-фактор является основным регулятором.

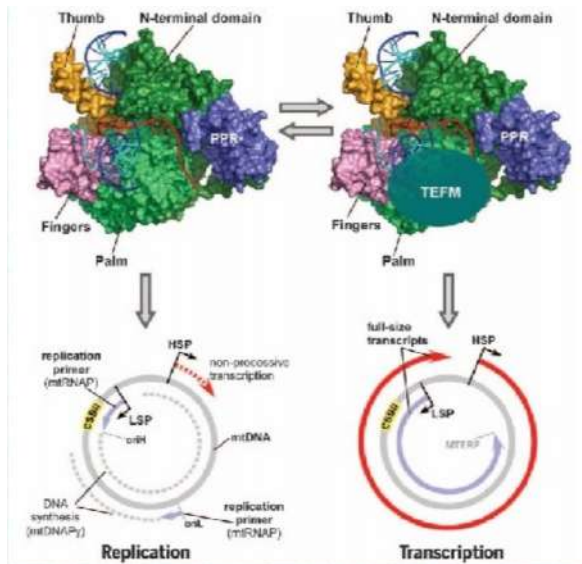


Рис. 2.10. TEFM-фактор. Репликация и транскрипция

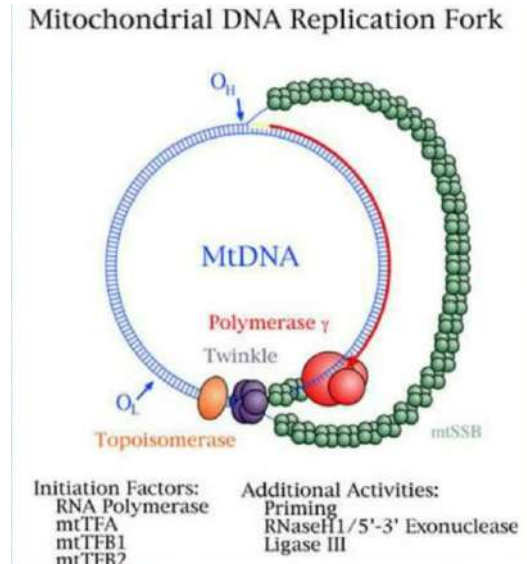


Рис. 2.11. Репликация

*Инициация репликации на  $O_H$ .*

Одна из принятых схем репликации показана на рисунке 2.11: начало в  $O_H$  (*ориджин H*), желтым цветом показан праймер, красным цветом показан ДНК, который достраивается к праймеру. В это время старая H-цепь находится в цепочечном состоянии и облеплена *mtSSB*. Пока первая вилка не дойдет до  $O_L$  (*ориджин L*) – 2/3 генома необходимо пройти –  $O_L$  не начнет свою работу. Таким образом, репликация происходит асинхронно.

*Инициация репликации на  $O_L$ .*

На рисунке 2.12 показано, что  $ORI_L$  расположен между пятью генами тРНК (в том случае, если ДНК в одноцепочечном состоянии). На  $ORI_L$ : POLRMT синтезирует праймер длиной около 25 нуклеотидов.

На рисунке 2.13 (A) показана вилка, желтым цветом показан  $ORI_L$  в одноцепочечном состоянии. На рисунке 2.13 (B) полимеразы прошла место, образуется желтая «шпилька» (цепочка складывается). Далее может образоваться РНК-праймер (25 нуклеотидов). Далее синтез может продолжать ДНК-полимераза.

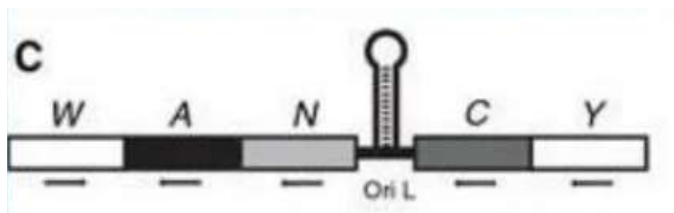
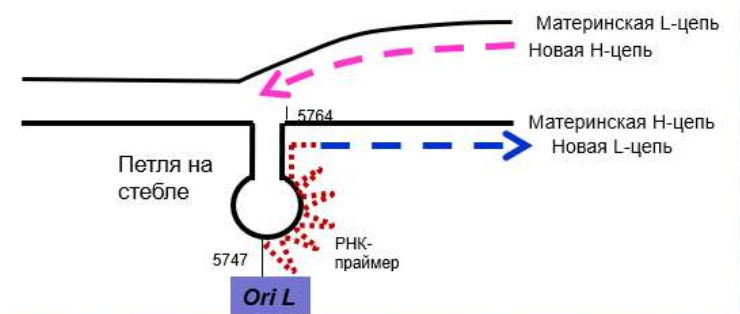


Рис. 2.12. Расположение  $O_L$



2.13. Петля  $O_L$  на стебле

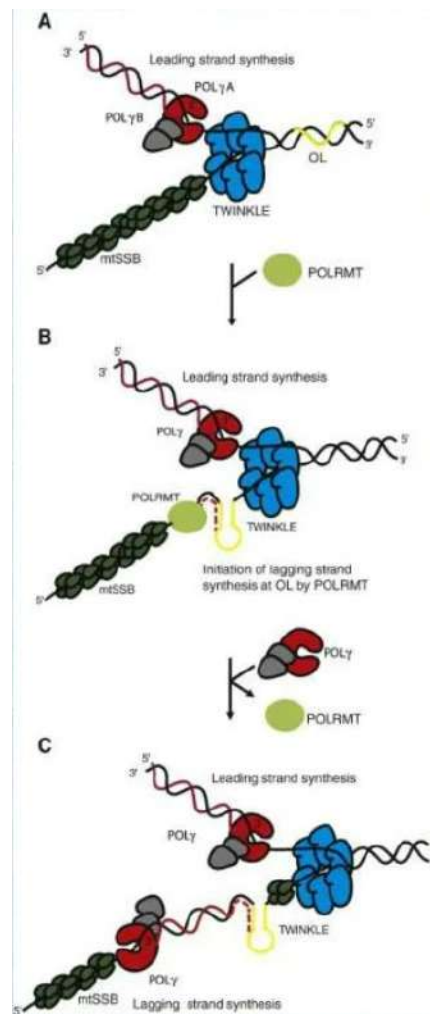


Рис. 2.14. Инициация репликации на  $O_L$

Существует работа «Species-specific lifespans: Can it be a lottery based on the mode of mitochondrial DNA replication?»:

- Большинство детектируемых делеций в мтДНК человека происходят в «Major arc».
- Число прямых повторов при этом почти в два раза больше в «Minor arc».

В настоящий момент известно, что механизм образования делеций следующий: делеции в митохондриях всегда образуются прямыми повторами. На рисунке 2.15 (b) показан асимметричный синтез, (c) – может образоваться залипание – в итоге получим один нормальный геном и один с делецией.

В ходе эксперимента была взята ДНК мыши и ДНК землекопа. В мтДНК голого землекопа возможно образование дополнительных шпилек между *Ori L* и *Ori H* по сравнению с мтДНК мыши (рис. 2.16).

В мтДНК человека теоретически возможно образование шпильки в области *HSL*. Эта шпилька может выполнять функцию *Ori L*.

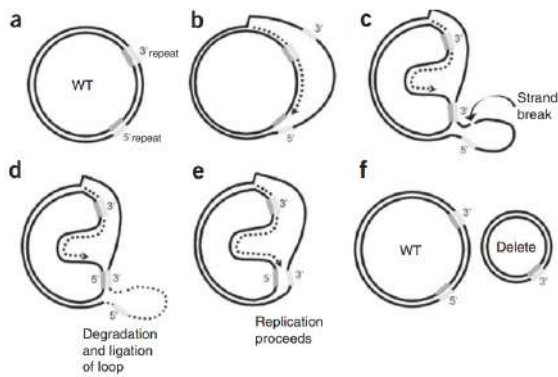


Рис. 2.15. Механизм образования делеций

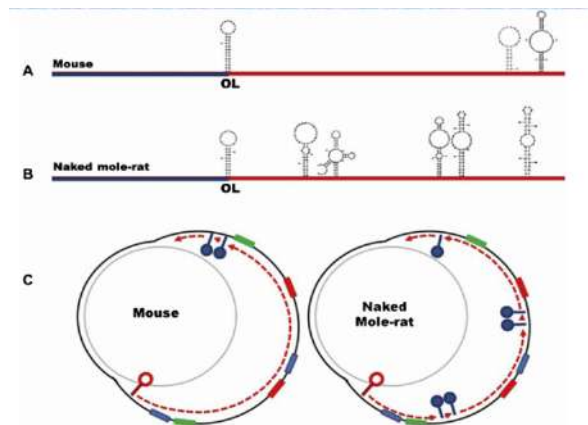


Рис. 2.16. Сравнение мтДНК мыши и мтДНК землекопа

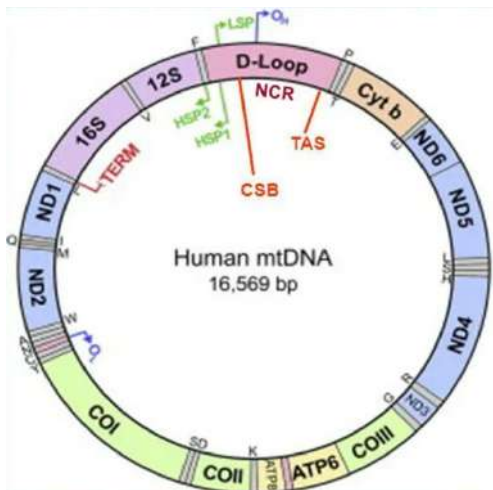


Рис. 2.17. МтДНК человека

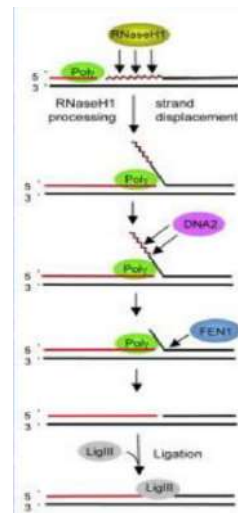


Рис. 2.18. Удаление РНК-праймеров

В удалении РНК-праймеров участвует РНКаза *H1*. Возможно также участие хеликазы *DNA2* эндонуклеазы *FEN1*: если *Pol γ* встречает на своем пути РНК-затравку, не удаленную РНКазой *H*, формируется *flap*-структура содержащая РНК. РНК затем удаляется хеликазой *DNA2* и *Flap*-эндонуклеазой *FEN1*. Затем лигаза сшивает разрыв в цепи.

1. При репликации РНК-праймеры для ДНК-полимеразы синтезирует РНК-полимераза *POLRMT*.
2. На *Ori H* синтез РНК-праймера начинается с *LSP* и terminates в *CSB II* за счет образования *G*-квадруплекса.
3. Образованию квадруплекса препятствует белок *TEFM* – он является ключевым фактором в переключении с репликации на транскрипцию.
4. Инициация репликации L-цепи происходит на шпильке в *Ori L*.

5. РНК-праймеры удаляются РНКазой *H1* или, возможно, с участием хеликазы *DNA2* и эндонуклеазы *FEN1*.

## 2.2. Модели репликации мтДНК

### Модель репликации мтДНК.

На рисунке 2.11 была рассмотрена асинхронная модель мтДНК.

Существует несколько моделей репликаций для разных геномов. Для кольцевой вирусной ДНК следующая модель: вносится одноцепочечный разрыв и конец достраивается и нарезается специальными ферментами. Модель кольцевой бактериальной ДНК: есть плазмиды и геномы, в которых ориджин работает в одну сторону – одна цепь отстающая, другая лидирующая. Для ДНК эукариотов: много ориджинов.

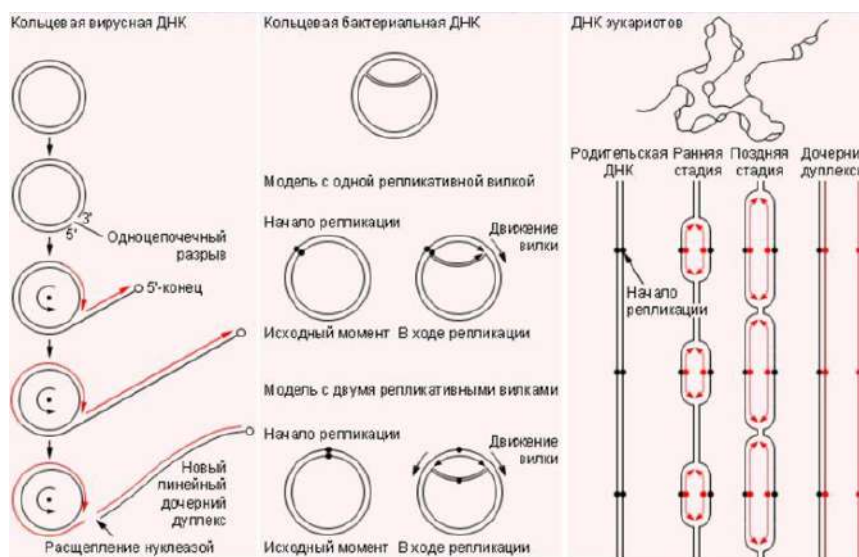


Рис. 2.20. Модели репликации мтДНК

Выих



Рис. 2.21. Лидирующая и отстающая цепи в модели с репликативной вилкой

Первая модель репликации мтДНК – Strand displacement model предложена в 1982 г. (Clayton D.A.,1982). В ЭМ наблюдали структуры с протяженными оц участками,

показана чувствительность продуктов репликации к нуклеазам, расщепляющим только оцДНК. Репликация начинается в *ORI H* и *ORI L*.

С развитием методов микроскопии и молекулярной биологии (двумерный электрофорез с разделением по размеру и конфигурации) было обнаружено, что среди промежуточных продуктов репликации есть тета- структуры. Найдены дополнительные ориджины репликации.

Позже предложена модель Strand-coupled model (Yasukawa et al., 2005). Показана чувствительность продуктов репликации к РНКазам и выделены ДНК-РНК гибриды.

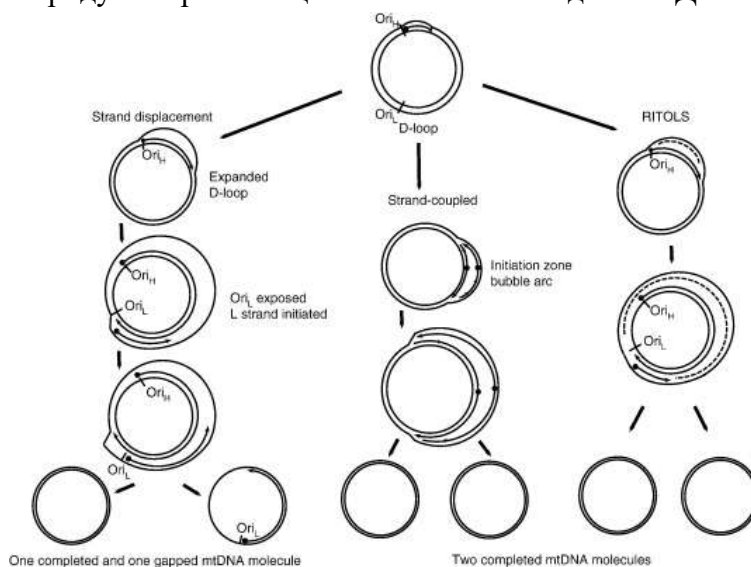


Рис. 2.20. Модели репликации мтДНК

Таким образом, существует 3 модели репликации мтДНК:

1. Strand displacement model – однонаправленный ассиметричный синтез.
2. Strand-coupled model – двунаправленный синтез с образованием  $\Theta$ -структур.
3. RITOLS (RNA Incorporated Through Out Lagging Strand) – промежуточные продукты содержат протяженные участки РНК.

### Двумерный электрофорез.

Двумерный электрофорез – основной метод исследования промежуточных продуктов репликации.

Процесс двумерного электрофореза заключается в выделении мтДНК, в котором идет репликация. Далее мтДНК разделяется на части (необходимо получить перекрывающиеся фрагменты, чтобы при сложении было понятно, как происходит репликация по всему геному). Рассмотрим на примере одной полоски мтДНК, которая разделена на три фрагмента. С помощью 0.4% агарозного геля делается форе́з (около 20 часов) – молекулы при таких условиях разделяются только по размеру. Далее вырезается данная полоска мтДНК и разворачивается на 90 градусов, кладется в новый гель и заливается 1% агарозным гелем. В этих условиях форе́з делается 6 часов. Таким образом, каждая полоска становится «дугой». Дуги образуются, потому что каждая полоска содержит набор тех репликатов, которые есть во фрагменте.

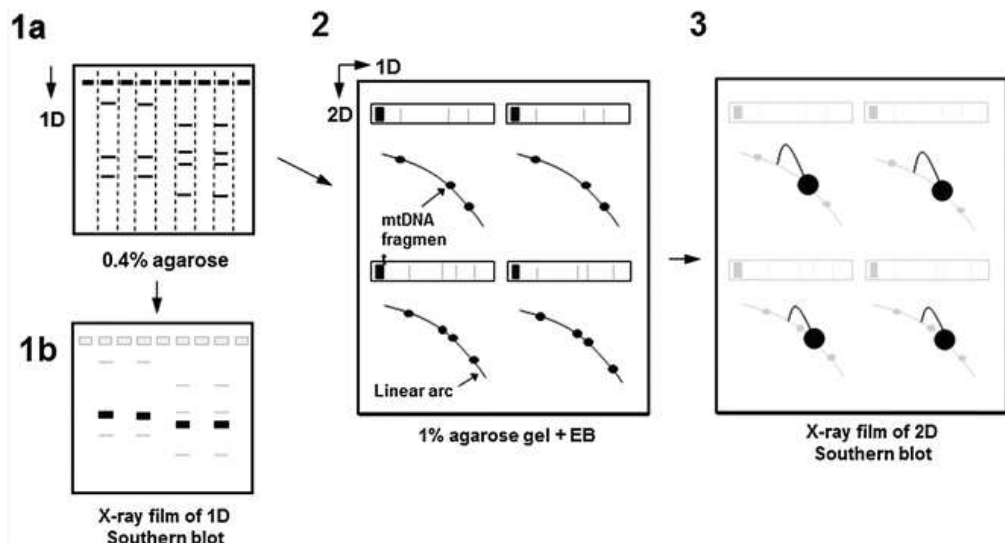


Рис. 2.20. Двумерный электрофорез

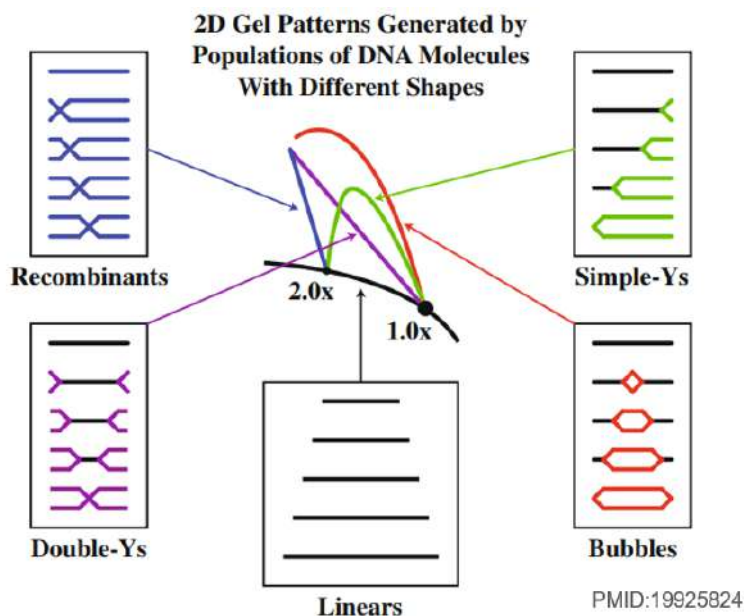


Рис. 2.21. 2D Гелевые узоры, созданные молекулами ДНК

При репликации могут быть не только линейные структуры, но и другие формы структур (рис. 2.21). Цветами (черным, синим, красным и желтым) показаны формы дуг, которые получаются в различных структурах.

На рисунке 2.22 *A* показана аналогичная схема электрофореза. На рисунке 2.22 *B* показан случай, если репликация шла таким образом, что ориджин попадает в центр, то получится дуга, которая называется *Bubble arc*. Если ориджин попадает сбоку, то появится дуга *Y arc*. Обе ситуации соответствуют синхронной репликации. В модели RITOLS (2.22 *D*) получается дуга *SMY arc*: в исходном фрагменте только по одной цепи идет репликация (во второй РНК-гибрид (показано красным цветом), там репликации

нет). Фрагмент не порежется, тогда получится двуцепочечная ДНК и длинная одноцепочечная РНК. Из-за этого фрагмент имеет другую подвижность.

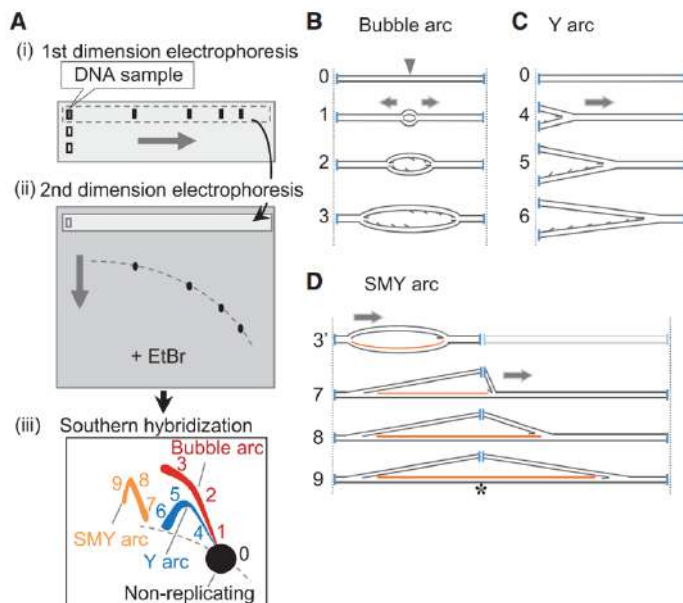


Рис. 2.22. Электрофорез мтДНК

Таким образом, существует две асинхронные модели: первая – идет синтез одной цепи, другая цепь – одноцепочечная; вторая: синтез одной цепи, а другая одноцепочечная в гибриде с РНК. Так же существует обычная синхронная модель. Ее особенность в том, что одна вилка останавливается в *ORI H*. В итоге получаются две симметричные молекулы.

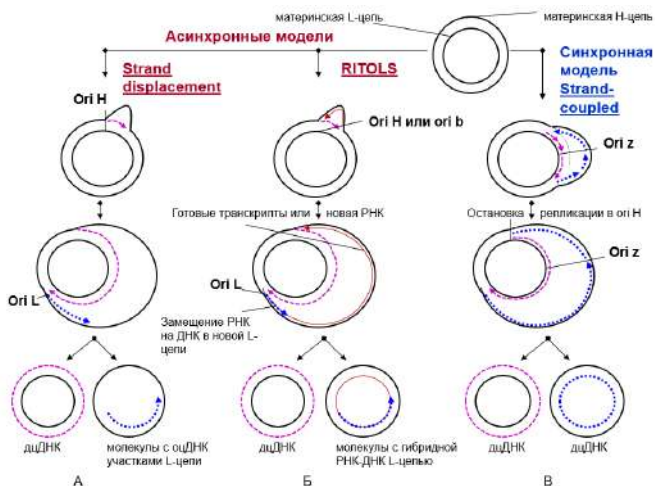


Рис. 2.22. Электрофорез мтДНК

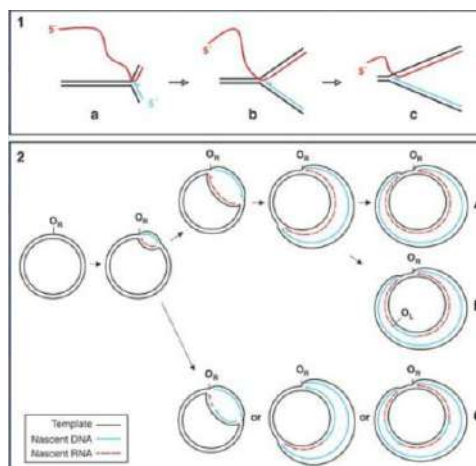


Рис. 2.23. RITOLS (RNA Incorporated Through Out Lagging Strand)

Образование РНК: синтезируется как РНК-праймер. Ранее образованная РНК продевается через репликативный комплекс, гибридизуясь с материнской цепью ДНК.

Репликация инициируется вблизи *ORI H*, отстающая цепь состоит из РНК, затем заменяется на ДНК:

- Печень цыпленка: А+С.
- Печень мыши: В.

Видимо, единой модели репликации мтДНК не существует:

- Асинхронная преобладает в культивируемых клетках, в печени и почках.
- Синхронная преобладает в скелетных мышцах, сердце, в клетках, восстанавливающих мтДНК после потери.

Существует еще один метод: Mito-SMARD: Single-Molecule Analysis of Replicating mtDNA.

Существуют следующие вопросы к моделям:

1. Аргументы против *RITOLS*:

- Белок *SSB* плотно покрывает материнскую *H*-цепь во время репликации.
- В митохондриях показано наличие РНКазы *HI*.

2. Переключение с синтеза РНК на синтез ДНК в *CSBIL* не объясняет существование ковалентных РНК-ДНК гибридов, у которых точка перехода между РНК и ДНК находится либо в *O<sub>H</sub>*, либо в *ori b*.

3. Процесс работы *ori b*: *Ori b* – это однонаправленная или двунаправленная репликация:

- открыт как двунаправленный;
- по анализу промежуточных репликативных структур с него начинается асинхронный однонаправленный синтез *H*-цепи.

1. *Ori b* может функционировать в обеих моделях репликации – синхронной и асинхронной. Поскольку широкая зона инициации *ori z* включает в себя и *ori b*, можно предположить, что в некоторых случаях область инициации сужается.

2. При репликации по механизму *Bootlace-SA replication* или *RITOLS* образующие отстающую цепь фрагменты РНК так быстро замещаются на ДНК, что промежуточные структуры выглядят как при репликации по механизму *Strand-coupled model*.

Таким образом, остается непонятным, существует ли единая модель репликации мтДНК:

- для асинхронной модели имеется больше доказательств. Не понятно, в каком виде находится материнская *H*-цепь – связана ли она с *SSB* или с РНК.
- репликация по синхронной модели, видимо, возможна *in vitro*, а также в тех случаях, когда требуется быстро увеличить количество мтДНК (в скелетных мышцах, сердце, в клетках, восстанавливающих мтДНК после потери).



## Лекция 3. Ферменты, участвующие в репликации в митохондриях

### 3.1. Ферменты, участвующие в репликации в митохондриях

Ферменты репликации мтДНК:

- DNA pol  $\gamma$ ;
- Mt SSB – single strand DNA binding protein;
- Mt DNA helicase TWINKLE;
- Topoisomerases;
- RNase H1;
- Ligase III.

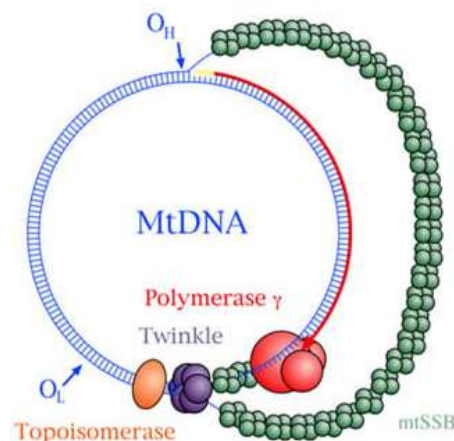


Рис. 3.1. Ферменты репликации мтДНК

#### ДНК полимеразы $\gamma$ .

Каталитическая субъединица – 140 кДа (ген *POLG*). Так как субъединица вирусная, она имеет дополнительные активности (кроме того, что она включает нуклеотиды в ново синтезированную цепь):

- 3'→5' экзонуклеазная активность: мутации у дрожжей, нарушающие эту активность, приводят к  $\uparrow$  частоты мутаций в 1440 раз;
- активность обратной транскриптазы;
- 5' →3' дезоксирибофосфат лиазная активность.

Дополнительные субъединицы (бледно-голубая и ярко-голубая субъединицы):

- димер из двух белков по 55 кДа (ген *POLG2*);
- важны для связывания с ДНК и продолжения синтеза.

Существует митохондриальное заболевание – хроническая прогрессирующая офтальмоплегия (СРЕО) – результат мутаций в генах *POLG* и *POLG2*. При этой болезни возникают неврологические нарушения, а так же другие мелкие нарушения (без нарушения когнитивных способностей). На рисунке 3.3 у женщины есть нарушение верхних мышц век (они нависают на глаза), а также при такой болезни характерно расходящееся косоглазие.

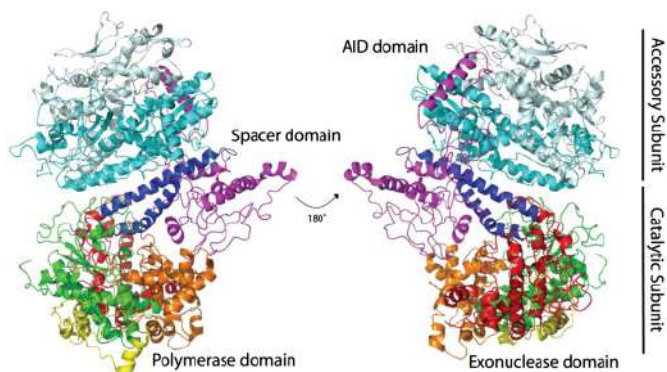


Рис. 3.2. ДНК полимеразы  $\gamma$



Рис. 3.3. Хроническая прогрессирующая офтальмоплегия

### Устройство каталитической субъединицы.

Каталитическая субъединица состоит из:

- N-концевой экзонуклеазный домен;
- C-концевой полимеразный домен;
- Спейсер: 2 субдомена –
  1. IP (intrinsic processivity).
  2. AID (accessory-interacting determinant).

Спейсер необходим для того, чтобы дополнительные субъединицы крепились через  $\alpha$ -спираль. Организмы, у которых его нет, лишены и дополнительных субъединиц.

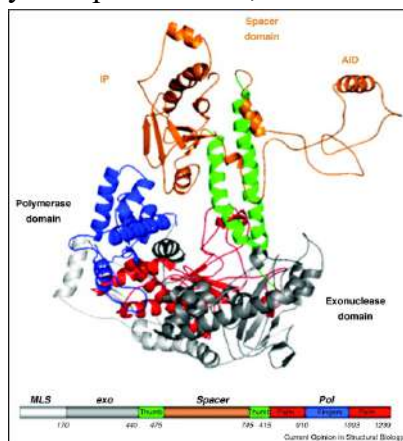


Рис. 3.4. Каталитическая субъединица

### Устройство дополнительной субъединицы.

Дополнительные субъединицы p55 имеют разные функции:

1. Проксимальная –  $\uparrow$  аффинность связывания с ДНК

2. Дистальная – увеличивает скорость полимеразной реакции. Связан с p140 двумя остатками:  
Glu394 → Arg 232 p140  
Arg122 → Gln540 p140

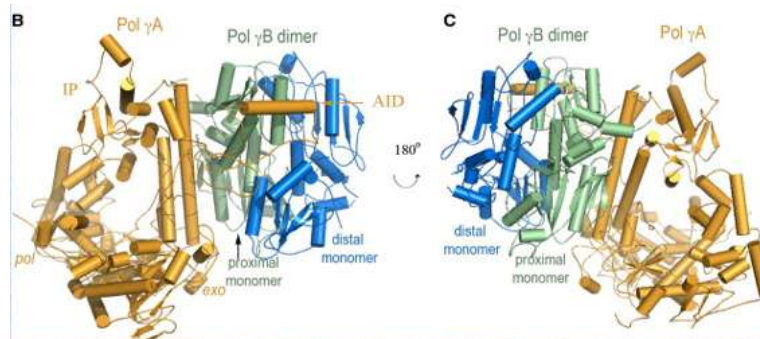


Рис. 3.4. Каталитическая субъединица

### Рибонуклеотиды в мтДНК.

В мтДНК присутствуют рибонуклеотиды: 10-30 rNTP на 500 нуклеотидов. Это возможно:

1. Из-за неполного удаления РНК (модель *RITOLS*).
2. Из-за неверной работы ДНК-полимеразы. Когда уровень *dNTP* в митохондриях низкий, рибонуклеотиды вставляются в ДНК для поддержания репликации. Это приводит к нестабильности ДНК и нарушениям репликации.

Показана селективная дискриминация rNTP по сравнению dNTP:

- *dGTP* предпочтительнее *rGTP* в 1100 раз
- *dCTP* предпочтительнее *rCTP* в 6600 раз
- *dATP* предпочтительнее *rATP* в 9300 раз
- *dTTP* предпочтительнее *rUTP* в 77000 раз, *dTTP* предпочтительнее *dUTP* в 3 раза → Важна именно 2' OH-группа, а не CH<sub>3</sub> группа C5.

Возможные причины вставки rNTP в мт ДНК:

1. В митохондриях тканей крысы уровень rNTP много выше, чем dNTP:
  - А – в 1000 раз;
  - U – в 9-73 раза;
  - С – в 6-12 раз;
  - G – в 2-26 раз.
2. RNases H могут удалять rNTP, вставленные в ДНК:
  - *RNase H1* – в протяженных РНК-ДНК гибридах.
  - *RNase H2* – в ДНК.

В ядре активны обе эти нуклеазы, а в митохондриях присутствует только *RNase H1*. *DNA pol γ* способна проходить рибонуклеотиды при репликации, т.к. она обладает активностью обратной транскриптазы.

Но на этих нуклеотидах происходит задержка фермента.

Эффективность прохождения единичных рибонуклеотидов на матрице ДНК 51% в сравнении со 100% на матрице ДНК без вставок.

Матрице с протяженными вставками рибонуклеотидов проходятся еще менее эффективно:

- 4 рибонуклеотида – 29%;
- 8 рибонуклеотидов – 14%.

### Репарационная активность ДНК полимеразы $\gamma$ .

На рисунке 3.5 показано желтым цветом: при поражении азотистого основания существует необходимость его отрезать. Это делается специальным ферментом – гликозилазой. На его место вставляется нормальный нуклеотид. В этом процессе ДНК полимеразы  $\gamma$  расщепляет связь между фосфатом и сахаром.

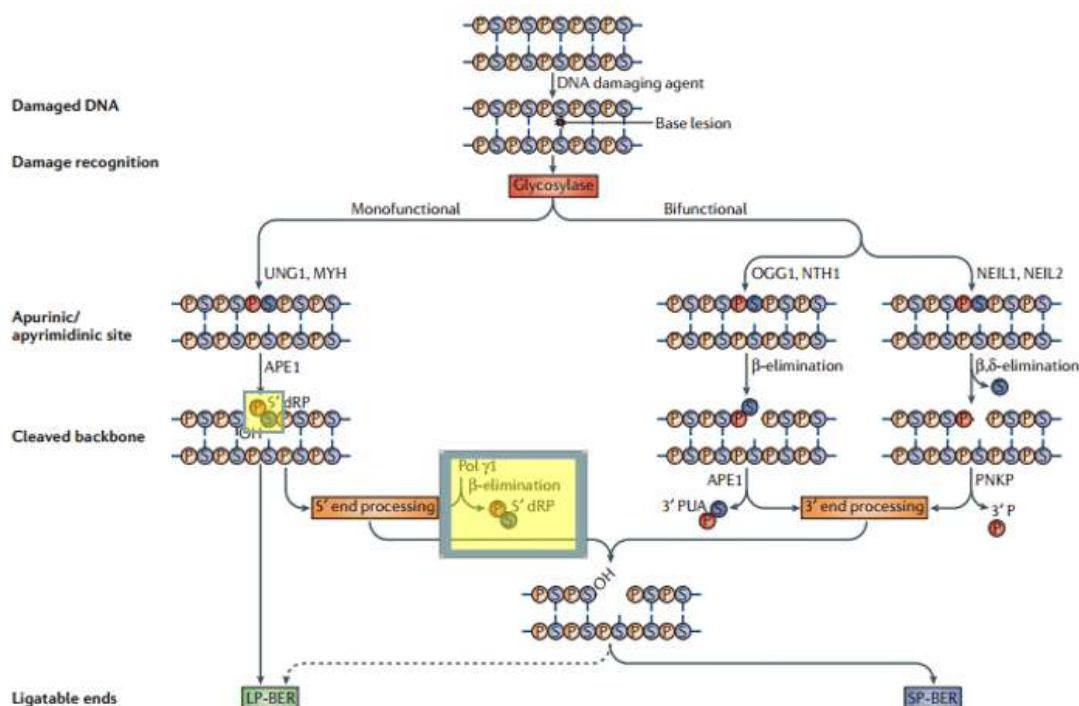


Рис. 3.5. Репарационная активность ДНК полимеразы  $\gamma$

Таким образом:

1. ДНК полимеразы  $\gamma$  состоит из одной каталитической и двух дополнительных субъединиц.
2. Каталитическая субъединица имеет гомологию с ДНК полимеразой фага T7.
3. В мтДНК присутствуют рибонуклеотиды, что возможно из-за неполного удаления РНК (модель RITOLS) или неверной работы ДНК-полимеразы.
4. При репликации *DNA pol  $\gamma$*  способна проходить рибонуклеотиды с задержкой, т.к. она обладает активностью обратной транскриптазы.
5. *DNA pol  $\gamma$*  участвует в BER (base excision repair) репарации мт ДНК.

## Хеликаза TWINKLE.

Хеликаза TWINKLE:

- гомолог С-концевого участка хеликазы-праймазы фага *T7*. Содержит 5 хеликазных мотивов в С-концевом хеликазном домене.
- в N-концевом праймазо-подобном домене у многоклеточных животных нет консервативной последовательности, ответственной за праймазную активность.
- Эта последовательность есть у некоторых организмов – например, малярийного плазмодия.

Как и хеликаза фага *T7*, *TWINKLE* гексамер или гептамер в зависимости от солевых условий и наличия кофакторов. На рисунке 3.6 показана модель димера TWINKLE: один мономер выделен желтым, другой – голубым. Линкер каждого мономера выделен красным.

*TWINKLE* колоколизована с мтДНК в нуклеоидах: при иммунофлуоресцент-ном анализе окрашиваются пятна, напоминающие мерцающие звезды.

- Трансгенные мыши с гиперэкспрессией *TWINKLE* имеют в 3 раза ↑ количество копий мтДНК в сердце и мышцах.
- ↓ экспрессии *TWINKLE* с помощью *RNAi* в культивируемых клетках человека приводит к сильному уменьшению числа копий мтДНК.

Видимо, *TWINKLE* участвует в регуляции числа копий мтДНК.

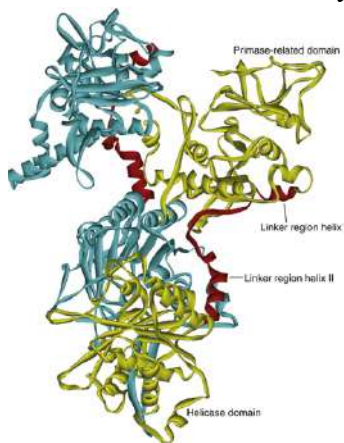


Рис. 3.6. Модель димера TWINKLE

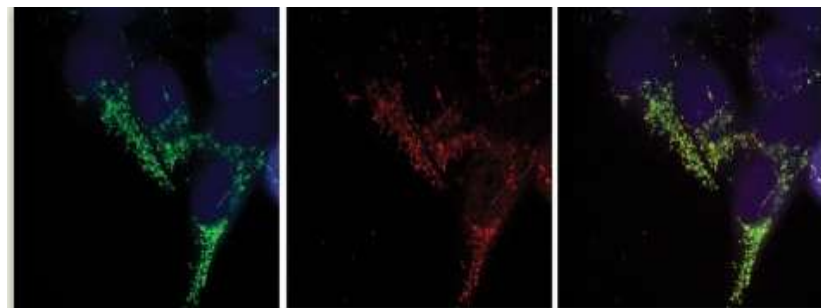


Рис. 3.7. Хеликаза TWINKLE

Название *TWINKLE* было дано из-за схожести с мерцающими звездами (рис. 3.7).

Хеликазная активность стимулируется *mtSSB*, без него может расплетать только короткие субстраты. В присутствии *mtSSB* расплетает дцДНК в вилке репликации. Некоторые мутации в *TWINKLE* выявлены при хронической офтальмоплегии.

### 3.2. Метод Mito-SMARD.

С помощью метода *Mito-SMARD: Single-Molecule Analysis of Replicating mtDNA* была попытка выяснить, что происходит с репликативной вилкой (рис. 3.9) у

лабораторных мышей с мутацией (т.е. к чему будут приводить мутации в хеликазе). На рисунке 3.9 (верхний слева) показана нормальная репликация (синтез начинается с зеленой части, потом происходит в красной, потом в синей). Если разрезать в том месте, где на рисунке ножницы, то получится обстановка, которая названа *Heavy strand*. На рисунке 3.9 (нижний слева) другая цепь начиналась с *ORI<sub>L</sub>*, поэтому получаем ситуацию *Light strand*. В случае, если вилка поломалась, и репликация дальше не происходит, то красной части получаться не будет (рис. 3.9 справа).

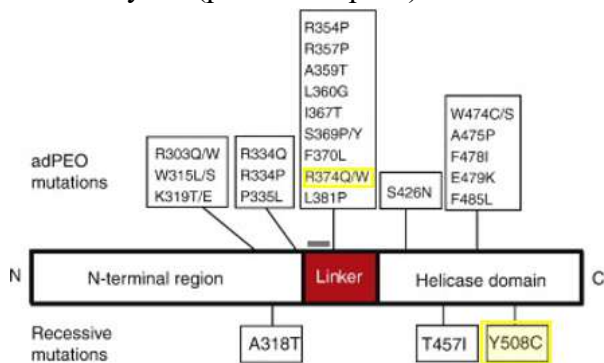


Рис. 3.8. Хеликазная активность

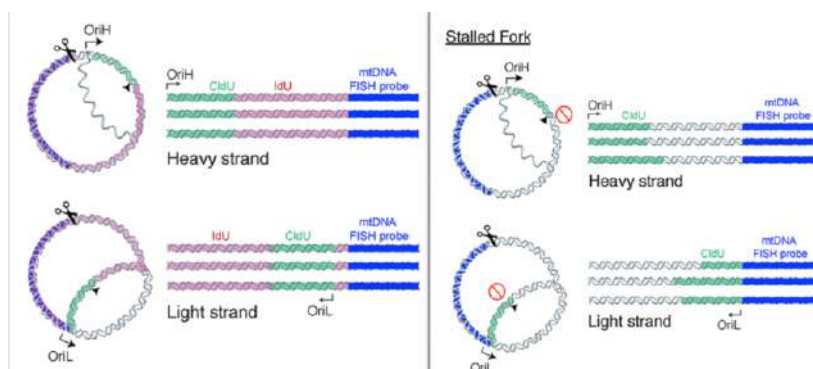


Рис. 3.9. Выявление задержки репликативной вилки при помощи метода *Mito-SMARD*

Данные реального эксперимента показаны на рисунке 3.10. В контрольных данных всегда был красный цвет, а в образцах с мутацией есть молекулы без красного цвета.

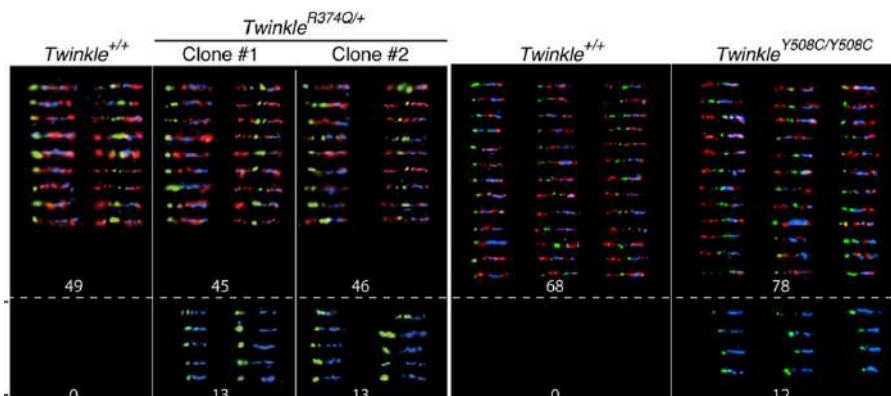


Рис. 3.10. Мутации в TWINKLE приводят к задержке вилки репликации

Существуют и другие хеликазы, которые локализованы в митохондриях:

- *hDNA2* – колокализована с мтДНК и TWINKLE в нуклеоидах. Колокализация с TWINKLE возрастает в клетках, экспрессирующих некоторые мутантные формы TWINKLE. *hDNA2* участвует в BER – репарации.
- *hSUV3* – в основном локализована в нуклеоидах митохондрий, небольшая часть – в ядре. При нокдауне у мышей наблюдается ускоренное старение. Возможно, стабилизирует мтДНК. Участвует в регуляции метаболизма РНК в митохондриях.
- *hPif1* – 2 изоформы – ядерная и митохондриальная образуются с одного гена альтернативным сплайсингом. Хеликазный домен у них общий, а С-концевой различается. Предполагается участие *hPif1* в репарации.
- *hYB-1* в ядре регулирует транскрипцию и репарацию, один из самых консервативных ДНК-связывающих белков. В митохондриях *hYB-1* участвует в MMR.

#### Single stranded DNA binding protein (SSB).

Mt SSB DNA protein 13-16 кДа у разных организмов. У человека тетрамер 56 кДа. У дрозофилы мутации вызывают дисфункции в дыхательной системе.

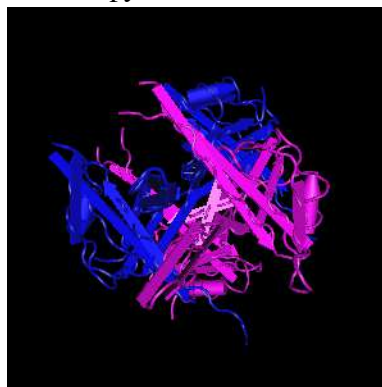


Рис. 3.11. Single stranded DNA binding protein (SSB)

Нокдаун *mtSSB* в клетках *HeLa* приводит к плавному снижению количества копий мтДНК и резкому снижению синтеза 7S ДНК.

Кроме участия в репликации, *mtSSB* играет важную роль в поддержании *D*-петли. При нокдауне *mtSSB* не обнаружено изменений в организации нуклеоидов.

*MtSSB* стимулирует активность *TWINKLE* и ДНК-полимеразы *γ* *in vitro*.

Участки, важные для этой стимуляции разные. Это означает, что механизм взаимодействия с хеликазой и полимеразой разный.

Предполагается, что *mtSSB* может координировать функции хеликазы и полимеразы.

#### Топоизомеразы.

Топоизомеразы вносят в ДНК разрыв, снимая супернапряжение внесенное за счет закрученности во время репликации и транскрипции, имеют в активном сайте *Tyr*:

- *Topo I* – одноцепочечный разрыв (IA: DNA topoisomerases III $\alpha$  and III $\beta$ , IB: DNA topoisomerase I and mitochondrial DNA topoisomerase I)
- *Topo II* – двуцепочечный разрыв (DNA topoisomerases II $\alpha$  and II $\beta$ )

В митохондриях обнаружены:

- *TOP1mt*. Она имеет собственный ядерный ген (у Позвоночных), он образовался при дупликации гена, кодирующего ядерную форму *Top1*.
- *TOP2Bmt*. Она образуется ограниченным протеолизом из ядерной формы.
- *TOP3Amt*. Она образуется при альтернативной инициации трансляции общего с ядерной формой транскрипта.

Про *TOP1mt* известно:

- Такой же фермент, как в ядре, но с «митохондриальным адресом». Участвует в инициации транскрипции.
- Нокаутные мыши жизнеспособны => в митохондриях есть и другие топоизомеразы.
- *Top1mt* не взаимодействует с ядерной ДНК.
- Ингибирование *Top1mt* вызывает снижение уровня 7S ДНК => *Top1mt* участвует в стабилизации и/или репликации 7S ДНК.
- У мышей *Top1mt*<sup>-/-</sup>/*Top1mt*<sup>-/-</sup> нормально экспрессируются митохондриальные белки.
- Но в мышечных эмбриональных фибробластах *Top1mt*<sup>-/-</sup>/*Top1mt*<sup>-/-</sup> возникают митохондриальные нарушения => *Top1mt* играет важную роль в эмбриогенезе.

*TOP1mt* является негативным регулятором транскрипции.

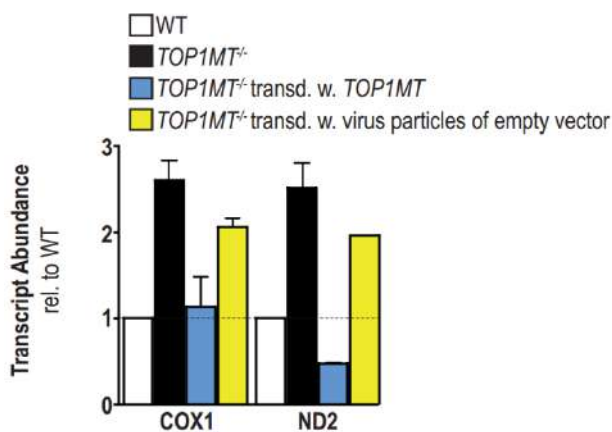


Рис. 3.12. При отсутствии *Top1mt* повышается уровень транскрипции митохондриальных генов

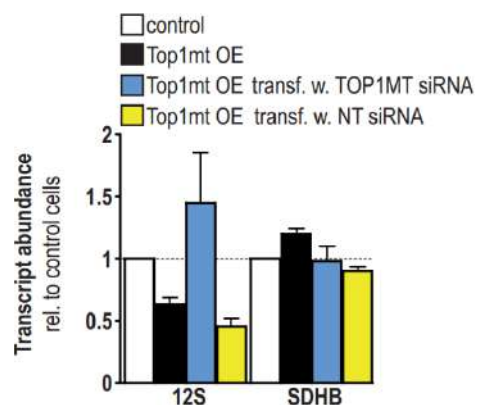


Рис. 3.13. Гиперэкспрессия *Top1mt* снижает уровень транскрипции митохондриальных генов

Гиперэкспрессия *Top1mt* нарушает работу дыхательной цепи. На графике (рис. 3.14) показано потребление кислорода и исследование разных субстратов, при добавлении которых изучалась работа дыхательной цепи. Контроль – это серые



столбики, гиперэкспрессия – черные столбики. На графике видно, что потребление кислорода снизилось. Белым цветом показан доминант-негативный мутант.

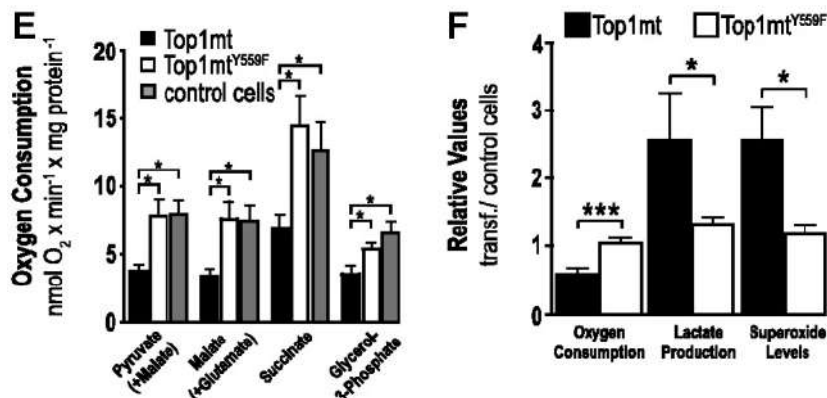


Рис. 3.14. Гиперэкспрессия *Top1mt*

На рисунке 3.14F показано, что уровень активных форм кислорода растет.

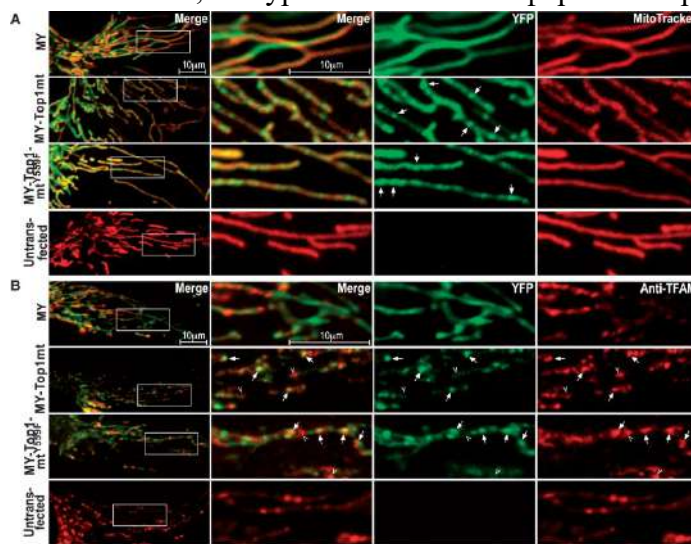


Рис. 3.15. *Top1mt* локализована в нуклеоидах

*Top1mt* связана с транскрипционно активными нуклеоидами и с *POLRMT*.

*DNA topoisomerase IIIa.*

*Top3a* – в ядре участвует в рекомбинации. Предполагается её участие в окончании репликации и/или в митохондриальной транскрипции.

*Top2B.*

- *Top2B* в ядре активирует транскрипцию.
- В митохондриях она может расплетать сплетенные в ходе репликации молекулы ДНК.
- В мышечных эмбриональных фибробластах *Top2B*-/*Top2B*- уровень транскрипции и количество сплетенных ДНК не отличается от нормы.
- А в МЭФ *Top1MT*-/*Top1MT*-*Top2B* может увеличивать уровень транскрипции.

### Терминация репликации и процессинг концов мтДНК.

Пройдя полный круг, ДНК-полимераза  $\gamma$  встречает 5'-конец синтезированной ею молекулы ДНК и «буксует». Это необходимо для нормального лигирования: ДНК-полимераза  $\gamma$  без экзонуклеазной активности не «буксует», а продолжает синтез с образованием дцДНК, которая не может быть субстратом для лигирования.

Для лигирования необходимо точное совпадение концов ДНК. Точность обеспечивается процессингом.

В нем участвуют:

- ДНК-полимераза  $\gamma$ ;
- РНКаза *H1*;
- Экзонуклеаза *MGME1*;
- ДНК лигаза  $\lambda$ .

#### РНКазы H

- *RNase H I* – уничтожение РНК в РНК-ДНК гибридах;
- *RNase H II* – удаляет отдельные rNMP, встречающиеся в ДНК.

В митохондриях найдена только РНКаза *H I*. Это тот же фермент, что работает в ядре, но с «митохондриальным адресом».

Повышенный или пониженный уровень экспрессии РНКазы *H I* в митохондриях приводит к смерти клетки.

Возможная функция: удаление РНК праймеров на ориджинах *ORI H* и *ORI L* и при синтезе фрагментов Оказаки.

#### Процессинг концов мтДНК для лигирования.

В большинстве молекул мтДНК 5'-конец (место лигирования) расположен в положении 191, место перехода РНК-праймера в ДНК картируют в разных местах: или в участке *CSB II*, или в *O<sub>H</sub>* (положение 191 или поблизости), или даже в *ori b*.

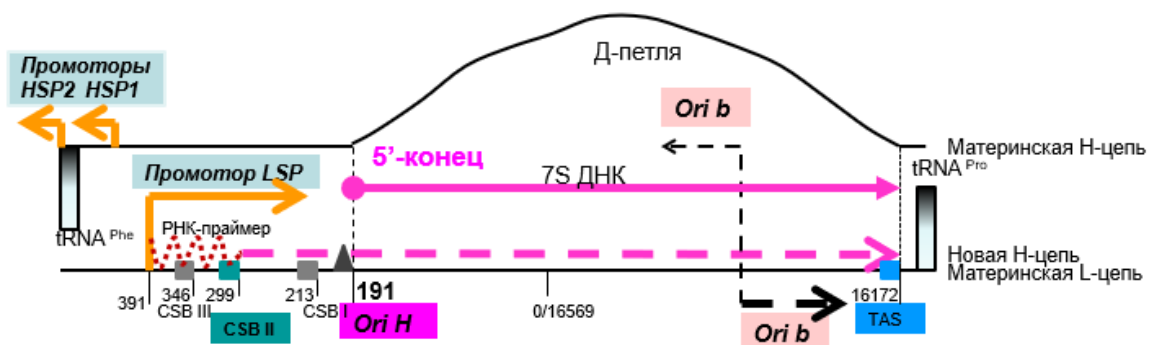


Рис. 3.16. Процессинг концов мтДНК для лигирования

В митохондриях локализован фермент *MGME1* (mitochondrial genome maintenance exonuclease 1). Мутации в экзонуклеазе *MGME1* вызывают митохондриальные болезни и множественные делеции в мтДНК. При снижении количества *MGME1* в клетках

нарушается репликация в митохондриях: накапливаются короткие продукты, увеличивается кол-во 7S ДНК.

В человеческих клетках с дефектной *MGME1* нормального лигирования не происходит, образуются линейные молекулы с делециями.

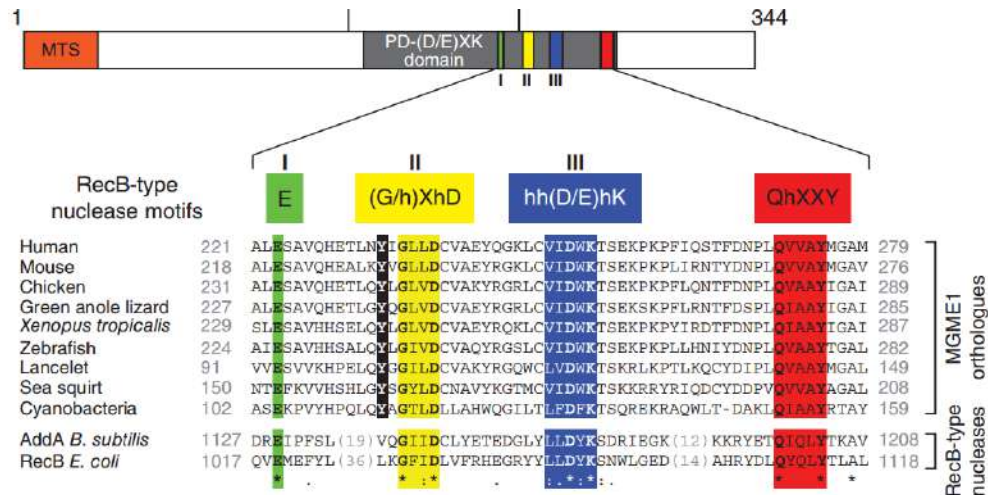


Рис. 3.17. *MGME1*(mitochondrial genome maintenance exonuclease 1)

Таким образом, Основные ферменты репликации:

1. ДНК полимеразы  $\gamma$  – вставляет нуклеотиды в новую цепь ДНК.
2. Хеликаза *TWINKLE* – расплетает дцДНК.
3. Белок SSB (Single stranded DNA binding) – связывается с оцДНК.
4. Топоизомеразы класса *Торо I (Top1mt)* и *Торо II*- вносят в ДНК разрыв, снимая супернапряжение, внесенное за счет закрученности, во время репликации и транскрипции.
5. Ферменты процессинга:
  - РНКаза *H1* – удаляет РНК праймеры;
  - Экзонуклеаза *MGME1* – укорачивает 5'-конец ДНК;
  - ДНК лигаза 3 – сшивает концы ДНК в кольцевую молекулу;
  - *Тороза* – разделяет катенаны.

## Лекция 4. Метилирование митохондриальной ДНК

### 4.1. Метилирование мтДНК

Метилирование – это модификация молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности ДНК, что можно рассматривать как часть эпигенетической составляющей генома. В основном метилируется цитозин. По сути, это контролируемая передача метильной группы (CH<sub>3</sub>) от одного вещества другому: белкам, аминокислотам, ферментам и ДНК. Донором метильных групп выступает вещество *SAM* (*S*-adenosyl-*L*-methionine). Фермент, который обладает такой активностью называется ДНК-метилтрансфераза.

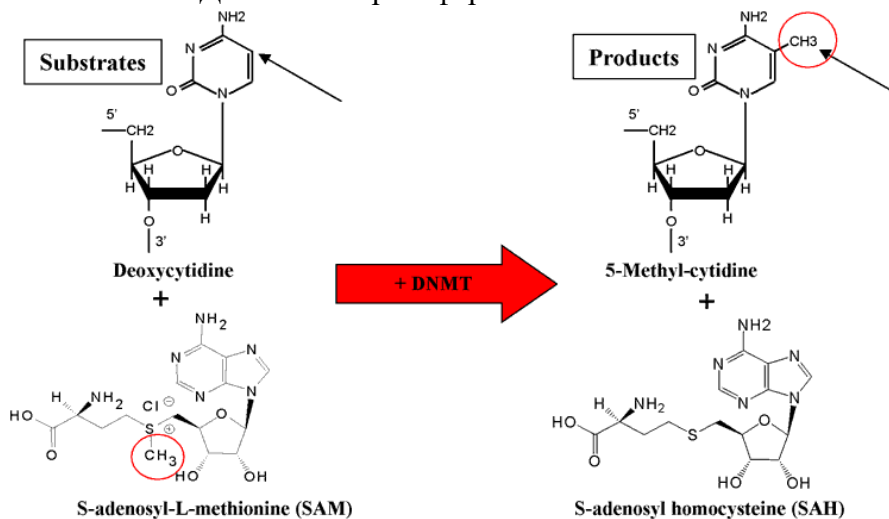


Рис. 4.1. Метилирование мтДНК

### Метилирование ядерной ДНК.

Метилирование ядерной ДНК происходит преимущественно в CpG-участках ДНК. Служит для регуляции транскрипции: метилирование ДНК в CpG-участках приводит к деацетилированию гистонов, что усиливает их связывание с ДНК.

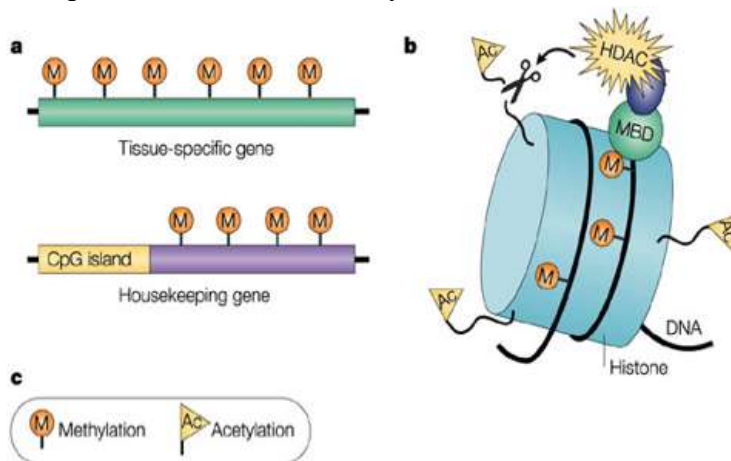


Рис. 4.2. Метилирование ядерной ДНК

Перед транскрипционно активными генами обычно существуют неметилированные CpG островки. CpG в неактивных генах обычно метилированы для подавления экспрессии.

При дезаминировании цитозина образуется урацил (рис. 4.4). Эта мутация репарируется эффективно. 5-метилцитозин при дезаминировании образует тимин. Такая замена плохо поддается репарации (только *mismatch repair*, а она крайне неэффективна).

С течением времени метилированные CpG заменяются на TpG. Это может объяснить дефицит CpG в неактивных генах.

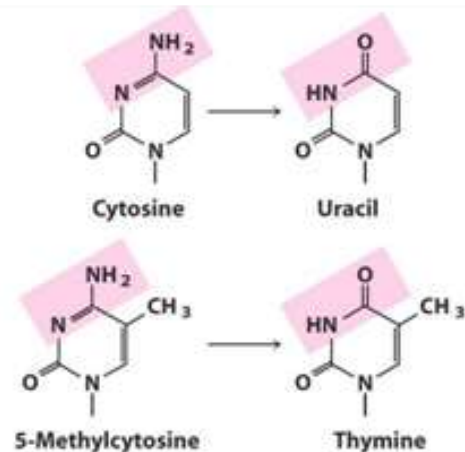
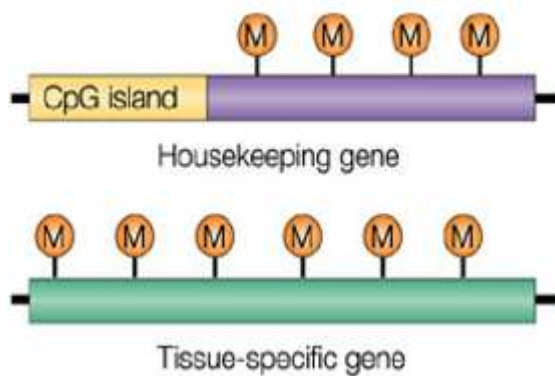


Рис. 4.3. Неметилированные CpG островки      Рис. 4.4. Дезаминирование цитозина

В ядерной ДНК при эмбриогенезе метилирование осуществляет метилазы *DNMT3a* and *3b*. Поддерживает паттерны метилирования в соматических клетках *DNMT1*.

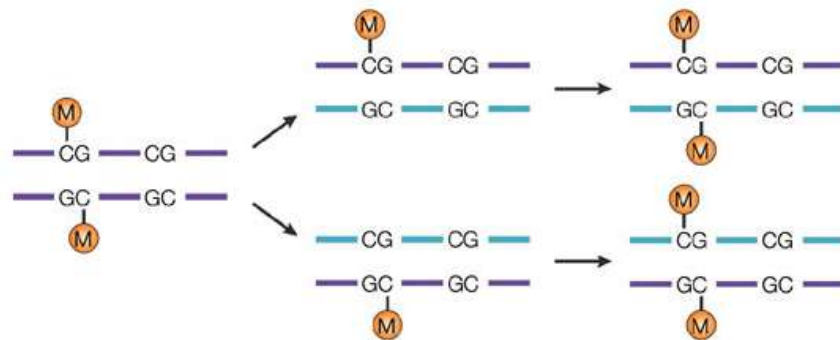


Рис. 4.5. Метилирование

Изначальные паттерны метилирования создаются ДНК метилтрансферазами *DNMT3a* и *3b*, активно работающими в эмбриогенезе. *DNMT3L*, видимо, функционирует в качестве адаптерного белка в процессе метилирования ДНК в гаметогенезе.

*DNMT3a* и *3b* (в меньшей степени *DNMT1*) обладают *de novo* метилирующей активностью. В процессе репликации образуются полуметилированные молекулы ДНК, а за восстановление и поддержание паттернов метилирования у млекопитающих отвечает *DNMT1*.

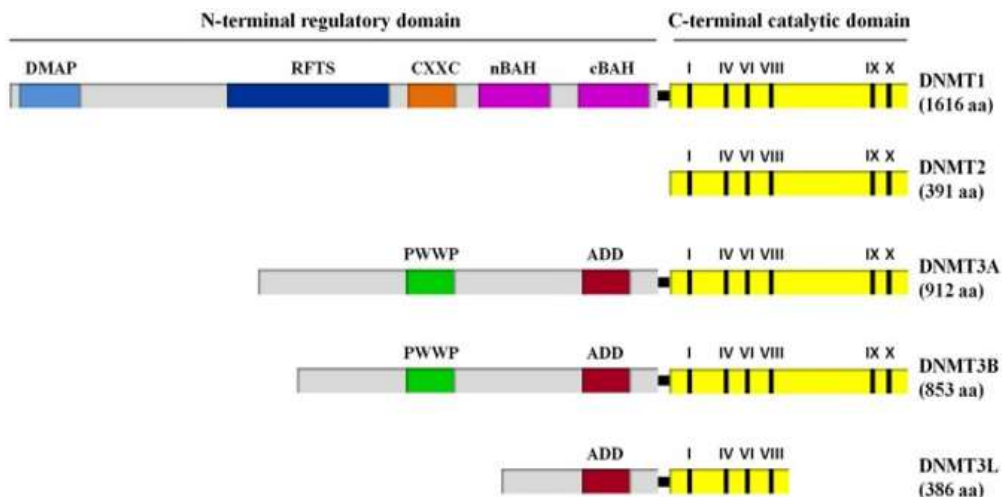


Рис. 4.6. Паттерны метилирования

Различные типы метилтрансфераз. Желтым обозначен каталитический домен. *DNMT1* содержит, по крайней мере, 3 сигнала ядерной локализации, *DMAP1* отвечает за взаимодействия *DNMT1* с репрессором транскрипции, *RFTS* – домен, направляющий *DNMT1* в точки репликации, *CXXC* – цинковый домен, нужный для узнавания неметилированных CpG-сайтов, *PBHD* – домен, состоящий *BAH1* и *BAH2* мотивов, типичный для белков, участвующих в регуляции транскрипции. Особенности *DNMT3a* и *-3b*: *PWWP* – вариативная последовательность из 100–150 аминокислот, характеризующаяся строго консервативным пролин-триптофан-триптофан-пролиновым мотивом, этот домен важен для связывания с хроматином, *ADD* – цистеин-богатый домен, связывающий ионы цинка и отвечающий за белок-белковые взаимодействия (Maresca, 2015).

Под воздействием ферментов семейства *TET* (*ten eleven translocation*) происходит окисление *5mC* с образованием 5-гидроксиметилцитозина (*5hmC*).

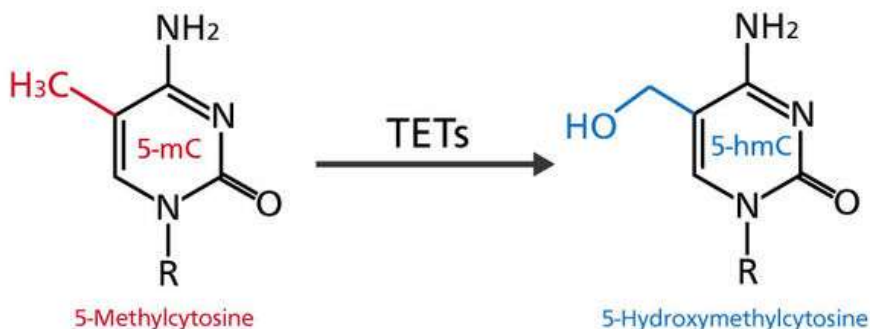


Рис. 4.7. Модификация в ДНК

Данная модификация в ДНК интересна тем, что из 5-гидроксиметилцитозина можно сделать обратно неметилированный цитозин.

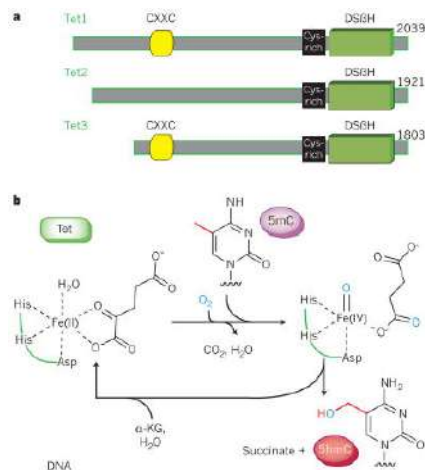


Рис. 4.8. Структура и механизм работы ферментов семейства ТЕТ (ten eleven translocation)

Метилирование цитозина обратимо и может регулироваться. Цитозин под действием DNMT (ДНК-метилтрансфераза) становится 5-метилцитозином и далее 5-гидроксиметилцитозином. Далее ТЕТ проводят две последовательные реакции (показаны справа на рисунке 4.9): получение формила-цитозина и карбонила-цитозина, а также фермент тиминДНК гликозилаза может отщепить неправильные азотистые основания. Таким образом, получается пустая дезоксирибоза, которая является субстратом для репарации клеток. В ходе цикла из 5-метилцитозина можно получить обратно цитозин. Так можно сделать в каждой точке метилирования.

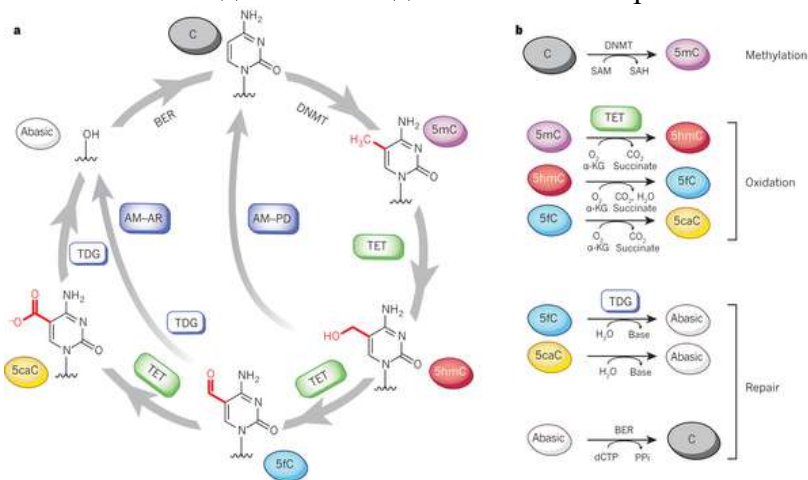


Рис. 4.9. Конечный цикл метилирования цитозина

На данный момент принята *стохастическая модель метилирования*. Метилирование в каждом сайте - результат двух противоположных процессов – метилирования и деметилирования, зависящих от:

- активности ДНК метилтрансфераз;
- ферментов семейства *TET* и *TDG*;
- состояния хроматина.

Таким образом можно тонко регулировать транскрипцию.

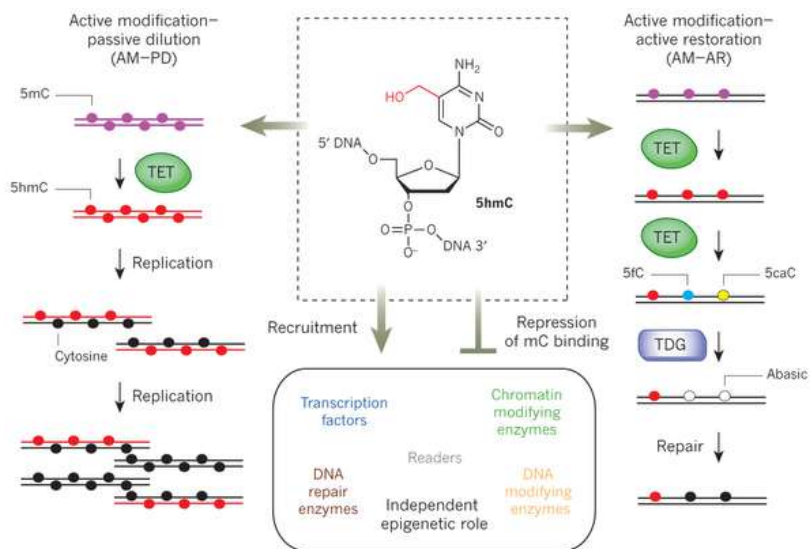


Рис. 4.10. Стохастическая модель метилирования

### Бисульфитное секвенирование.

С помощью бисульфитного секвенирования можно регистрировать метилирование цитозином. В ходе бисульфитного секвенирования берется ДНК, обрабатывается сульфитом, по итогу обработки цитозин переходит в урацил.

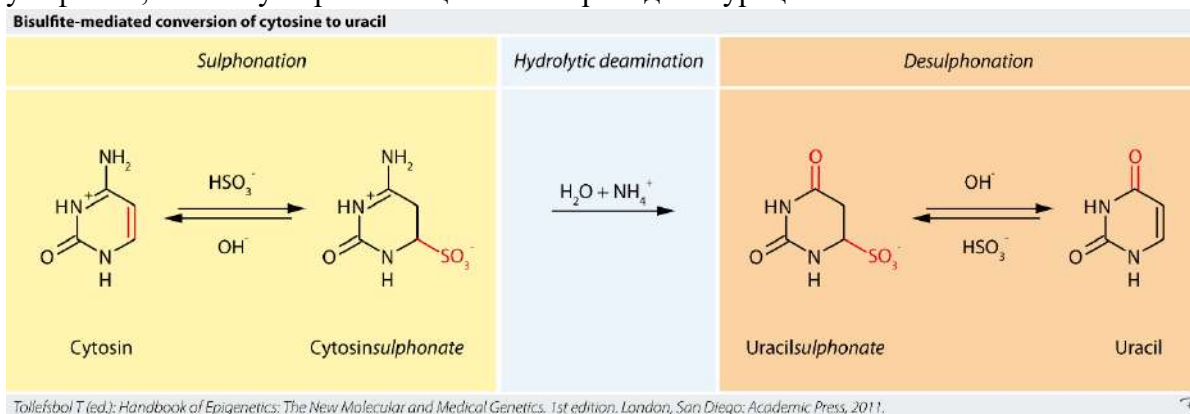


Рис. 4.11. Бисульфитного секвенирование

### Метилирование мтДНК.

Метилирование мтДНК открыто в 1974 году:

- неизвестны точные места метилирования;
- неизвестна функциональная роль метилирования.

В 2010 году определен фермент, осуществляющий метилирование мтДНК - *DNMT1* (*DNA methyltransferase 1*).

В мтДНК присутствует не только *5mC*, но и *5hmC*. Последний образуется из первого при окислении ферментами семейства *TET* (*ten-eleven translocation*).

На рисунке 4.12 показана работа, в которой была попытка рассмотреть распределение *5mC* по митохондриальному геному человека в разных клеточных линиях



и тканях. Оттенками темно-коричневого цвета показаны области, где сильно-метилировано, а светло-желтыми – области митохондриального генома, где слабо.

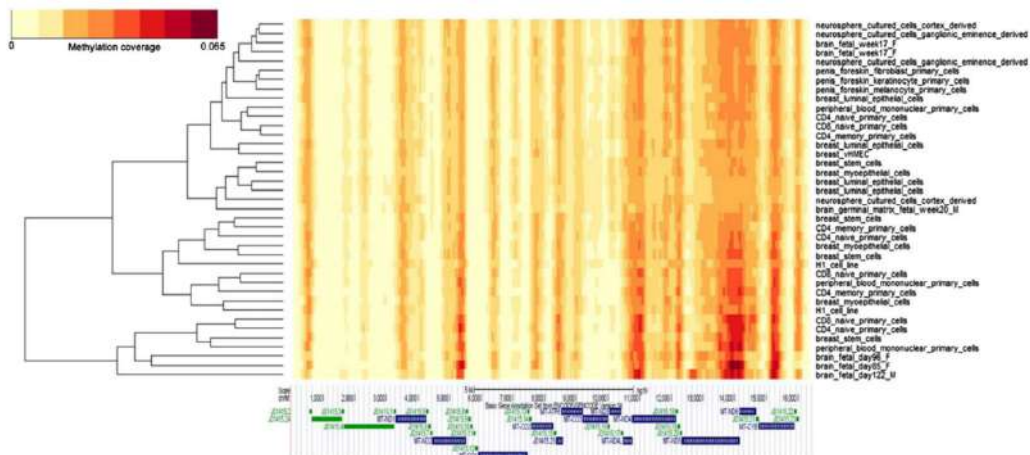


Рис. 4.12. Распределение *5mC* по митохондриальному геному человека в разных клеточных линиях и тканях

При более четком расчете было выделено три места. Т.е. профиль метилирования консервативен, за исключением трех областей (рис. 4.13):

- 14050-14150;
- 14350-14450;
- 15450-15550.

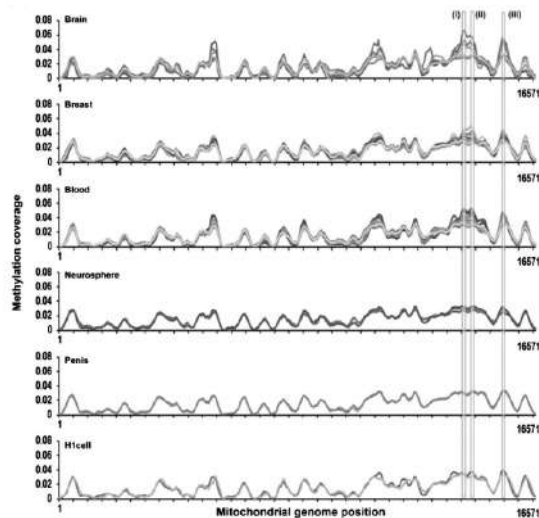


Рис. 4.13. Профиль метилирования

Метилирование мтДНК в области *D-loop* преимущественно происходит не в *CpG* последовательностях.

Метилирование в *D-loop* в основном происходит в области промоторов и *CSB* участков → возможно, метилирование регулирует транскрипцию и/или репликацию.

Одновременная инактивация *DNMT3a*, *3b* и *DNMT1* уменьшает *CpG* метилирование в *D-loop* и слабо влияет на метилирование в других сайтах.

Метилирование в эмбриональных стволовых клетках мыши<sup>^</sup>

- Wt – дикий тип;
- ТКО - тройной делетант  $Dnmt1^{-/-}$ ,  $Dnmt3a^{-/-}$ , and  $Dnmt3b^{-/-}$ .

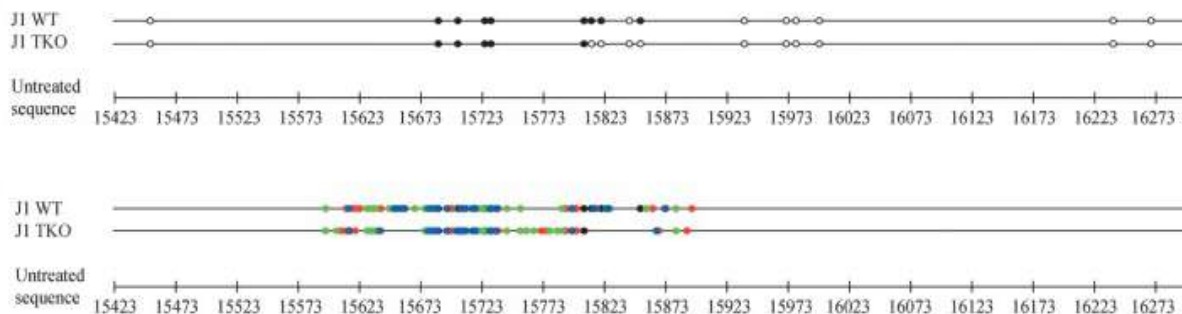


Рис. 4.14. Метилирование в эмбриональных стволовых клетках мыши

Рассмотрим еще одну работу, посвященную данной теме. Как и в ядерной ДНК в мтДНК мало динуклеотидов CpG – 435 на 16659. 4747 остатков C расположены вне CpG. CpG в некоторых регуляторных областях защищены от метилирования

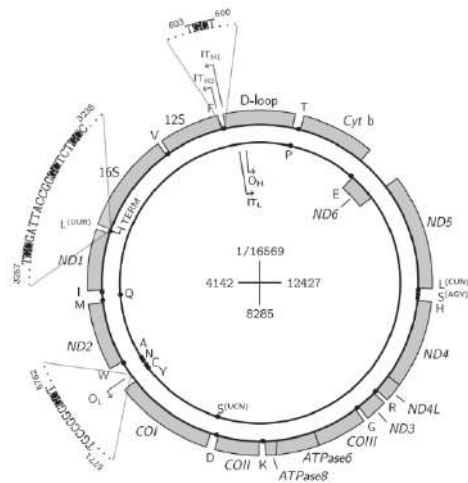


Рис. 4.15. мтДНК и CpG

Возможная регуляция транскрипции с помощью метилирования. CpG в области TERM защищены от метилирования (*in vitro*) предположительно из-за связывания с белком MTERF – основным фактором терминации транскрипции.

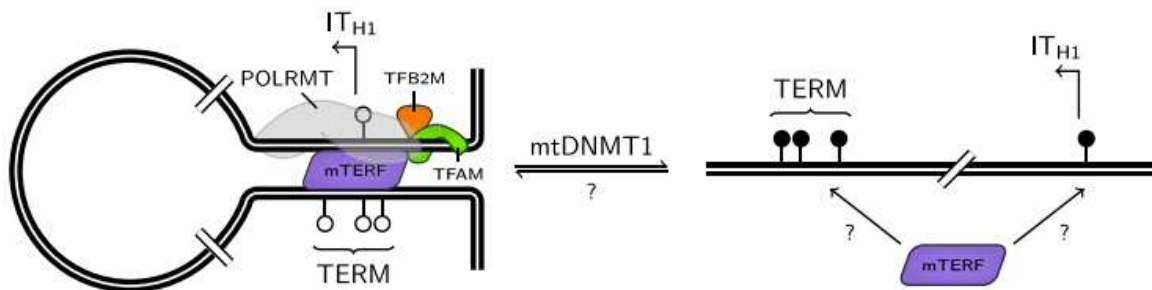


Рис. 4.16. Регуляция транскрипции

На рисунке 4.17 показана возможная регуляция репликации с помощью метилирования. В основании расположены CpG (белые), которые защищены от метилирования. Когда они стали черными (прометилювались), полимеразы не смогут начать удлинять РНК-праймер. Тогда хуже идет инициация.

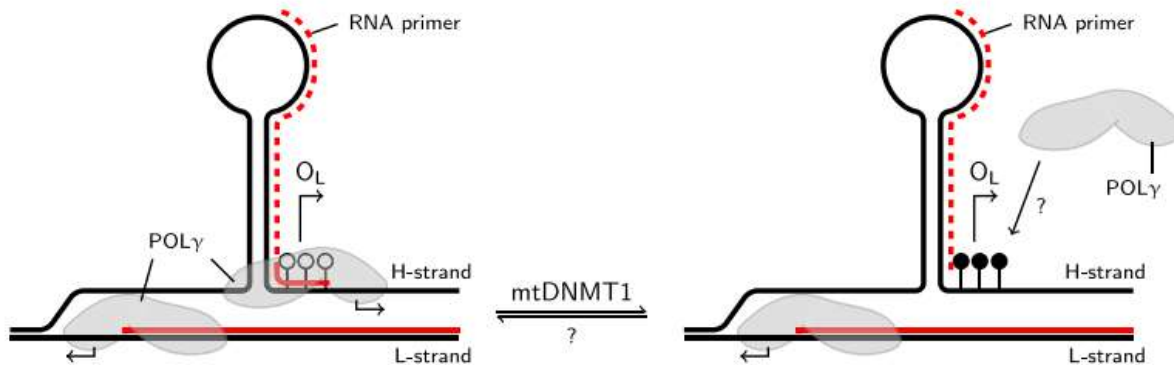
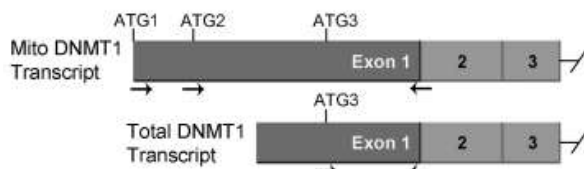


Рис. 4.16. Регуляция репликации

### Митохондриальная форма DNMT1.

Если взять ген ДНК-метилтрансферазы, то с нижнего *ATG* начинается трансляция. Когда посмотрели *Upstream*, то увидели еще одни *ATG*. Стало интересно, может ли начаться трансляция на транскрипте повыше



HUMAN DNMT1

```

X M N E C L G H R T H L P A N R G A W
lga ATG aat gaa tgc ctc ggg cac cgt gcc cac ctc cca gca aac cgt gga gct tgg
T S P L L R V G G V C A R L A H A C S L
acg agc cca ctg ctc cgc gtg ggg ggg gtg tgt gcc cgc ctt gcc cat gcc tgt tcc tca
G M A G S V P S F C T G Y R L
ggc ATG gcc GGC TCC GTT CCA TCC TTC TGC ACA GGG TAT CGC CTC
S P F G T S P P P P R P D W
TCT CCG TTT GGT ACA TCC CCT CCT CCC CCA CGC CCG GAC TGG
G G R R R L R S S P L P I G
GGT GGT AGA CGC CGC CTC CGC TCA TCG CCC CTC CCC ATC GGT
F R A K S R G A A A A A A A A
TTC CGC GCG AAA AGC CGG GGC GCC TGC GCT GCC GCC GCC GCG
S A E S A E M P A R T A P A
TCT GCT GAA GCC TCC GAG ATG CCG GCG CGT ACC GCC CCA GCC
R V P T L A V
CGG GTG CCC ACA CTG GCC GTC...
    
```

MOUSE DNMT1

```

X P G G V G A S V A R M R T P F G H S
tag cca gga ggt glg ggt gcc tcc gtl ggc cgc ATG cgc act ccc ttc ggg cat agc
M V F P H S L A L C G T C C F R L R R
ATG gtc ttc ccc cac tct ctt gcc ctg tgt ggt aca tgc tgc ttc cgc tTG CGC CGC
P L P I G F R A R E K A G V
CCC CTC CCA ATT GGT TTC CGC GCG CGC GAA AAA GCG GGG GTC
S F R A V L S S A T C K M P
TCG TTC AGA GCT GTT CTG TCG TGT GCA ACC TGC AAG ATG CCA
A R T A P A R V P A L A S
GCG CGA ACA GCT CCA GCC CGA GTG CCT GCG CTT GCC TCC...
    
```

Рис. 4.17. Митохондриальная форма DNMT1

В ходе исследования последовательность *ATG1-ATG3* приставили к зеленому белку и посмотрели, будет ли эта последовательность переносить белок в митохондрии. После трансфекции клеток стало видно, что в *CAT-GFP* белок на всей клетке, а лидерный пептид, который содержит митохондриальный адрес, слитый с *GFP* приносит в митохондрии белок. Значит последовательность работает как митохондриальный адрес.

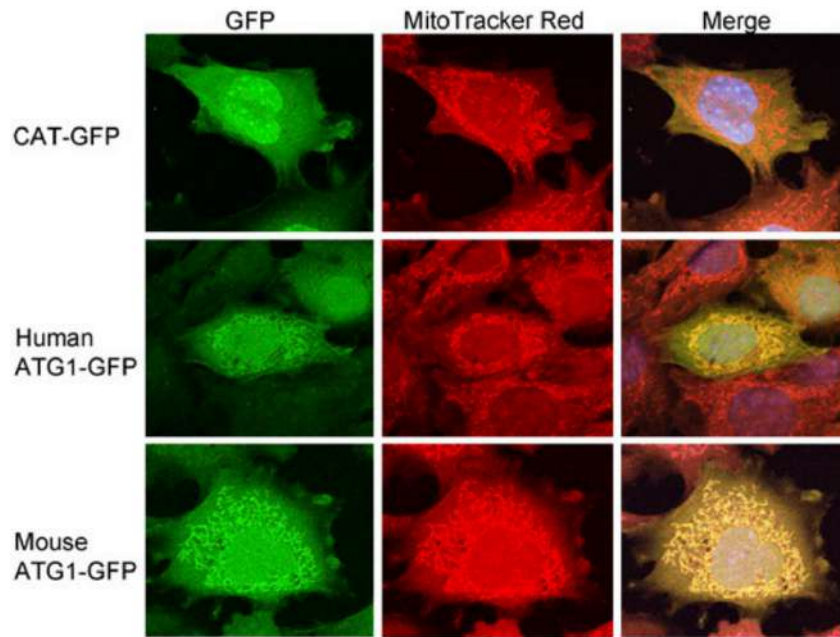


Рис. 4.18. Лидерные пептиды DNMT1 слитые с GFP локализованы в митохондриях

Однако дальше вышла другая статья, которая опровергала предыдущее исследование (рис. 4.19).

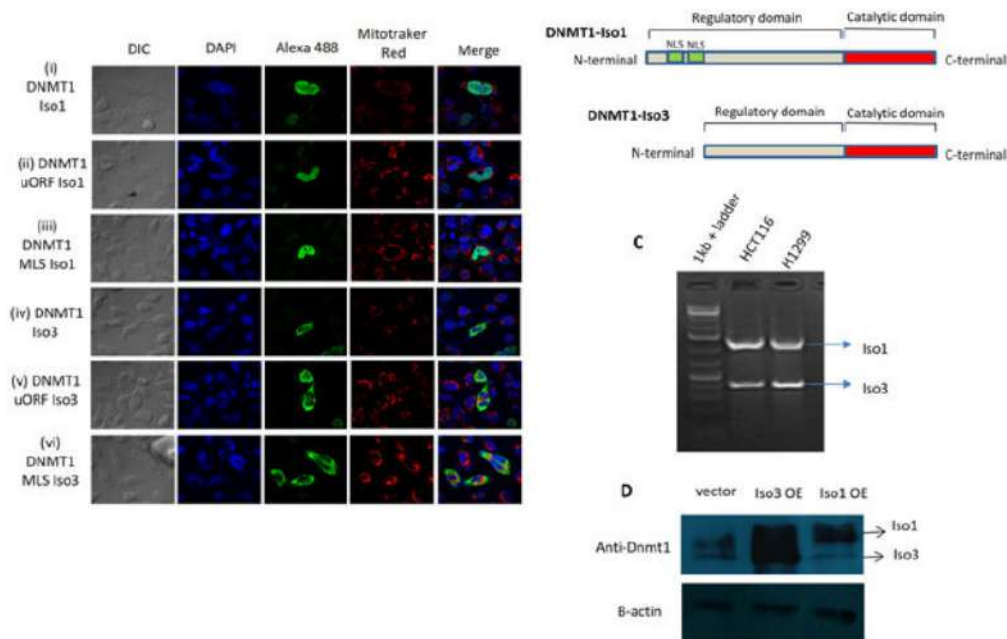


Рис. 4.19. DNMT1 имеет митохондриальную изоформу DNMT1-isoform3

### Хроматин-иммунопреципитация.

ДНК сшивается с белками, далее обрабатывается ферментами. Из этого получают кусочки хроматина по 2-3 нуклеосомы. Цветные точки в нуклеосомах – это

различные белки. К каждому белку есть антитела. Они пристраиваются к метил-трансферазе. Далее из пробы выделяется та ДНК, которая связана с белком. После этого делается количественный ПЦР, праймеры берутся к тем генам, которые хотим посмотреть (выделить).

Метилирование мтДНК DNMT1-isoform3 имеет функциональное значение. Гиперэкспрессия DNMT1-isoform3 изменяет метаболизм митохондрий:

- падает мембранный потенциал;
- увеличивается масса митохондрий;
- падает уровень АТФ;
- не меняется уровень ROS.

На графике (рис. 4.21) уровень экспрессии митохондриальных генов меняется слабо, уровень экспрессии ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, меняется.

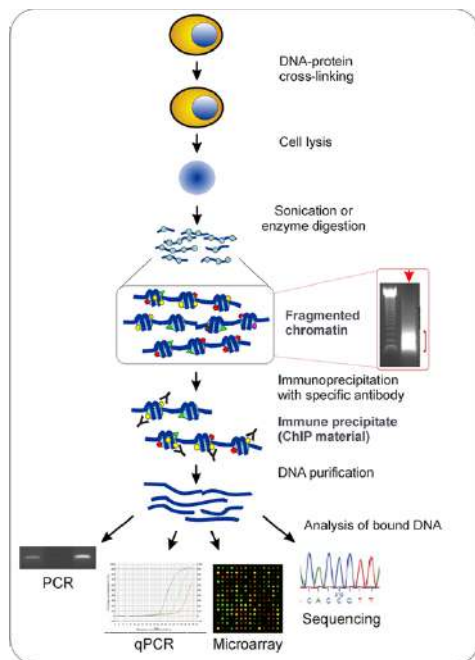


Рис. 4.20. Chromatin Immunoprecipitation

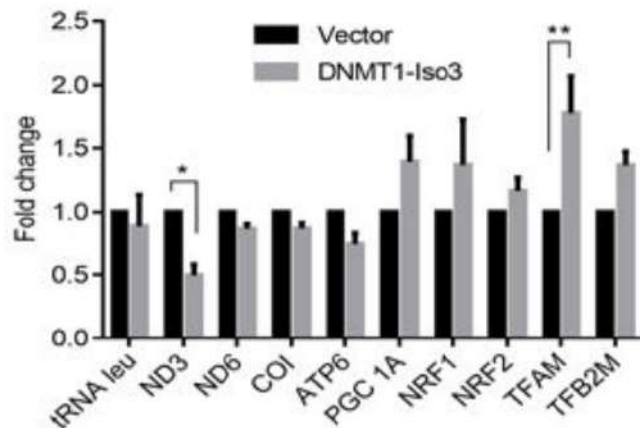


Рис. 4.21. Гиперэкспрессия DNMT1-isoform3

### Изменения в метилировании мтДНК:

- В ответ на изменения во внешней среде (загрязнение воздуха, окислительный стресс).
- Различные онкологические заболевания могут сопровождаться гиперметилированием мтДНК – мтДНК гиперметилирована при раке желудка, прямой кишки и шейки матки.
- Возможно, изменение метилирования связано со старением.
- Гиперметилирование генов *12S* рРНК, *Phe*-тРНК и области *D*-петли наблюдалось у рабочих, профессиональная деятельность которых связана с длительной работой на загрязненном воздухе.

- Экспрессия *mtDNMT1* регулируется факторами транскрипции, активирующимися при окислительном стрессе:
  - *NRF1* - Nuclear respiratory factor 1
  - *PGC1α* - PPAR $\gamma$  (peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) co-activator-1 $\alpha$ .
- окислительный стресс  $\Rightarrow$  *PGC1α*  $\uparrow$   $\Rightarrow$  *NRF1*  $\uparrow$   $\Rightarrow$  транскрипция многих ядерных генов, продукты которых работают в митохондриях  $\uparrow$  (в том числе и *dnmt1*).

Возможная связь метилирования мтДНК со старением:

Метилирование цитозина в тканях мозга человека уменьшается в соответствии со стадией развития в областях перед генами – *ND6* и *ATP6*.

В мтДНК из коры мозга мышей с возрастом увеличивается количество *5hmC*, но не *5mC*. В мозжечке таких изменений нет. При этом количество транскриптов митохондриальных генов *ND2*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* и *ND6* с возрастом увеличивается в коре, но не в мозжечке. Связаны ли между собой увеличение *5hmC* и возрастание уровня транскрипции генов, кодирующих компоненты I комплекса неясно.

Старение влияет на экспрессию генов ферментов, участвующих в образовании *5mC* - *mtDNMT1* и *5hmC* - *TET1-TET3*:

- В коре с возрастом уменьшается уровень мРНК *mtDNMT1* и не меняется уровень мРНК *TET1-TET3*.
- В мозжечке с возрастом увеличивается уровень мРНК *TET2* и *TET3* и не меняется уровень мРНК *mtDNMT1*.

Таким образом:

1. Метилирование ядерной ДНК осуществляют ферменты *DNMT3a*, *3b* и *DNMT1*.
2. Метилирование мтДНК осуществляет митохондриальная изоформа *DNMT1-isoform3*, возможно есть и другие метилтрансферазы.
3. Метилирование мтДНК в области *D-loop* преимущественно происходит не в *CpG* последовательностях.
4. Метилирование в *D*-петле в основном происходит в области промоторов и *CSB* участков.
5. Теоретически метилирование может регулировать транскрипцию и/или репликацию мтДНК.
6. Метилирование мтДНК может быть связано со старением, канцерогенезом, некоторыми заболеваниями.

#### 4.2. Взаимосвязь экспрессии ядерных и митохондриальных генов

**Как изменения в экспрессии мт-генов связаны с изменениями экспрессии генов в ядре?**

Нарушения в мтДНК, нарушения в транскрипции или трансляции, эпигенетика  $\rightarrow$  изменение экспрессии мт-генов  $\rightarrow$  изменение метаболизма митохондрии  $\rightarrow$  передача сигналов об изменениях в ядро  $\rightarrow$  изменение экспрессии ядерных генов  $\rightarrow$  канцерогенез, старение, метаболические нарушения.

При потере мтДНК в митохондриях происходят метаболические изменения, приводящие к увеличению уровня *SAM*, гиперметилованию яДНК и изменениям в экспрессии ядерных генов.

При потере мтДНК происходят:

- Изменения в метаболизме митохондрий;
- Из-за этого увеличивается уровень *SAM*;
- Это приводит гиперметилованию яДНК.

Изучение механизмов возникновения митохондриальной дисфункции при потере мтДНК:

- Изменения в транскрипции генов (*RNAseq*) разных метаболических групп;
- Эпигенетические изменения (*5mC*).

#### Модель постепенной потери мтДНК (DN-POLG).

Модель постепенной потери мтДНК (*DN-POLG*): в клетках *HEK293* индуцибельно (доксикалином) экспрессируют доминантно-негативный мутант *mtDNA polymerase gamma*. Через 9 дней мтДНК полностью исчезает.

мтДНК кодирует компоненты дыхательной цепи, поэтому при ее потере:

- Нарушается работа дыхательной цепи.
- Останавливается цикл Кребса из-за накопления *NADH*.
- Падает синтез АТФ.
- Падает мембранный потенциал.

Полная потеря мтДНК (9 день) приводит к остановке дыхательной цепи, остановке пролиферации и падению ацетилирования гистонов в ядре.

На тепловой карте (рис. 4.22) показана экспрессия генов в ядре. Кластеризация проходила по группам, исследования проводились по три повтора (в 0-й день (когда еще была мтДНК), на 3-й, 6-й и 9-й дни). Оттенки красного показывают бóльшую гиперэкспрессию, оттенки зеленого, соответственно, показывают меньшую экспрессию.

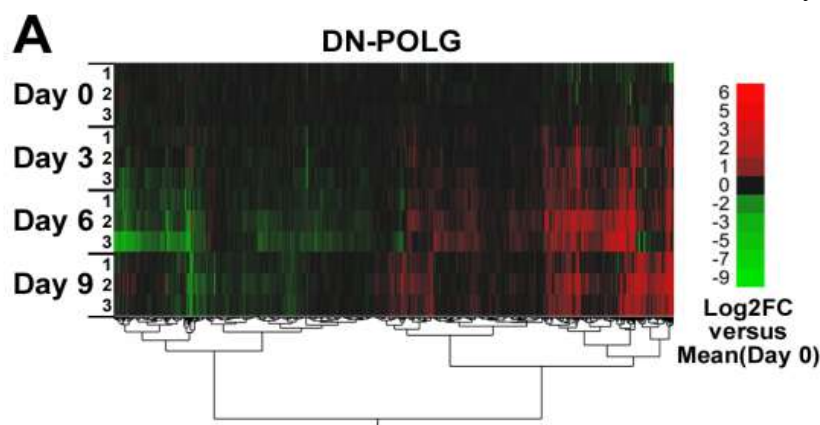


Рис. 4.22. Экспрессия генов в ядре (тепловая карта)

На 9-й день часть генов стали зелеными, часть – красными. В ходе исследования была проведена статистика изменения экспрессии генов по разным метаболическим группам и уровень метаболитов при потере мтДНК: возрастание уровня *SAM* (рис. 4.23, 4.24).

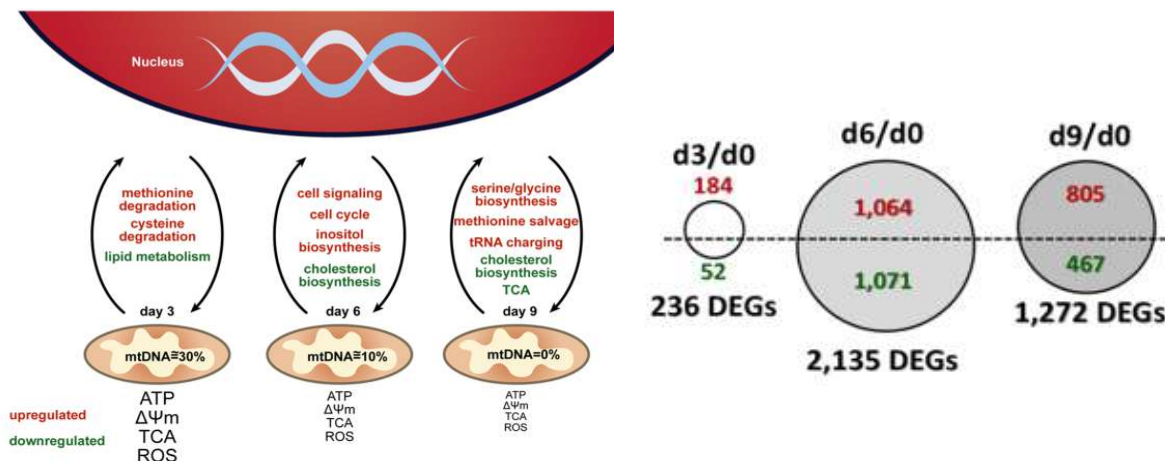


Рис. 4.23. Параметры

Рис. 4.24. Изменения экспрессии генов по разным метаболическим группам и уровень метаболитов при потере мтДНК

После этого было решено исследовать, что происходит с метилированием яДНК. В ходе исследования была построена тепловая карта (рис. 4.25С). Красным цветом обозначили сильное метилирование, зеленым – слабое.

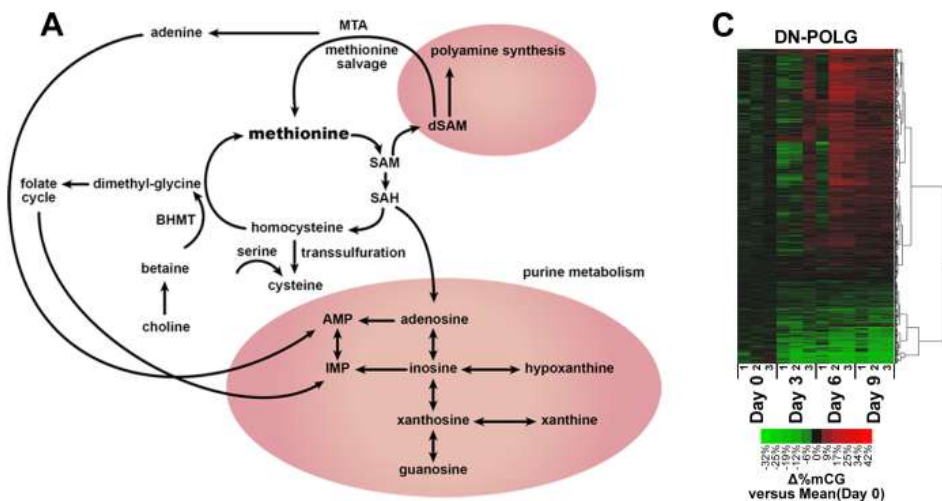


Рис. 4.25. Тепловая карта метилирования яДНК

Таким образом:

- потеря мтДНК приводит к возрастанию уровня SAM, и к гиперметилированию яДНК;
- причем есть корреляция между метилированием и изменением экспрессии генов при потере мтДНК.

Был поставлен вопрос: за счет чего происходит гиперметилирование:

- повышение активности DNMT;
- снижение активности ТЕТ.



Для проверки исследования необходимо было снизить уровень SAM и показать отсутствие гиперметилирования после этого.

Модель постепенной потери мтДНК (DN-POLG):  
 в клетках НЕК293 индуцибельно (доксициклином) экспрессируют доминантно-негативный мутант *mtDNA polymerase gamma*. Через 9 дней мтДНК полностью исчезает.

МтДНК кодирует компоненты *ETC*, поэтому при ее потере:

- Нарушается работа ETC
- Останавливается цикл Кребса из-за накопления NADH
- Падает синтез АТФ
- Падает мембранный потенциал

Полная потеря мтДНК (9 день) приводит к остановке дыхательной цепи, остановке пролиферации и падению ацетилирования гистонов в ядре

Модель восстановления цикла Кребса в DN-POLG (ND11-AOX):

Эктопическая (не Млекопитающих) экспрессия в клетках *DN-POLG* 2 белков — *NADH dehydrogenase-like 1 (ND11)* и *alternative oxidase (AOX)* приводит к окислению *NADH*. Это запускает цикл Кребса и предотвращает деацетилирование гистонов, но не восстанавливает пролиферацию.

**ND11-AOX:** *MTA*, *SAM*, *SAH* и полиамины не меняли уровень. Гиперметилирование отсутствует, изменения в экспрессии генов тоже минимальные.

**Вывод:** при потере мтДНК метаболический путь биосинтеза полиаминов и метионина через 5-метиладенозин приводит к увеличению уровня *SAM*, гиперметилированию яДНК и изменениям в экспрессии генов.

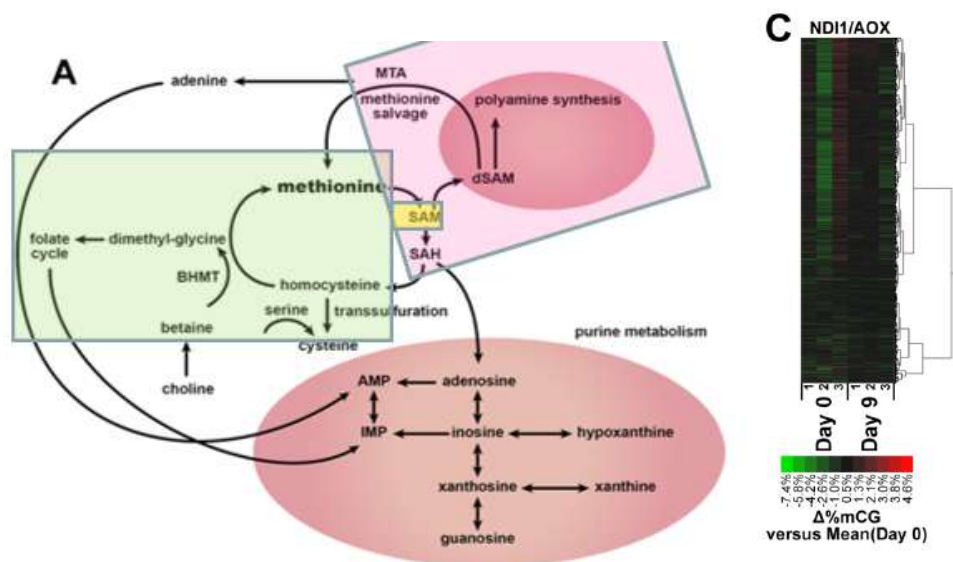


Рис. 4.26. А – биохимический путь SAM, С – тепловая карта гиперметилирования

На тепловой карте гиперметилирования (4.26 С) нет митохондриальной ДНК и *SAM* не возрастает – черные гены на карте.

### Влияние эпигенетических процессов на функционирование митохондрий.

Эпигенетические процессы вызывают возрастные нарушения в функционировании митохондрий.

Дыхательная цепь пожилых людей работает менее эффективно, чем в молодости, что приводит к формированию «старческого» фенотипа клеток.

Группе профессоров Хаяши удалось частично восстановить функционирование дыхательной цепи в клетках со «старческим» фенотипом => причиной были изменения в экспрессии генов, а не мутации.

Показали эпигенетическое снижение экспрессии ядерного гена *GCAT*, (глицин С-ацетилтрансфераза), этот фермент участвует в биосинтезе глицина в митохондриях.

Добавление глицина в среду фибробластам со «старческим» фенотипом частично восстанавливало работу дыхательной цепи.

В образовании глицина в митохондриях участвует также продукт гена *SHMT2* – сериновая гидроксиметилтрансфераза.

Сравнили количества мРНК *SHMT2* в фибробластах молодых и пожилых людей. У пожилых наблюдалось значимое снижение уровня этой мРНК.

В случае экспериментального снижения экспрессии *GCAT* и/или *SHMT2* в фибробластах молодых пациентов с помощью *shRNA* и *siRNA* соответственно, возникали нарушения в работе дыхательной цепи, характерные для «старческого фенотипа».

С возрастом происходит изменение экспрессии генов, продукты которых вовлечены в митохондриальный метаболизм, в частности, в образование глицина из серина (*SHMT2*) и L-треонина (*GCAT*).

Недостаток глицина в митохондриях => нарушения митохондриальной трансляции => формирование дефектов дыхательной цепи => «старческий фенотип».

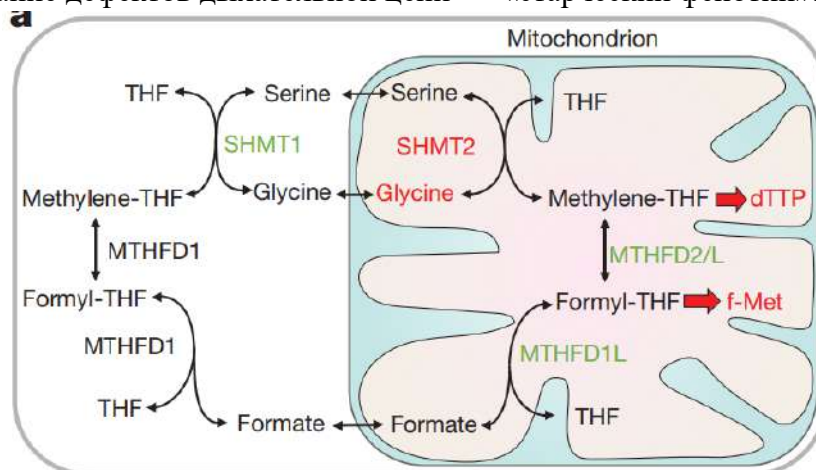


Рис. 4.27. Дыхательная цепь

*SHMT2* через образование митохондриального 5,10-метилентетрагидроfolата, служит донором метильных групп для метилирования митохондриальных тРНК.

Профайлинг митохондриальных рибосом в клетках без *SHMT2* показывает, что нарушения трансляции возникают из-за остановки рибосом преимущественно на кодонах *Lys (AAG)* и *Leu (UUG)*.

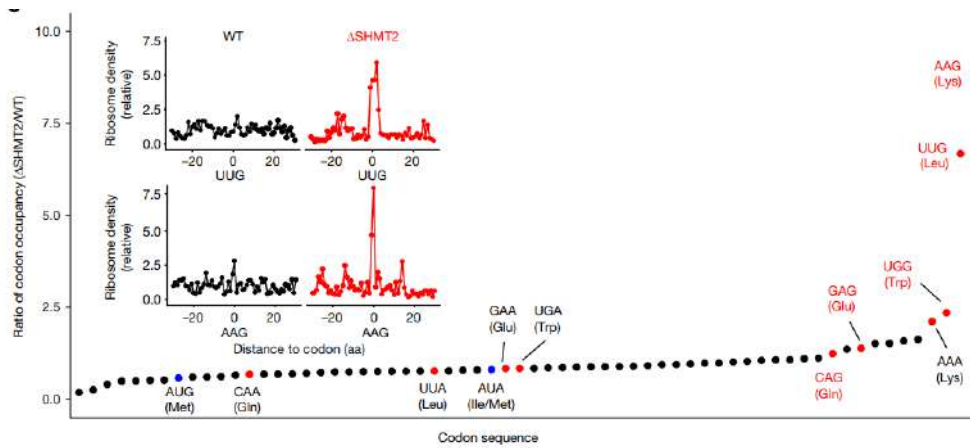


Рис. 4.28. Рибосомный профайлинг

**Выводы:**

1. Снижение экспрессии генов ферментов, участвующих в образовании метилентетрагидроfolата, приводит к нарушениям трансляции и метаболизма митохондрий.
2. 5,10-метилентетрагидроfolат служит донором метильных групп для метилирования митохондриальных тРНК с образованием 5-тауринометилуридина в положении 34.
3. Такие тРНК необходимы в митохондриальной трансляции для связывания с кодонами *NNG*.

## Лекция 5. Репарация мтДНК

### 5.1. Мутации в мтДНК

Мутации в митохондриальном геноме:

- За день в каждой клетке человека происходит 103-106 повреждений ДНК.
- В человеческом организме около  $\sim 10^{13}$  клеток.
- За сутки каждый из нас получает  $\sim 10^{17}$  повреждений ДНК.

Скорость возникновения точечных мутаций в мтДНК оценивается, примерно, как  $6 \cdot 10^{-8}$  мутаций на пару оснований в год.

МтДНК мутирует быстрее в силу того, что:

- в митохондриях повышенное содержание *ROS*;
- в митохондриях более слабый аппарат репарации;
- в митохондриях менее точный аппарат репликации.

С возрастом частота мутаций в мтДНК увеличивается примерно в 5 раз к 80-ти годам.

Наиболее распространенные продукты окислительного стресса: *8oxoG* и *8oxoA*. В нормальной человеческой клетке:  $0.3-4.2 \text{ } 8oxoG/10^6 \text{ } G$ , что соответствует  $7.7 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5 \text{ } 8oxoG$  в одной клетке. Это приводит к мутациям, так как вместо канонической пары *G-C* *8oxoG* образует пару с *A*. Это приводит к трансверсиям  $G \rightarrow T$  и  $C \rightarrow A$ .

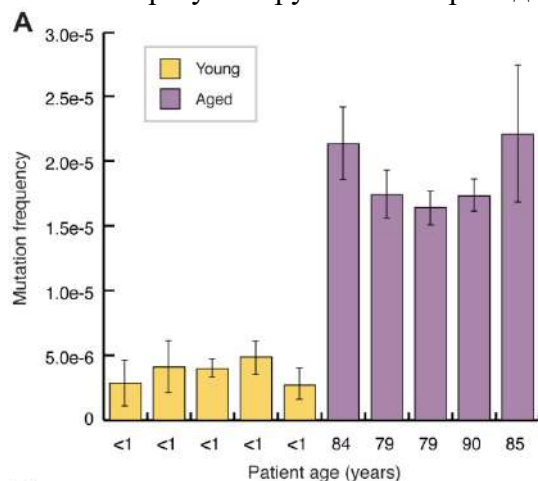


Рис. 5.1. Частота мутаций мтДНК с возрастом

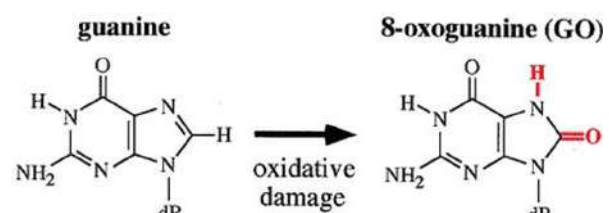


Рис. 5.2. Наиболее распространенные продукты окислительного стресса: *8oxoG* и *8oxoA*

#### Частота разных типов мутаций в мтДНК.

Частота трансверсии  $G \rightarrow T$  практически не увеличивается с возрастом также как и все остальные трансверсий, в отличие от транзиций.

*Транзиция* — одно пуриновое основание замещается на другое пуриновое (аденин на гуанин или наоборот), либо происходит аналогичная перестановка пиримидиновых оснований (тимин с цитозином).

*Трансверсия* — пуриновое основание замещается на пиримидиновое основание или наоборот.

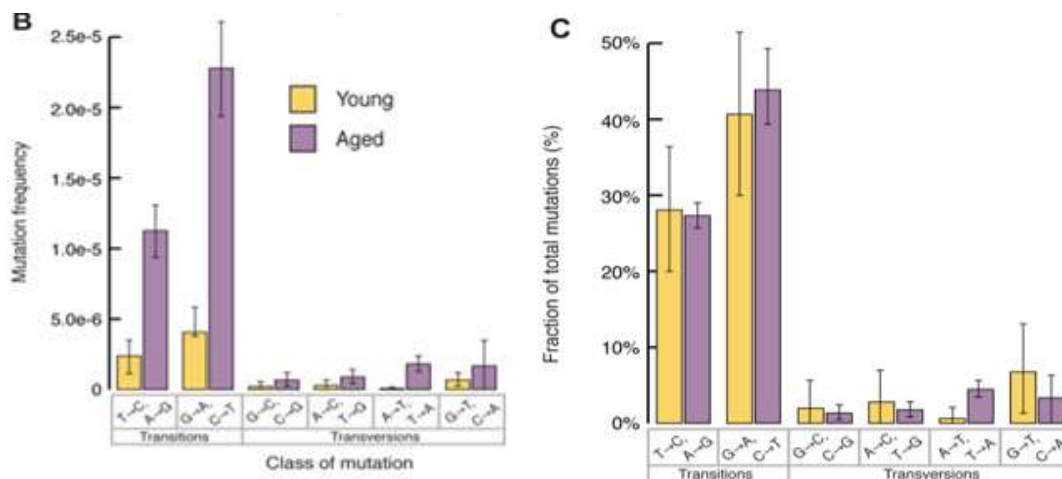


Рис. 5.3. Частота разных типов мутаций в мтДНК

Количество мутаций в мтДНК увеличивается с возрастом не за счет образования 8oxoG под действием окислительного стресса.

1.  $G \rightarrow A/C \rightarrow T$ :
  - Ошибка DNA polymerase  $\gamma$ ;
  - Дезаминирование цитозина с образованием урацила.
2.  $T \rightarrow C/A \rightarrow G$ :
  - Ошибка DNA polymerase  $\gamma$ ;
  - Дезаминирование аденозина с образованием инозина.

Если дезаминируется гуанин – это приводит к образованию ксантина. Это не приводит к транзиции. Если дезаминируется цитозин или аденин, то, через цикл репликации, это приводит к транзиции.

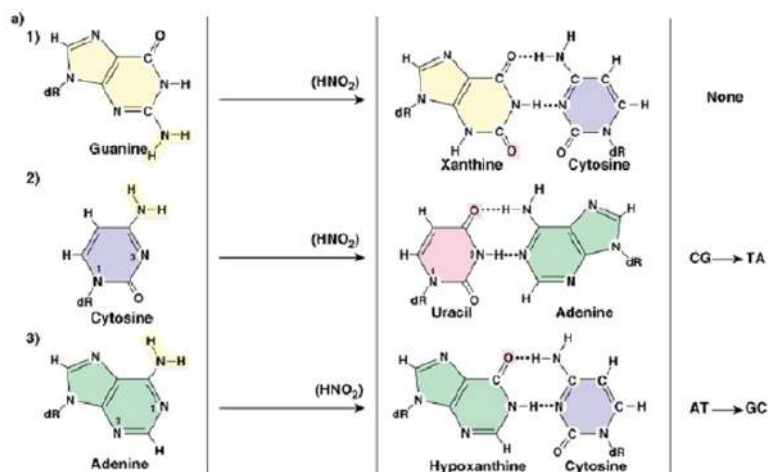


Рис. 5.4. Продукты дезаминирования

Мутации по мт геному распределены следующим образом: в области D-loop мутаций больше, чем в остальном геноме. Но относительное количество каждого типа мутаций одинаково по всему мт геному и не меняется с возрастом. Видимо, уже при рождении мутаций в D-loop больше.

На рисунке 5.5 оранжевым цветом показаны мутации в не кодирующем регионе, где D-loop петля, а серым цветом показан остальной геном.

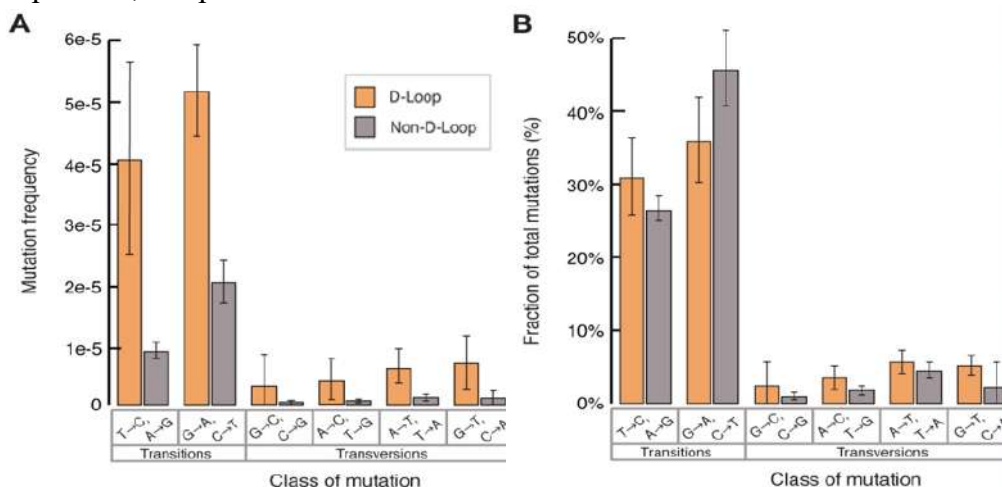


Рис. 5.5. Распределение мутаций по мт геному

*Распределение мутаций по цепям мтДНК.*

У людей в возрасте гораздо больше происходит замен  $G \rightarrow A$  и  $T \rightarrow C$  в L-цепи, у молодых тоже чуть больше. Это означает, что в H-цепи будет наоборот  $A \rightarrow G$  и  $C \rightarrow T$ . Такое асимметричное распределение мутаций интересно. Эта асимметрия только для не D-loop. Транзиции  $G \rightarrow A$  и  $T \rightarrow C$  чаще происходят в L-цепи, чем в H-цепи по всему мт-геному, но не D-loop.

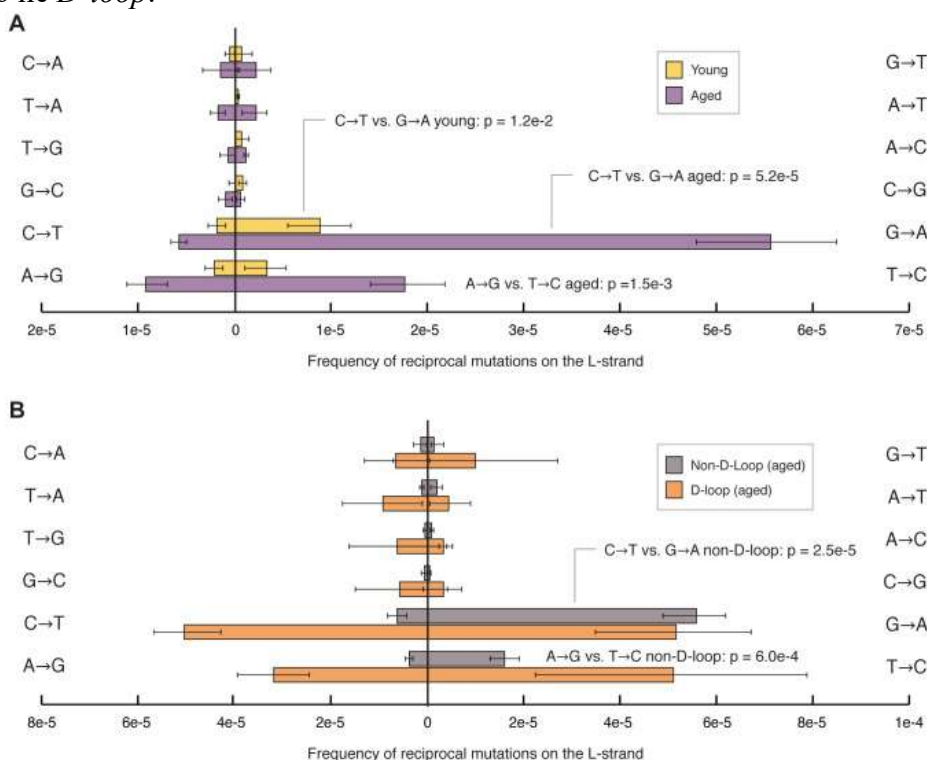


Рис. 5.6. Распределение мутаций по цепям мтДНК

Это можно объяснить асинхронной репликацией мтДНК: материнская *H*-цепь остается в оц состоянии, когда с *oriH* идет синтез *H*-цепи на матрице *L*-цепи. В одноцепочечном состоянии в *H*-цепи происходит спонтанное дезаминирование цитозина с образованием тимина и аденина с образованием гуанина.

Причины роста частоты мутаций в митохондриях:

- Возникает спонтанное дезаминирование С и А особенно в одноцепочечных участках ДНК в ходе репликации
- ДНК полимеразы  $\gamma$  ошибается в репликации

Возможно, *8oxoG* удаляется до репликации или его репарация усиливается с возрастом.

## 5.2. Репарационные системы митохондрий

### Виды репарации.

Изменение в одной цепи ДНК:

1. *BER* – *base excision repair*: замена измененного в результате окисления, алкилирования, гидролиза или дезаминирования азотистого основания;
2. *MMR* – *mismatch repair*: удаление неспаренных нуклеотидов;
3. *NER* – *nucleotide excision repair*: исправление нарушений правильной двуцепочечной структуры ДНК (например, пиримидиновых димеров).

Изменения в обеих цепях ДНК (*Double-strand break repair*):

1. *Classical NHEJ* – *non-homologous end joining*: *DNA ligase IV* использует ближайшие выступающие концы ДНК для присоединения к месту разрыва и его сшивания. Этот процесс приводит к серьезным нарушениям в геноме
2. *HR* – *homologous recombination*: для восстановления структуры ДНК в качестве матрицы используются гомологичные хромосомы

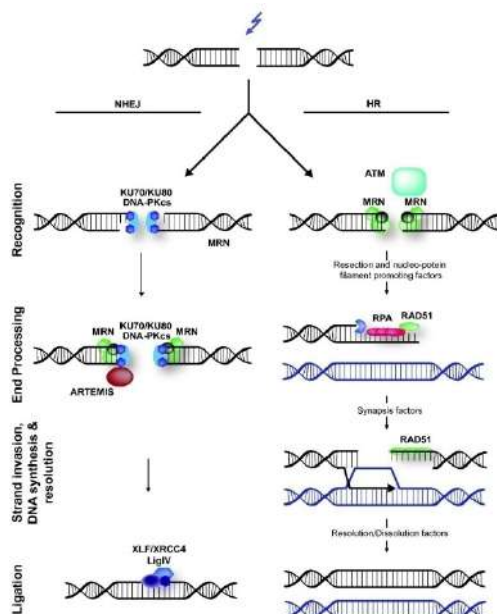


Рис. 5.7. Изменения в обеих цепях ДНК

## Репарационные пути в митохондриях.

Репарационные пути в митохондриях:

- не показана *NER*, хотя белки *CSA* и *CSB* импортируются в митохондрию при окислительном стрессе и участвует в регуляции транскрипции и *BER*
- есть данные о *alt-NHEJ* - *MMEJ* - *microhomology-mediated end joining*
- не показана *HR*, хотя *Rad 51* поступает в митохондрии в условиях окислительного стресса и участвует в репликации.

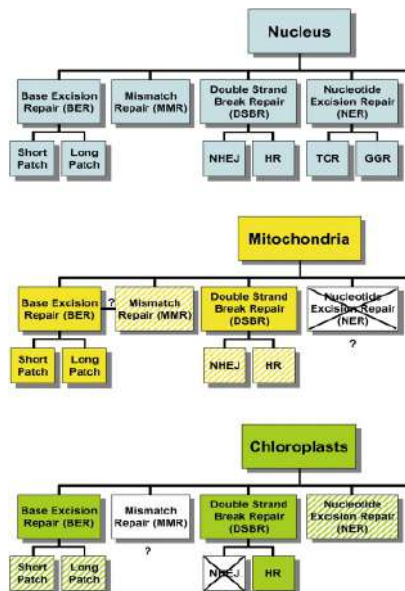


Рис. 5.8. Репарационные пути в митохондриях

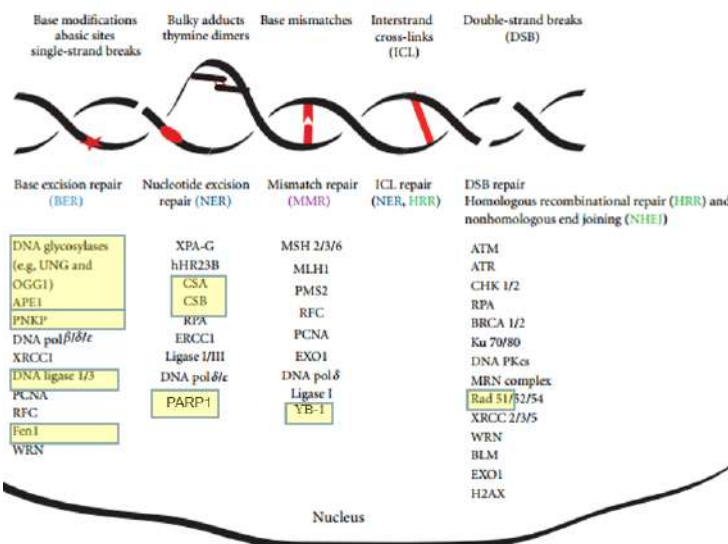


Рис. 5.9. Ферменты репарации в ядре

На рисунке 5.9 желтым цветом выделены ферменты, которые найдены не только в ядре, но и в митохондриях.

### BER в митохондриях.

Base excision repair (BER) в митохондриях:

- SN (single nucleotide) or SP (short patch) BER – заменяется 1 нуклеотид;
- LP (long patch) BER – заменяется 2-6 нуклеотидов.

Специфичная ДНК-гликозилаза удаляет поврежденное азотистое основание, образуя AP-сайт (*apurinic or apyrimidinic site*) (рис. 5.10). Ферменты (гликозилазы, AP-эндонуклеаза, PNKP) вырезают остатки поврежденного нуклеотида, оставляя 3'-ОН-группу на конце разрыва. Вместо удаленного нуклеотида ДНК-полимераза вставляет новый(ые). Лигаза 3 зашивает цепь ДНК.

Гликозилазы бывают *монофункциональные* (*UNG1*, *UNG2* и *MYH* (*MUTYH*)) и *бифункциональные*.

Монофункциональные гликозилазы образуют AP-сайт. AP-эндонуклеаза расщепляет цепь ДНК, оставляя единичный разрыв, содержащий 3'-ОН-группу. При этом на 5'-конце разрыва может оказаться как дезоксирибозофосфат, так и другая химическая группа.



После действия гликозилазы и AP-эндонуклеазы продукт устойчив к лиазной активности ДНК-полимеразы (*LP BER*).

Митохондриальная ДНК-полимераза  $\gamma$  способна удалять дезоксирибозофосфат за счет своей 5'→3'-дезоксирибозофосфат-лиазной активности (*SP BER*).

Бифункциональные гликозилазы способны иметь дело с повреждениями ДНК как в одно-, так и в двуцепочечном состоянии; обладают дополнительными ферментативными активностями и делятся на две группы:

1. Проводят  $\beta$ -элиминирование. После этого AP-эндонуклеаза *APE1* вырезает рибозофосфат.
2. Проводят последовательно  $\beta$ - и  $\delta$ -элиминирование. После этого 3'-концевой фосфат удаляется ферментом *PNKP* (от англ. *polynucleotide kinase 3'-phosphatase*), чтобы 3'-конец был доступен ДНК-полимеразе.

В зависимости от 5'-концевой группы дальнейшая репарация идет по механизму *LP-* или *SP BER*.

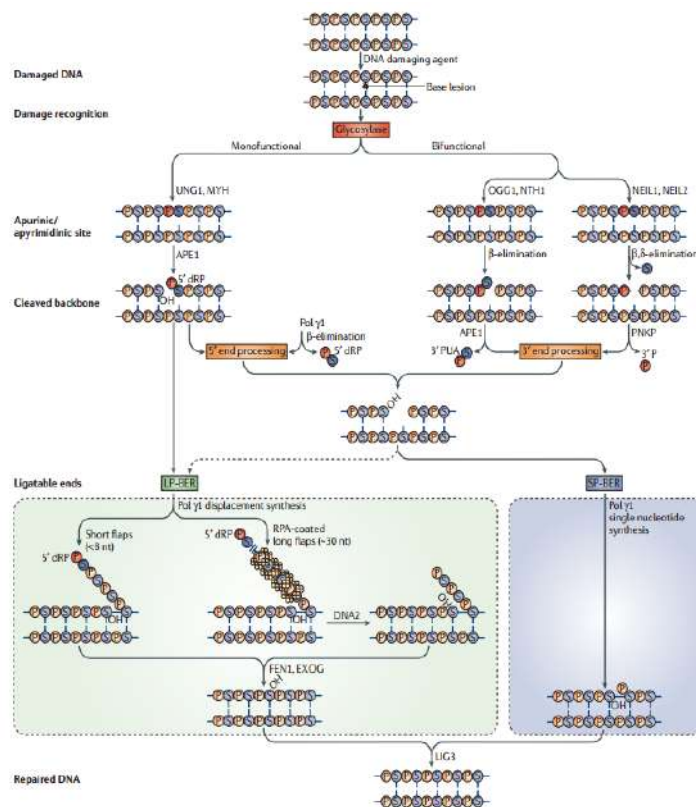


Рис. 5.10. Base excision repair (BER) в митохондриях (общий механизм)

Таким образом, если происходит простой вариант *SP BER*: *gap* заполняет *DNA pol*  $\gamma$ , затем сшивает *DNA ligase III*. Скорость *dRP*-лиазной реакции у *DNA pol*  $\gamma$  ниже, чем у *DNA pol*  $\beta$ , осуществляющей BER в ядре.

Если происходит *LP BER*:

- Хеликаза *DNA2* процессирует расширяющуюся flap-структуру;
- *DNA pol*  $\gamma$  синтезирует ДНК;
- Flap endonuclease *FEN1* или *EXO1* удаляет flap-структуру;

- *Ligase III* сшивает разрыв.

Base excision repair (BER) в митохондриях: гликозилазы. Они специфичны и зависят от того, какие повреждения у азотистых оснований. Основные виды повреждений азотистых оснований:

- окисление;
- алкилирование;
- дезаминирование.

На рисунке 5.11 показаны основные продукты окисления азотистых оснований. Они одинаковы в ядре и в митохондриях.

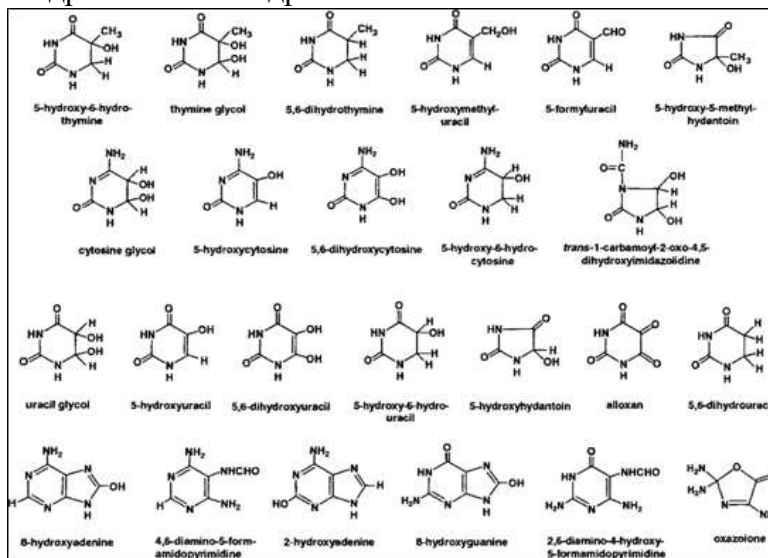


Рис. 5.11. Основные продукты окисления азотистых оснований

На рисунке 5.12 показаны наиболее распространенные продукты окислительного стресса: 8oxoG и 8oxoA.

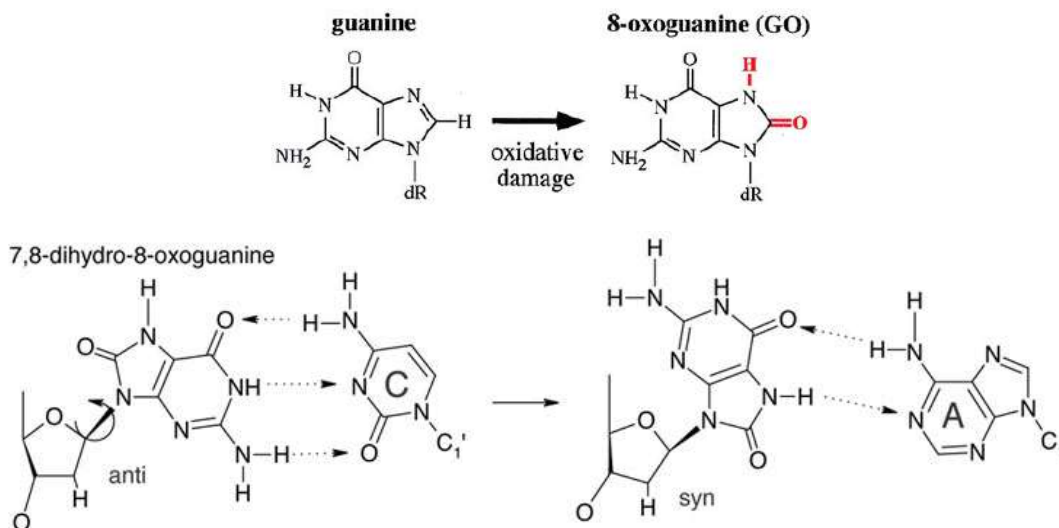


Рис. 5.12. Наиболее распространенные продукты окислительного стресса: 8oxoG и 8oxoA.

Репарацию  $\delta\text{oxoG}$  осуществляет гликозилаза *OGG1* (*MutM* у бактерий).

Альтернативный сплайсинг мРНК *hOGG1* дает несколько изоформ фермента, в том числе и митохондриальную.

В ядре есть другие ферменты для репарации  $\delta\text{oxoG}$ , а в митохондриях их, видимо, меньше:

- В экстрактах митохондрий из *ogg1*<sup>-/-</sup> мышей *in vitro* не вырезается  $\delta\text{oxoG}$ ;
- У *ogg1*<sup>-/-</sup> мышей в ядре содержание  $\delta\text{oxoG}$  увеличивается не сильно, в митохондриях гораздо сильнее;
- Предполагается, что *NEIL1* может компенсировать потерю *OGG1*;

*MYH* (*MutY* у бактерий) перемещает аденин или гуанин, ошибочно вставленные при репликации во вторую цепь ДНК напротив  $\delta\text{oxoG}$ .

Альтернативный сплайсинг дает ядерную и митохондриальную изоформы *MYH*.

Репарацию окисленных азотистых оснований могут осуществлять гликозилазы *NEIL1* и *NEIL2*.

В ядерной репарации они вырезают повреждения в структурах «Bubble»:

- *NEIL1* экспрессируется в *S*-фазе → участвует в репликации;
- *NEIL2* экспрессируется независимо от фазы клеточного цикла => участвует в транскрипции.

Этим ферментам требуется *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (*PNKP*).

У нокаутных по *NEIL1* мышей в печени накапливаются мтДНК с делециями, что вызывает симптомы типичные для митохондриальных болезней.

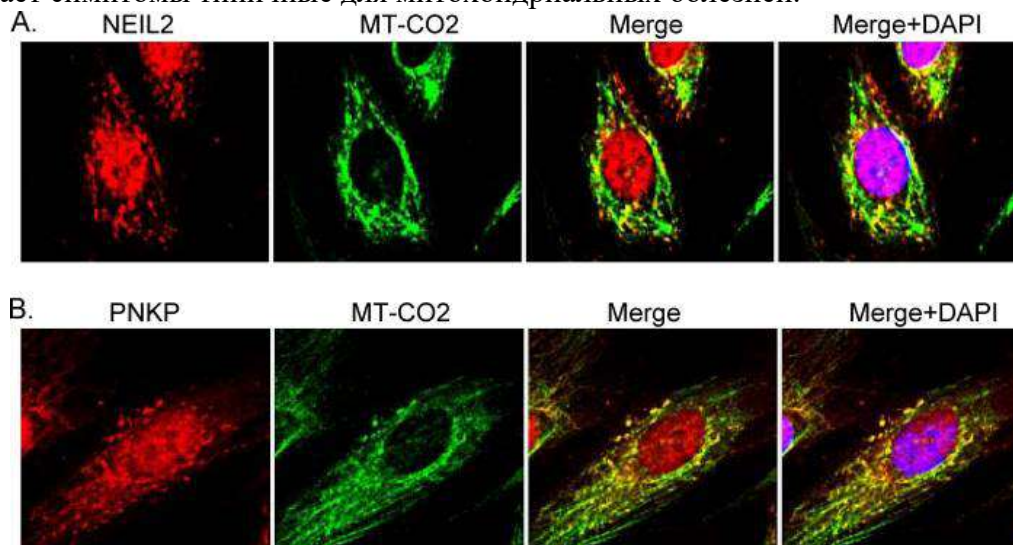


Рис. 5.13. *NEIL2* и *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (*PNKP*) колокализованы с *MT-COX2*

*NEIL2* и *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (*PNKP*) обнаружены в экстрактах митохондрий.

*NEIL2* и *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* (*PNKP*) колокализованы с *DNA polymerase  $\gamma$* .

В отсутствии *NEIL2* или *PNKP* в клетках линии *HEK293* повышается содержание окисленных азотистых оснований.

Для тимингликоля существует специфическая гликозилаза (рис.5.14). Тимингликоль удаляется тимингликоль-гликозилазой. У дрожжей её кодируют два гена: *NTG1* и *NTG2*. У *NTG1* двойная локализация – в ядре и в митохондриях, а *NTG2* образует ядерную изоформу.

Совместно с *NTG1* в дрожжевых митохондриях при *BER*-репарации работает хеликаза *PIF1*. Совместная потеря генов *NTG1*, *PIF1* и *SOD* (супероксиддисмутазы) приводит к потере мтДНК. Это доказывает, что повреждения от окислительного стресса вносят вклад в геномную нестабильность митохондриального генома дрожжей.

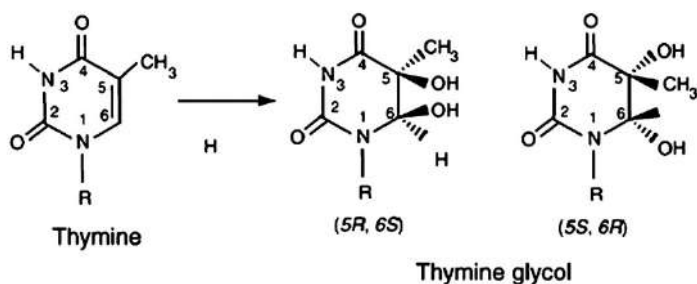


Рис. 5.14. Образование тимингликоля из тимина под действием окислительного стресса блокирует работу РНК- и ДНК-полимеразы

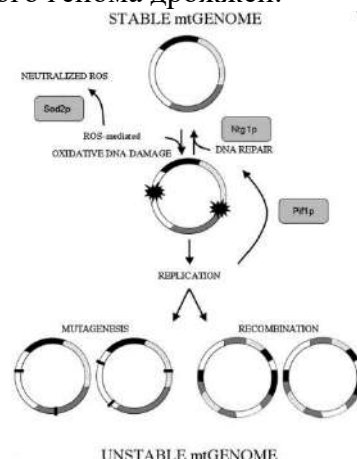


Рис. 5.15. Потеря мтДНК

Для тимингликоль-гликозилазы млекопитающих данные противоречивы:

- по одним данным она локализована в ядре и митохондриях, по другим – только в ядре;
- *NTH1* имеет оба сигнала – митохондриальной и ядерной локализации;
- непонятно, происходит ли удаление тимингликоля в митохондриях из клеток мышей *nth-/-* (противоречивые данные у разных групп).

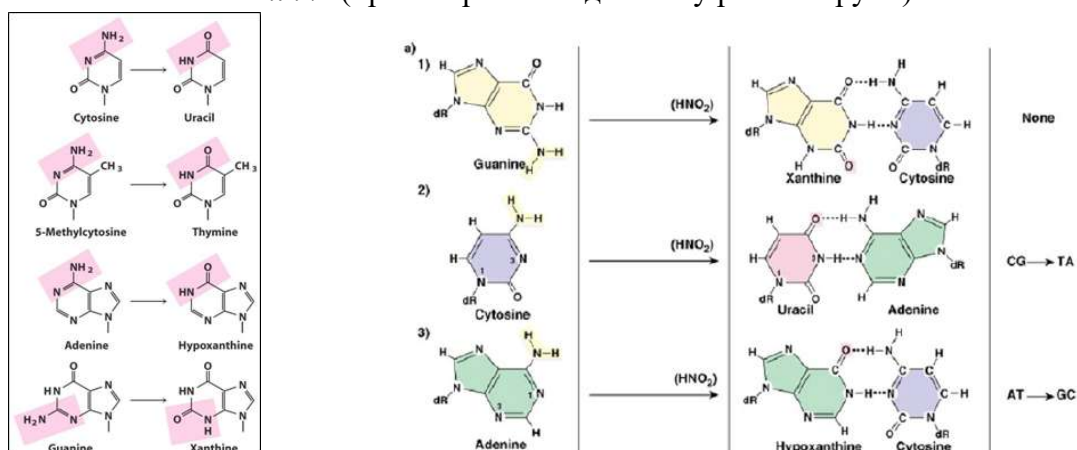


Рис. 5.16. Продукты дезаминирования

Удаление урацила, образованного при дезаминировании цитозина, осуществляет урацил-ДНК-гликозилаза. Существуют ядерная и митохондриальная формы урацил-ДНК-гликозилы. Они образуются с двух разных промоторов одного гена и в результате альтернативного сплайсинга.

У дрожжей одна изоформа этого фермента, в нем есть сигналы как ядерной, так и митохондриальной локализации.

Алкилированные основания удаляет *N-methylpurine-DNA-glycosylase* (MPG или AAG – от *alkyladenine-DNA-glycosylase* или *3-methyladenine-DNA-glycosylase*).

Этот фермент не обнаружен в митохондриях, но в митохондриях репарируются повреждения, обычно служащие субстратами этого фермента.

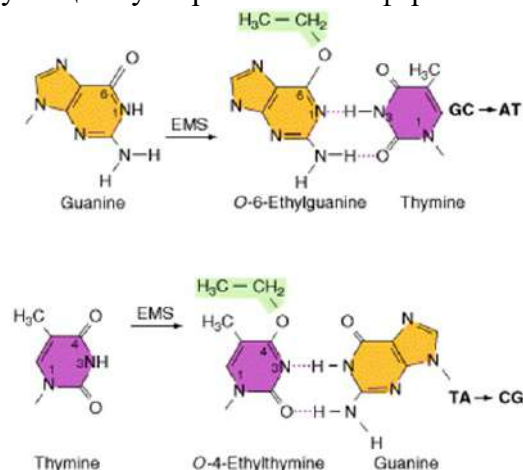


Рис. 5.17. Наиболее распространенные продукты алкилирования: *O*-4-alkylT *O*-6-alkylG

#### Base excision repair (BER) в митохондриях: AP эндонуклеазы.

Основная AP эндонуклеаза Млекопитающих *APEX1* (*APE1*) локализована как в ядре, так и в митохондриях. Митохондриальная форма короче ядерной. Есть и другая AP эндонуклеаза *APE2*, частично транспортируемая в митохондрии, но её каталитическая активность низка, функции требуют дальнейшего изучения.

У дрожжей основная эндонуклеаза *Apn1* на *N*-конце имеет митохондриальную адресную последовательность и сигнал ядерной локализации на *C*-конце. *Apn1* транспортируется в митохондрии, взаимодействуя с *Pir1* – белком клеточной стенки дрожжей. *Pir1* конкурирует с ядерными белками за связывание с сигналом ядерной организации, что позволяет части *Apn1* импортироваться в митохондрии.

AP эндонуклеаза (или *PNKP*) освобождает ОН-группу на 3'-конце разрыва, механизм дальнейшей репарации зависит того, какая группа расположена на 5'-конце.

В митохондриях застраивание бреши осуществляет ДНК-полимераза  $\gamma$ , у неё есть и полимеразная и лиазная активность, но последняя слабее, чем у *DNA pol  $\beta$* , осуществляющей BER в ядре.

#### Вывод.

##### 1. В митохондриях происходит репарация BER двух типов:

- SP (short patch) BER;
- LP (long patch) BER.

##### 2. Основные стадии BER:

- Гликозилаза удаляет поврежденное азотистое основание.
- *AP*-эндонуклеаза или другой фермент освобождает 3'-конец бреши.
- В зависимости от группы на 5'-конце бреши *ДНК* полимераза у застраивает брешь одним (*SP BER*) или несколькими (*LP BER*) нуклеотидами.
- *FEN1*, *EXO1* и *DNA2* участвуют в *LP BER*.
- *LIG 3* зашивает разрыв.

### Регуляция BER.

На рисунке 5.18 показано, что повреждаются свободные *dNTP* и мтДНК. Сигнал о повреждении поступает в цитозоль и дополняется сигналами о повреждении ядерной ДНК, белки системы репарации транспортируются в митохондрию:

- Происходит перераспределение гликозилаз человека *OGG1*, и *NTH1*, дрожжевых гликозилаз *Ung* и *Ntg1*.
- Некоторые репарационные факторы поступают в митохондрии исключительно в условиях окислительного стресса (*APE1 CSA*, *CSB* и *Rad51*).

Основные пути репарации в митохондриях (рис. 5.19 – зеленым выделены главные факторы репарации; дополнительные факторы – желтым и фиолетовым; ДНК связывающие белки выделены серым):

- Уничтожение окисленных *dNTPs* (I);
- *Short-patch BER* (II);
- *Long patch BER* (III);
- Регуляция репарационных процессов (IV-V).

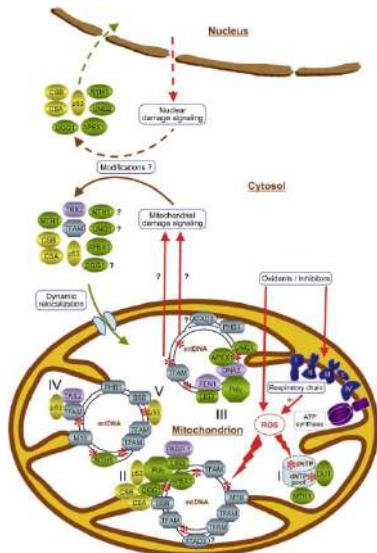


Рис. 5.18. Регуляция BER

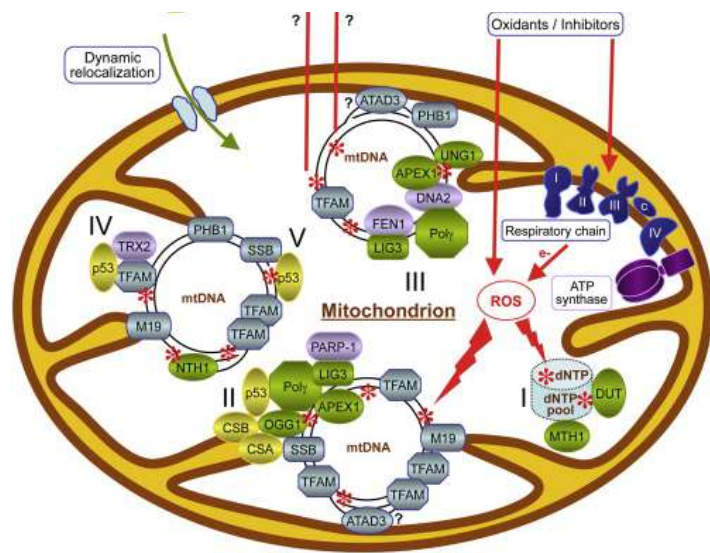


Рис. 5.19. Основные пути репарации в митохондриях

### Регуляция BER: p53.

- окислительный стресс вызывает переход в митохондрии белка *p53*;

- *p53* может удалять *8-oxo-dG* на 3'-конце цепи ДНК за счет своей 3'-5'-экзонуклеазной активности, эта реакция усиливается в присутствии белка, связывающего одноцепочечную ДНК (*single-strand binding protein, SSB*);
- *p53* взаимодействует с ДНК-полимеразой  $\gamma$  и регулирует ее активность в *BER*;
- *p53* может способствовать удалению окисленных оснований из мтДНК, взаимодействуя с гликозилазой *OGG1* и эндонуклеазой *APE1*. (Однако в другой работе этот факт не подтвердился);
- Показано, что *p53* регулирует транскрипцию генов ферментов митохондриальной *BER* – эндонуклеазы *FEN1* и гликозилазы *OGG1*.

#### Регуляция BER: TFAM.

Предположительно, связывание TFAM с поврежденной ДНК необходимо для того, чтобы обеспечить некоторую паузу во всех происходящих с ДНК процессах (репликации, транскрипции и репарации), чтобы факторы, необходимые для репарации могли импортироваться в митохондрию, а регуляторные системы могли «оценить» масштаб повреждений

- *TFAM* связывается с поврежденной ДНК прочнее, чем с интактной;
- *TFAM* обладает более высокой аффинностью к ДНК, содержащей *8-oxo-dG*, чем специфичные гликозилазы *OGG1* и *MUN*;
- Клетки, устойчивые к цисплатину (алкилирующий агент), гиперэксперессируют *TFAM*;
- *TFAM* ингибирует разрезание ДНК некоторыми ферментами репарации (*OGG1, Ung1, APE1*) *in vitro*. Парадоксальное на первый взгляд ингибирование белком *TFAM* некоторых стадий репарации объясняют более плотной упаковкой ДНК, связанной с *TFAM*, что может снижать доступ к ней ферментов.

#### Регуляция BER: p53+TFAM.

1. *p53* ослабляет связывание *TFAM* с поврежденными основаниями, что увеличивает скорость репарации.
2. *p53* может регулировать *TFAM* на транскрипционном уровне:
  - В гене *tfam* мыши были найдены сайты связывания *p53*.
  - Уровень мРНК и белка *TFAM* в скелетных мышцах мышей *p53*<sup>-/-</sup> был снижен.
  - У мышей с мутацией *p53R172H* (мышинная модель синдрома Ли-Фраумени) уровень мРНК и белка *TFAM*, напротив, был повышен.

#### Одноцепочечные повреждения ДНК.

Одноцепочечным повреждением ДНК является не только повреждение азотистого основания, но и повреждение сахара и ковалентное присоединение *TOP1* – изомераза (рис. 5.20) (мутация). Эти три цепочечных повреждения необходимо уметь репарировать (рис. 5.21). Однонитевые разрывы – это субстрат для белка *PARP1*. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (*tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1, TDPI*) и апратаксин (*APTX*) – дополнительные факторы репарации *SSB* в митохондриях.

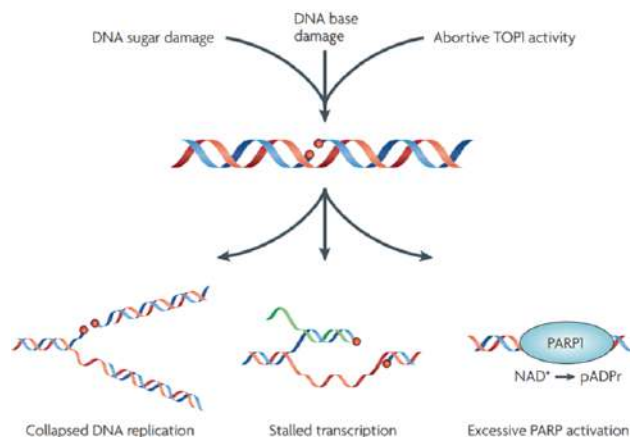


Рис. 5.20. Одноцепочечные повреждения ДНК

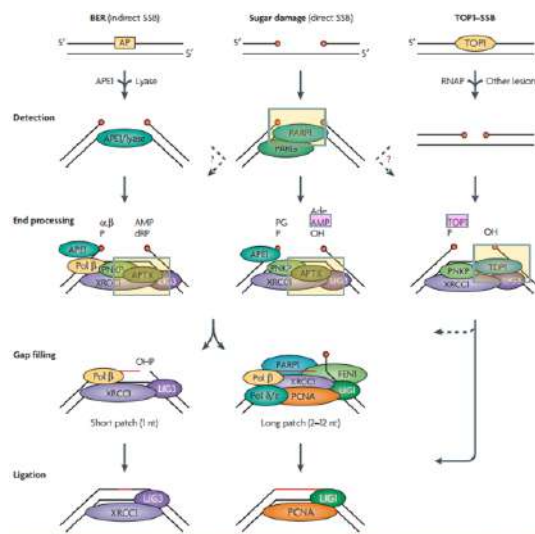


Рис. 5.21. Репарация SSB

### Регуляция репарации SSB в митохондриях: TDP1.

*In vitro* в митохондриальных экстрактах, истощенных антителами к *TDP1*, репарация однонитевых разрывов шла гораздо слабее, чем в контрольных экстрактах.

В экспериментах *in vivo* репарация в эмбриональных фибробластах мышей *TDP1*<sup>-/-</sup> также была снижена по сравнению с нормальными клетками.

Интересно, что в структуре *TDP1* нет сигнала митохондриальной локализации, поэтому механизм его импорта в митохондрию пока неясен.

### Регуляция репарации SSB в митохондриях: APTX.

Нокдаун *APTX* с помощью *shRNA* в клетках нейробластомы и первичных миобластах человека приводил к:

- митохондриальным дисфункциям: снижению цитратсинтазной активности и уменьшению числа копий мтДНК;
- значительно большему числу повреждений мтДНК, чем ядерной.

### Репарация SSB в митохондриях клеток AOA1 (APTX<sup>-/-</sup>).

Репарация *SSB* в митохондриях клеток *AOA1* (*APTX*<sup>-/-</sup>) идет значительно слабее, чем в ядре. В митохондриях отсутствие *APTX* не может компенсироваться в отличие от ядра.

### Поли (АДФ-рибоза)-полимераза (Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP1).

Ингибиторы к *PARP* используются в схема лечения при некоторых видах онкологии.

Поли (АДФ-рибоза) полимеризует АДФ-рибозу (создает цепочки): как свободные полимеры, так и ковалентно-связанные с белками (рис.5.22). Субстратом Поли(АДФ -рибозы)-полимеразы являются сотни белков клетки. Это сильно портит белки. АДФ-рибоза берется из *NAD*<sup>+</sup>.



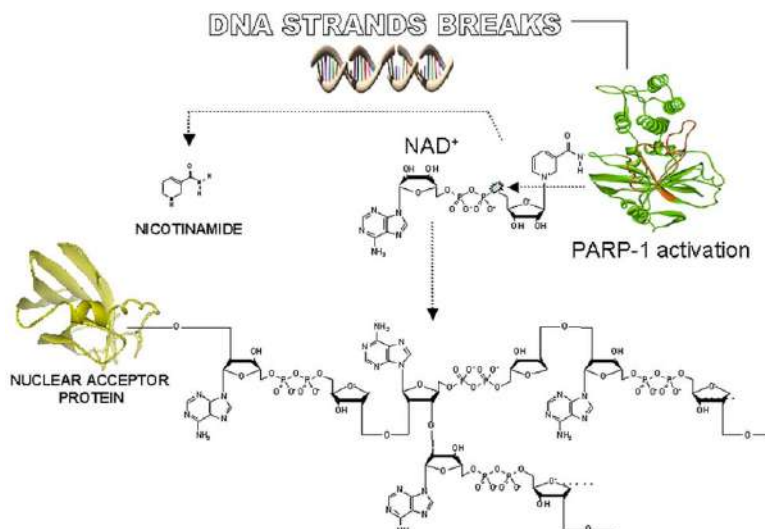


Рис. 5.22. Поли(АДФ-рибоза)-полимераза (Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP1)

### Регуляция BER: PARP1.

Поли(АДФ-рибоза)-полимераза (Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP1) – фермент, регулирующий ядерную репарацию и поддерживающий геномную стабильность, участвует в т.ч. и в активации митохондриального ответа на окислительный стресс, в регуляции репарации и транскрипции в митохондриях.

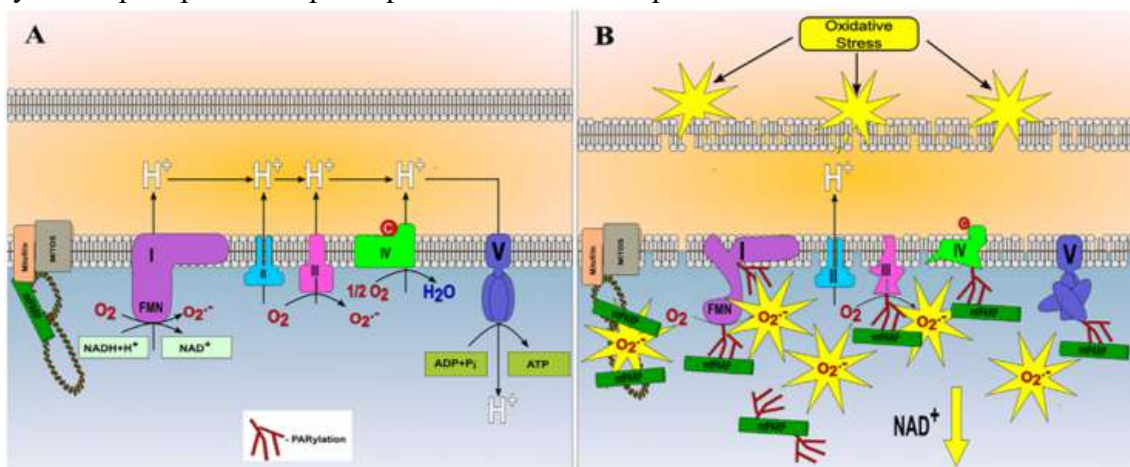


Рис. 5.23. Регуляция BER: PARP1

PARP1 локализована в митохондриях, входит в комплекс, включающий митофинин, мтДНК и лигазу 3.

PARP-1 образует комплекс с ДНК-лигазой 3 на мтDNA.

PARP1 взаимодействует с TFAM.

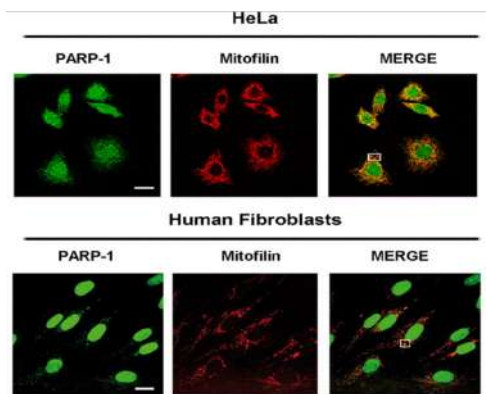


Рис. 5.24. PARP1 в митохондриях

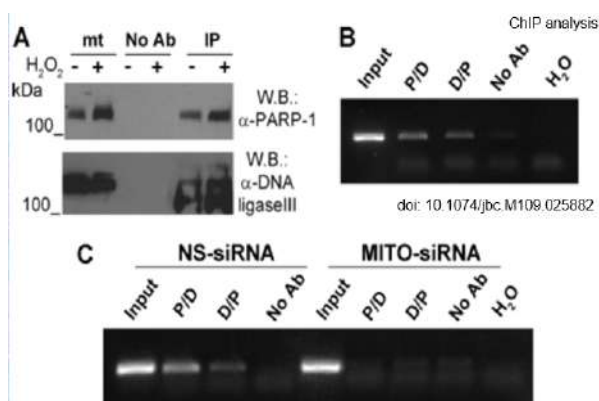


Рис. 5.25. Образование комплекса с ДНК-лигазой 3

*PARP1* взаимодействует с ДНК-полимеразой  $\gamma$  и *EXO*: *Proximity ligation assay (PLA)* и иммунофлуоресцентное окрашивание.

Процесс: есть два белка; если они расположены рядом, то можно взять первое антитело на один белок, второй – на второй. Вторые антитела присоединяются к первым антителам, которые конъюгированы с нуклеотидами, таким что, оказавшись рядом, они образуют двуцепочечные участки ДНК. Если белки не рядом, двуцепочечный участок не образуется (не будет красных участков).

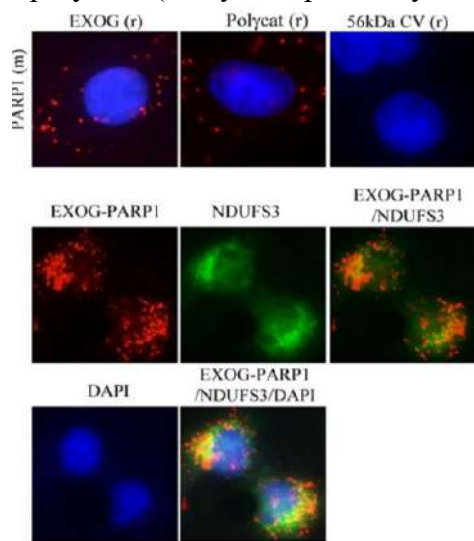


Рис. 5.26. Proximity ligation assay (PLA)

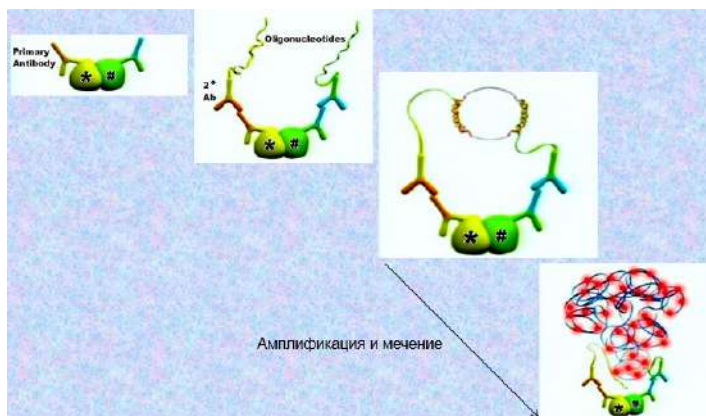


Рис. 5.27. Proximity ligation assay (PLA)

*PARP1*, активируясь при окислительном стрессе, модифицирует белки, участвующие в митохондриальной репарации, что приводит к снижению ее эффективности. Репарационные ферменты митохондрий взаимодействуют с *PARP1*. Парилирование ферментов репарации митохондрий усиливается при окислительном стрессе. Инактивация *PARP1* усиливает взаимодействия между ферментами репарации митохондрий при окислительном стрессе.

*PARP1*, активируясь при окислительном стрессе, модифицирует белки, участвующие в митохондриальной репарации, что приводит к снижению ее эффективности, т.е. *PARP1* – негативный регулятор репарации в митохондриях.

- Парилирование ферментов репарации митохондрий усиливается при окислительном стрессе.
- Инактивация *PARP1* усиливает взаимодействия между ферментами репарации при окислительном стрессе.
- Инактивация *PARP1* усиливает *BER* в митохондриях.

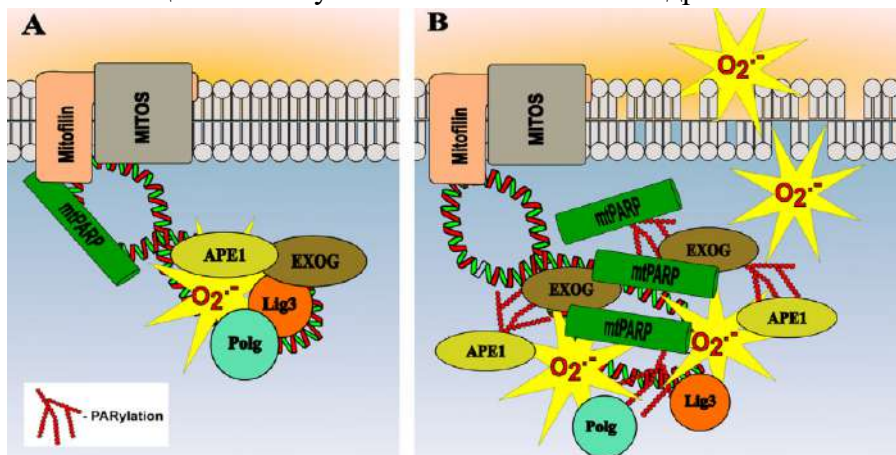


Рис. 5.28. PARP1 – негативный регулятор репарации в митохондриях

### Вывод.

В митохондриях осуществляется регуляция репарации однонитевых разрывов

1. Многие ферменты переходят в митохондрии в ответ на сигналы о повреждениях. Происходит перераспределение гликозилаз человека *OGG1*, и *NTH1*, дрожжевых гликозилаз *Ung* и *Ntg1*.

Некоторые репарационные факторы поступают в митохондрии исключительно в условиях окислительного стресса (*APE1 CSA*, *CSB* и *Rad51*).

2. В репарации *BER* участвуют *TFAM* и *p53*.

*p53* ослабляет связывание *TFAM* с поврежденными основаниями, что увеличивает скорость репарации.

3. Репарацию *SSB* в митохондриях регулируют *PARP1* (негативный регулятор), *APTХ* и *TDPI*.

## Лекция 6. Репарация и транскрипция мтДНК

### 6.1. Репарация одонитевых повреждений в мтДНК

#### NER – nucleotide excision repair.

Долгое время считалось, что этот механизм отсутствует в митохондриях.

В митохондриях дрожжей индуцированные УФ пиримидиновые димеры репарируются эндонуклеазой *Rad2*. Этот механизм *UVER* (*UV excision repair*) одновременно похож и на BER, и на NER.

Белки, участвующие в ядерной NER CSA (от *Cockayne Syndrome*) и CSB обнаруживаются в митохондриях Млекопитающих в условиях окислительного стресса. Они связываются с мтДНК и компонентами BER.

Возможно, в митохондриях есть отличный от ядра механизм NER, который еще будет исследован.

#### Белки CSA и CSB (*Cockayne syndrome*).

Синдром Кокейна – аутомное рецессивное нейродегенеративное заболевание, проявляющееся в нарушении роста, неврологических отклонениях, гиперчувствительности кожи к УФ. Синдром Кокейна связан с дисфункцией генов, кодирующих белки CSA и CSB. Эти белки участвуют во многих ядерных процессах:

- инициации транскрипции;
- репарации (*TC-NER* и *BER*).

Уровень CS белков в митохондрии в норме низкий, но при обработке клеток перекисью он резко возрастает: CS белки импортируются в митохондрию и связываются с мтДНК.

Причина синдрома Кокейна – нарушение ядерной репарации и транскрипции. «Митохондриальный вклад» в синдром Кокейна связан с работой CSA и CSB в митохондриях:

- пациенты с синдромом Кокейна не имеют повышенного риска развития рака;
- симптомы при синдроме Кокейна схожи с различными митохондриальными заболеваниями.

CSA принадлежит к семейству белков с WD40 доменами.

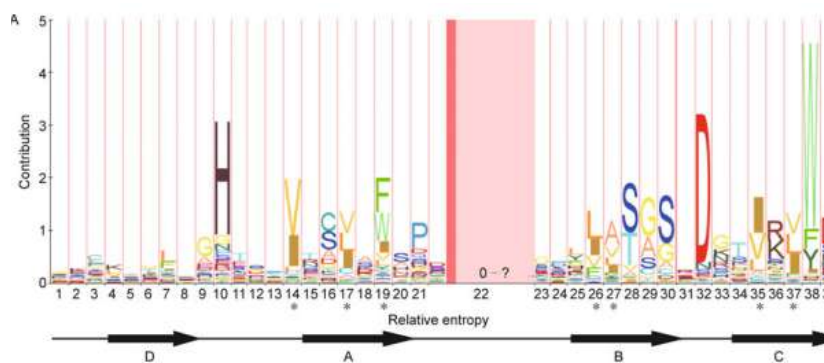


Рис. 6.1. WD40

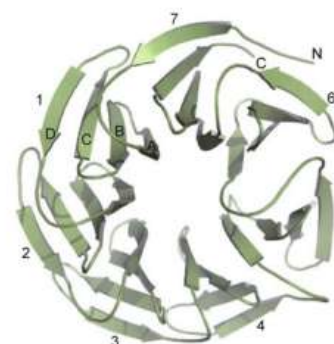


Рис. 6.2. Структура WD40

Функция такого домена – это обеспечение связи другими белками. На рисунке 6.3 проведены все белки, которые относятся к этому семейству, они имеют разные функции и выполняют разные задачи.

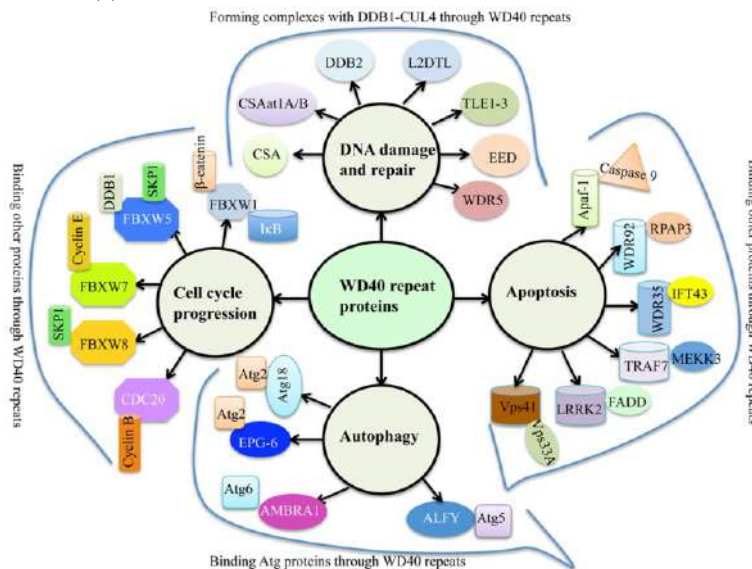


Рис. 6.3. Белки WD40

CSB принадлежит к семейству *SNF2/SWI2* АТФаз:

- У *SNF2/SWI2* АТФаз имеется центральный АТФазный домен с 7-ю хеликазными мотивами.
- Они способны разъединять цепи дцНК, но настоящей хеликазной активностью не обладают.
- Участвуют в регуляции структуры хроматина.

Функции CS белков в митохондриях:

- Уровень CS белков в митохондрии при окислительном стрессе резко возрастает: CS белки импортируются в митохондрию и связываются с мтДНК и некоторыми белками
- CSB необходим для нормального протекания аутофагии.

В клетках с мутацией в CSB (синдром Кокейна), а также в клетках мышей *CSB<sup>-/-</sup>* наблюдается повышенное содержание митохондрий и снижена аутофагия, накапливаются дефектные митохондрии.

**CS белки защищают мтДНК от образования «common deletion».**

Частота возникновения «common deletion» при облучении УФ в нормальных фибробластах в 10 раз ниже, чем в фибробластах пациентов с синдромом Кокейна, несущих мутации в CSA или CSB.

Экспериментальное введение в фибробласты с мутантным CSB функционально активного CSB восстанавливало частоту «common deletion» до уровня нормальных фибробластов.

«Common deletion».

Делеция 4978 bp, фланкированных короткими прямыми повторами. Делеция захватывает > 30% митохондриального генома.

Делеции в мтДНК возникают при множестве различных заболеваний.

В том числе:

- в нейронах пожилых людей;
- у пациентов с болезнью Паркинсона (32-80% мтДНК в черной субстанции несут делеции).

Предполагалось, что делеция может возникать при репликации (репликационной репарации) или при репарации дц разрывов. Причиной common deletion служат нарушения в репликации (репликационная репарация).

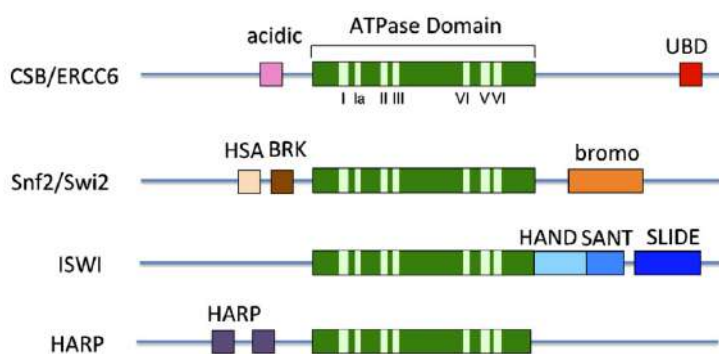


Рис. 6.4. Семейство *SNF2/SWI2* АТФаз

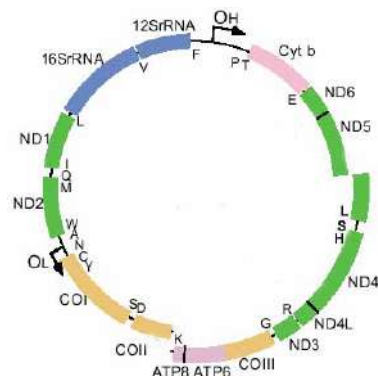


Рис. 6.5. Common deletion

Существует два механизма возникновения делеции. Первый – образование делеции в ходе репликации (рис. 6.6). Второй – образование «common deletion» в ходе репарации двуцепочечных разрывов (рис. 6.7).

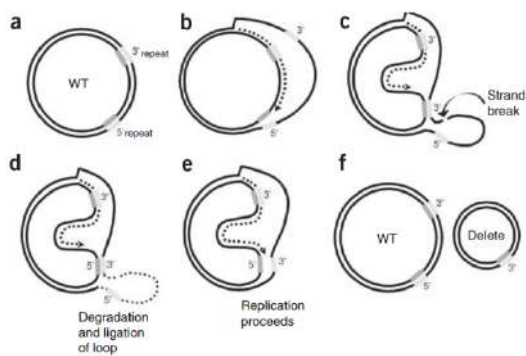


Рис. 6.6. Образование «common deletion» в ходе репликации

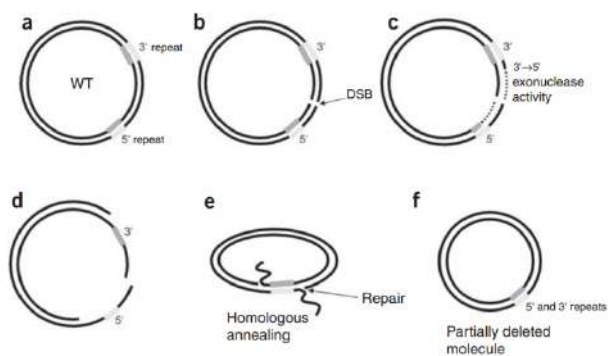


Рис. 6.7. Образование «common deletion» в ходе репарации двуцепочечных разрывов

Несколько лет назад исследователи показали, что Разрыв на 5'-конце прямого повтора приводит к образованию common deletion.

1. Сконструировали mito-TALENs.
2. Показали, что слитные с HA mito-TALENs локализованы в митохондриях.
3. ПЦР (праймеры отжигаются только, если делеция произошла) дает продукт только в клетках с mito-TALEN CD5'.

4. ПЦР дает продукт, если происходит двуцепочечный разрыв или разрыв в Н-цепи (но не в L-цепи).

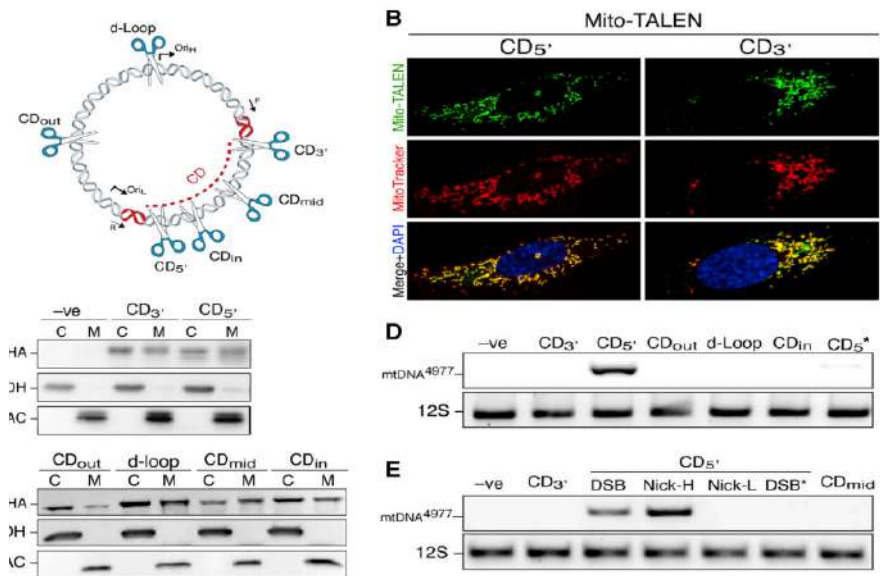


Рис. 6.8. Образование «common deletion»

Кроме того, было доказано, что образование common deletion происходит при репликативной репарации. Подавление экспрессии ферментов, участвующих в репликации, уменьшает долю молекул с common deletion. Подавление экспрессии ферментов, участвующих в репликации, уменьшает долю молекул с common deletion.

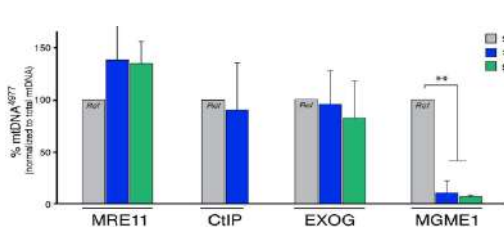


Рис. 6.9. Ферменты репарации: РНК-интерференция не приводит к уменьшению %common deletion. Исключение составляет MGME1, но она участвует и в репликации

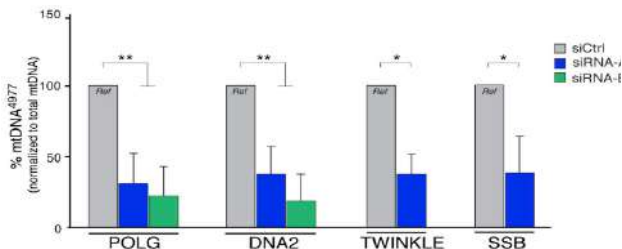


Рис. 6.10. Ферменты репликации: РНК-интерференция приводит к уменьшению %common deletion.

Образование common deletion происходит при репликативной репарации:

- Нарушение репликации приводит к образованию common deletion;
- Двуцепочечный или одноцепочечный (в Н-цепи) разрыв на 5'-конце прямого повтора, фланкирующего область common deletion, приводит к образованию common deletion.

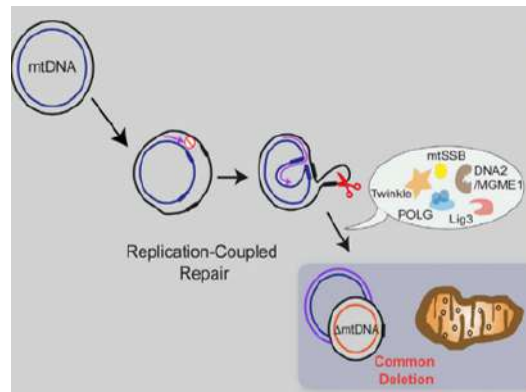


Рис. 6.11. Образование «common deletion»

Большинство детектируемых делеций в мтДНК человека происходят в «Major arc». Число прямых повторов при этом почти в два раза больше в «Minor arc».

Кроме того, что *CSB* защищает мтДНК от образования «common deletion», *CS* белки ослабляют активность *PARP1*. При отсутствии функционально активного *CSB* (синдром Кокейна) происходит постоянная активация *PARP1*. Это приводит к гиперполи-АДР-рибозилированию, истощению запасов *NAD<sup>+</sup>* и митохондриальным нарушениям. Ингибирование *PARP1* или увеличение уровня *NAD<sup>+</sup>* в экспериментах восстанавливает функции митохондрий в клетках пациентов с синдромом Кокейна.

Митохондриальные патологии при синдроме Кокейна вызваны нарушением транскрипции рибосомной ДНК (рДНК) в ядре с последующей активацией *PARP1*:

- рДНК склонна образовывать вторичные структуры типа G-квадруплексов, а потеря *CSA* или *CSB* приводит к приостановке транскрипции на участках ДНК с такой вторичной структурой.
- *In vitro* *CSB* способен расплавлять G-квадруплексы, а их стабилизация приводит к активации *PARP1* и ускоренному старению у *Caenorhabditis elegans*, что можно предотвратить путем увеличения концентрации *NAD<sup>+</sup>*.

#### **PARP1 - (Poly (ADP-ribose) polymerase).**

PARP1 нарушает работу электронно-транспортной цепи.

При активации PARP1 нарушается работа ЭТЦ за счет парилирования белков (более сотни митохондриальных белков – субстраты PARP1) и снижения уровня *NAD<sup>+</sup>*.

При окислительном стрессе *PARP1* снижает эффективность митохондриальной репарации.

Активация *PARP1*:

- приводит к открытию *PTP* и высвобождению *Ca<sup>2+</sup>* и *AIF*;
- вызывает **парганатос** – клеточную гибель, индуцированную гиперпарилированием белков.

#### **Функции CSB в мт-транскрипции.**

1. Вытеснение *TFAM* из комплекса с ДНК → облегчение связывания ДНК с *POLRMT*, стимуляция транскрипции

2. Стимуляция элонгации транскрипции, увеличение процессивности РНК-полимеразы



*CSB* – позитивный регулятор транскрипции в митохондриях:

- В клетках *csb-/csb-* падает транскрипционная активность: уровень всех исследованных митохондриальных транскриптов в клетках с мутантным *CSB* ниже, чем в контрольных.
- Нокдаун *TFAM* в клетках *HeLa* приводит к увеличению уровня *CSB* в митохондриях.
- В экспериментах *in vitro* увеличение концентрации *TFAM*, транскрипционного фактора *TFB2M* или митохондриальной РНК-полимеразы *POLRMT* стимулирует АТФ-азную активность *CSB* в присутствии двуцепочечной ДНК.
- *CSB in vitro* увеличивает количество длинных транскриптов, образованных *POLRMT*.

**Функции *CSB* в мт-репарации.**

1. *CSB* взаимодействует с *OGG1* и *mt SSB*.
2. В клетках мышей *csb-/csb-* возрастает уровень окислительных повреждений ДНК (*8-oxoG*) и нарушается работа дыхательной цепи.
3. Потеря *CSB* снижает активность *BER* в митохондриях в отношении *8-oxo-dG*, урацила и 5-гидрокси-урацила.

Возможно, *CSB* участвует в *BER*, изменяя структуру комплекса *TFAM*-мтДНК, чтобы обеспечить доступ ферментов репарации к ДНК.

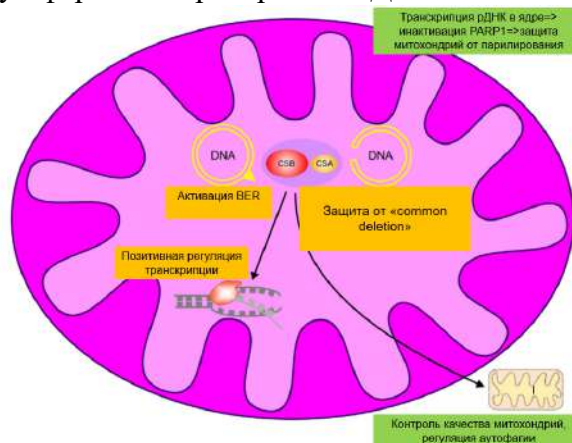


Рис. 6.12. Функции *CSB* в митохондриях

**Вывод.**

1. В митохондриях происходит репарация одноцепочечных разрывов двух типов:
  - *BER* – base excision repair;
  - *MMR* – mismatch repair (?).
2. В митохондриях не показана *NER* – nucleotide excision repair, хотя белки *CSA* и *CSB* и *PARP1* импортируются в митохондрию при окислительном стрессе.
3. *CSB (CSA)*:
  - Регулирует аутофагию;
  - Активирует транскрипцию и *BER*;
  - Защищает от образования «common deletion»;

- Защищает митохондрии от гиперактивности *PARP1*.

### Двухцепочечные повреждения ДНК. Double-strand break repair.

Есть доказательства наличия в митохондриях обоих механизмов: *NHEJ* (non-homologous end joining) и *HR* (homologous recombination).

*RAD51* – основной фермент *HR* в ядре – локализован также в человеческих митохондриях.

*Доказательства наличия гомологичной рекомбинации у эукариот.*

*Первое доказательство:*

- Гомологичная рекомбинация показана у дрожжей. *MTG1/CCE1* ген кодирует резольвазу, локализованную в митохондриях.
- В лейкоцитах человека (особенно при лейкомиях) и некоторых линиях клеток существенная часть мтДНК образует кольцевые димеры, мультимеры и катенаны. Они могут образоваться в результате гомологичной рекомбинации.

*Второе доказательство:*

- Попадание отцовской мтДНК в зиготу и её рекомбинация с материнской показана у ящериц, лосося и нематод. Есть данные (единичный случай!), что у человека может также происходить попадание отцовской мтДНК в зиготу: у одного пациента в мышцах были обнаружены гибриды отцовской и материнской мтДНК

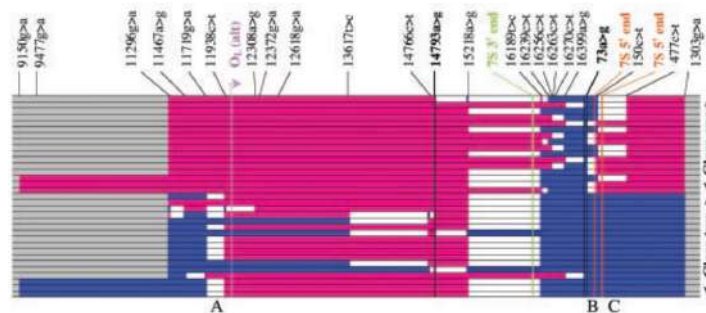


Рис. 6.13. Попадание отцовской мтДНК в зиготу (синим показаны вставки отцовской ДНК)

*Третье доказательство:* искусственные дц-разрывы *in vitro* приводят к образованию мтДНК с делециями, при этом возможна рекомбинация между разными гаплотипами мтДНК.

*Гомологичная рекомбинация:* происходит двухцепочечный разрыв, экзонуклеаза действует на концы. Тот конец, который остается выступающим обклеивается *CSB*-белком. Медиатор *Rad52*-подобный белок действует в ядре и через него происходит взаимодействие с *Rad51*, который внедряет конец в молекулу, которая будет достраивать «дырку». *Rad 51* переходит в митохондрии в ответ на окислительный стресс. Далее образуется структура Холлидея из 4 молекул и происходит репликация.

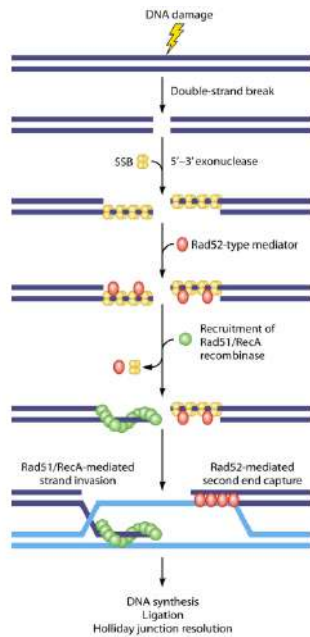


Рис. 6.14. Гомологичная рекомбинация

Organism and protein	Molecular function	Mutant phenotype on recombination
<b>Yeast</b>		
Abf2	High-mobility-group protein primarily for mtDNA packaging	Increases Holliday junctions, reduces repeat-mediated recombination
Exo5	5'-3' exonuclease	Unknown
Hrm1	3'-5' DNA helicase	mtDNA fragmentation
Mgm101	Single-strand annealing protein	Decreases repeat-mediated recombination
Mhr1	Homologous pairing <i>in vitro</i>	Decreases gene conversion
MRX complex	5'-3' exonuclease	Decreases repeat-mediated recombination
Msh1	Mismatch repair-like protein	Increases repeat-mediated recombination
Nuc1	Endo/exonuclease	Decreases mtDNA recombination
Pif1	5'-3' DNA helicase	Reduces recombination in $p^+$ × $p^-$ crosses
Rim1	Single-stranded DNA binding protein	Suppresses <i>pif1</i> mutation
<b>Mammal</b>		
mtTFA	mtDNA transcription and packaging, binding to four-way junctions	Increases Holliday junctions
Rad51	Recombinase	Unknown
SSB	Single-stranded DNA binding protein	Unknown
Twinkle	DNA helicase	Overexpression increases Holliday junctions

Рис. 6.15. Участие TFAM и Twinkle в образовании структур Холлидея

### Механизмы негомологичного сшивания DSB.

Существует три подвида механизма:

1. C-NHEJ – Classical non-homologous end joining:
  - Гомологии концов нет, или она менее 4 nt.
2. MMEJ – microhomology-mediated end joining:
  - Гомология концов менее 16 nt;
  - alt-NHEJ: Ku- and Lig4-независимый механизм;
  - Приводит к делециям.
3. SSA – single-stranded annealing:
  - Требуется протяженных гомологичных концов;
  - Rad51-независимый механизм;
  - Приводит к делециям.

*C-NHEJ (Classical non-homologous end joining) и MMEJ (Microhomology-mediated end joining).*

MMEJ:

- PARP1 – Poly (ADP-ribose) polymerase;
- комплекс MRN (Mre11–Rad50–Nbs1)–CtIP.

C-NHEJ:

- DNA-dependent protein kinase: Ku70, Ku80 и каталитическая субъединица (DNA-PKcs);
- Lig IV.

Механизм репарации C-NHEJ - Classical non-homologous end joining в митохондриях практически отсутствует.

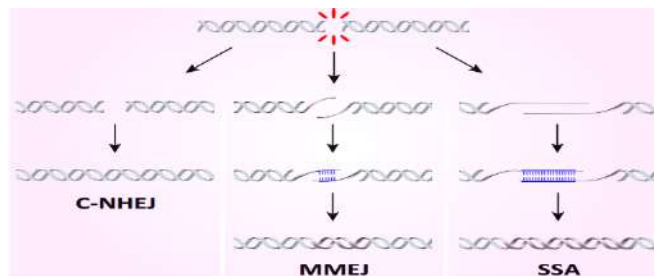


Рис. 6.16. Механизмы негомологичного сшивания DSB.

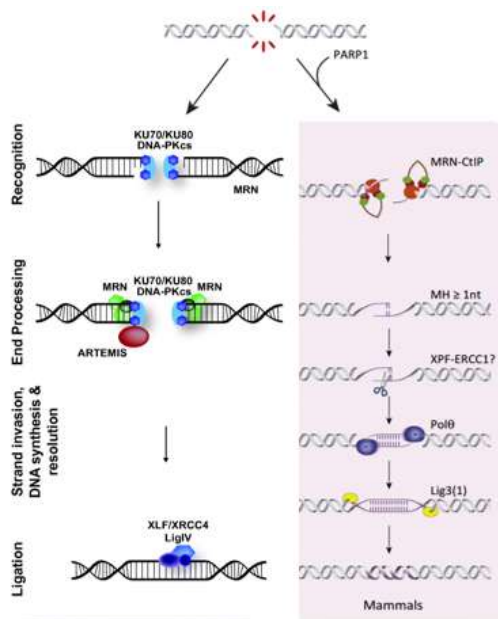


Рис. 6.17. C-NHEJ (Classical non-homologous end joining) и MMEJ (Microhomology-mediated end joining)

### Вывод.

В митохондриях происходит репарация двуцепочечных разрывов:

1. Прямых доказательств HR нет.
  - Кандидатами на участие в гомологичной рекомбинации в митохондриях являются: mtSSB, экзонуклеаза MGME1, Rad51, хеликазы Twinkle и Pif1, TFAM.
  - Rad 51 поступает в митохондрии в условиях окислительного стресса и участвует в репликации.
2. Механизм репарации C-NHEJ в митохондриях практически отсутствует.
3. В митохондриях активно происходит репарация MMEJ.
  - Эффективность MMEJ в митохондриях зависит от длины прямых повторов и расстояния от них до DSB.
  - В MMEJ в митохондриях принимают участие белки: CtIP, FEN1, ligase III, MRE11, and PARP1.

### 6.2. Транскрипция мтДНК

Транскрипция происходит с трех промоторов:

1. С HSP1 – в D-loop.
2. С HSP2 – upstream 5'-конца 12 S rRNA (частота инициации в 20 раз ↓).
3. С LSP – в D-loop.

В транскрипции участвуют:

- POLRMT;
- TFAM (h-mtTFA –transcription factor A);

- TFBM1 (h-mtTFB1);
- TFBM2 (h-mtTFB2) – образует гетеродимер с POLRMT;
- MTERF1 (mitochondrial termination factor) – терминирует транскрипцию;
- TFEM (transcriptional elongation factor mitochondrial) – процессивность POLRMT, осуществляет переключение между транскрипцией и репликацией.

*TFAM* – регулирует число копий мтДНК и участвует в регуляции транскрипции.

*TFBM1* (h-mtTFB1) и *TFBM2* (h-mtTFB2) имеют сходство с рРНК-метилтрансферазами, которые диметилируют аденозин около 3'-конца 12S рРНК. Эта модификация консервативна для про- и эукариот, за исключением дрожжей.

Филогенетический анализ показал, что они происходят от рРНК-метилтрансферазы эндосимбионта. *TFBM1* и *TFBM2* способны связывать РНК или оцДНК.

*TFB1M* и *TFB2M* диметилируют A<sup>936</sup> и A<sup>937</sup> в 12S rRNA. Отсутствие *TFB1M*:

- приводит к потере диметилирования;
- снижает уровень 12S rRNA;
- ведет к невозможности трансляции в митохондриях.

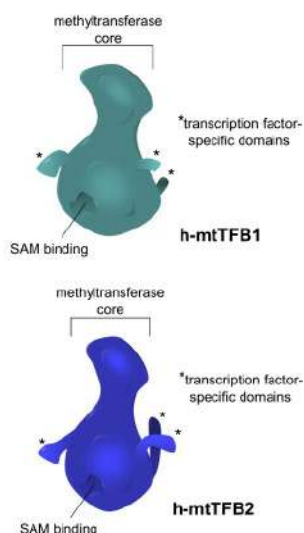


Рис. 6.18. *TFBM1* и *TFBM2*

У *TFBM2*:

- рРНК-метилтрансферазная активность менее выражена
- Специализированный транскрипционный фактор: нокаун с помощью iRNA у дрозофилы ↓ число транскриптов в 2-8 раз.

*TFBM2* имеет две возможные функции:

- Связывает оцДНК, стабилизируя область промотора в частично расплетенном состоянии во время инициации транскрипции
- Связывает новую цепь РНК, предотвращая образование ДНК-РНК гибридов, способных ингибировать промотор.

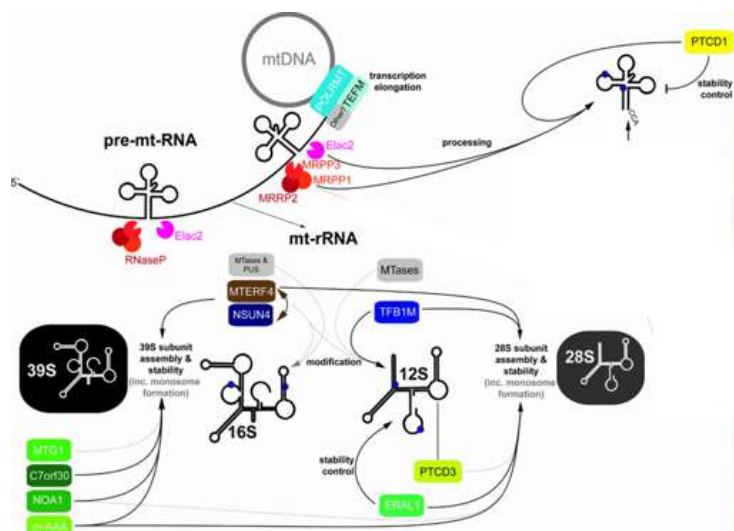


Рис. 6.19. Отсутствие *TFBM1*

РНК-полимераза POLRMT способна осуществлять транскрипцию только в присутствии TFAM и одного из транскрипционных факторов: TFBM1 или TFBM2.

Вывод.

1. *TFBM1* (*h-mtTFB1*) и *TFBM2* (*h-mtTFB2*) – рРНК-метилтрансферазы, диметилирующие аденозин около 3'-конца 12S рРНК.
2. *TFBM1* и *TFBM2* являются транскрипционными факторами, POLRMT может осуществлять транскрипцию только в комплексе с одним из них.
3. Основная функция *TFBM1* – метилирование 12S рРНК и регуляция трансляции.
4. Основная функция *TFBM2* – участие в транскрипции.

### РНК-полимераза POLRMT.

РНК-полимераза POLRMT:

- имеет высокую степень гомологии с РНК-полимеразой Т-нечетных фагов (Т3/Т7).
- не имеет гомологии с мультисубъединичными РНК-полимеразными комплексами прокариот.

У человека *POLRMT* (*mtRNAP*) – белок размером 1230ак, 134 кДа. В отличие от фаговой полимеразы, *POLRMT* не может инициировать транскрипцию самостоятельно, ей требуются дополнительные белки.

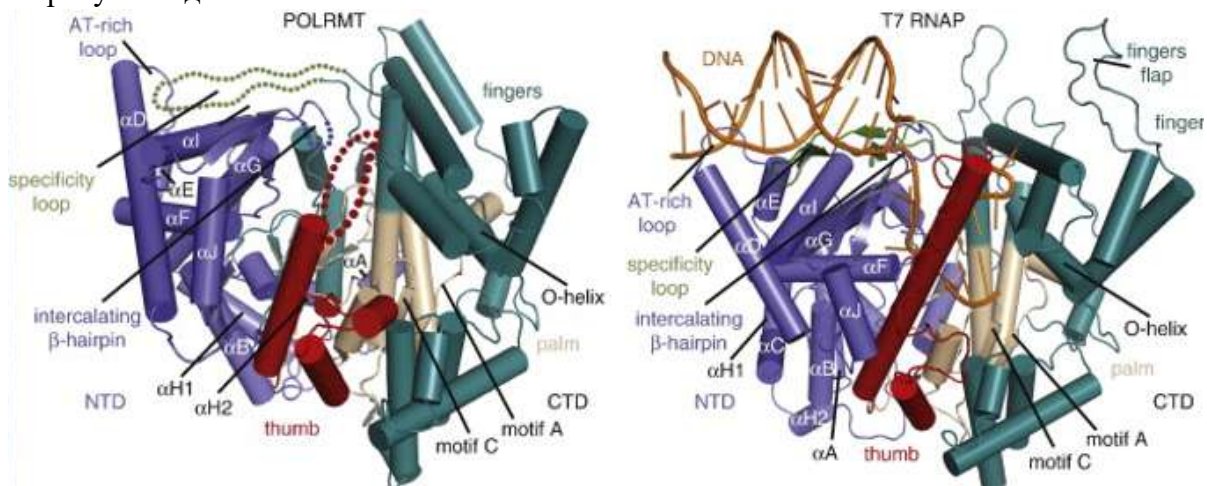


Рис. 6.20. РНК-полимераза POLRMT

### Структура РНК-полимеразы POLRMT.

N-концевой домен NTE есть только в POLRMT. Он состоит из:

- pentatricopeptide repeat domain (PPR domain)
- протяженного участка с неизвестной структурой – остатки 42–217
- «митохондриального адреса»

N-концевой домен NTD имеет слабо выраженную гомологию с Т7-РНК-полимеразой. Но структурное сходство высокое. Короткий богатый пролином линкер соединяет NTE и NTD. Каталитический домен CTD показан красным цветом на рисунке 6.21. Он имеет 12 консервативных блоков расположенных линейно (А-Л). Кристаллическая структура: напоминает кисть руки:

- Пальцы – основной элемент O-helix=мотив В, важен для субстратной специфичности, катализа и транслокации. Расположена немного в разной ориентации.
- Ладонь – мотивы А, С, мутации приводят к потере каталитической активности
- Большой палец –  $\alpha$ -спираль, осуществляет связь полимеразы с матрицей во время элонгации.

Домен пальцы:

- Нет *finger flap* – стабилизирует фермент на ДНК во время элонгации. Возможно, для POLRMT нужны дополнительные факторы для увеличения процессивности. TFEM  $\uparrow$  процессивность.
- *Specificity loop* – нет в кристаллической структуре, узнает промотор (-3 - -11) и взаимодействует с большой бороздкой ДНК, обеспечивая специфичность узнавания промотора наряду с NTD, участвует также в элонгации,  $\uparrow$  процессивность. Вероятно, есть и в POLRMT (у дрожжей есть похожая структура, но обеспечивает инициацию только на оц матрице, на дц требуются дополнительные факторы).

У домена NTD:

- нет сходства последовательности, а структура похожа: 6 спиралей
- *$\beta$ -hairpin* – вставлена между матричной и нематричной цепью, расплавляя промотор для инициации в T7. В POLRMT, возможно, роль та же, но требуются дополнительные факторы. Делеция в этой области не дает POLRMT иницировать транскрипцию с дц промотора.
- *AT-rich loop* соединяет спирали D и E. Эти 2 спирали и петля имеют плотный контакт с PPR-доменом NTE. АТ-петля взаимодействует с малым желобком ДНК в области -13 - -17, это необходимо для узнавания промотора.

PPR домен обозначен зеленым цветом. Его нет в фаговой РНК-полимеразе.

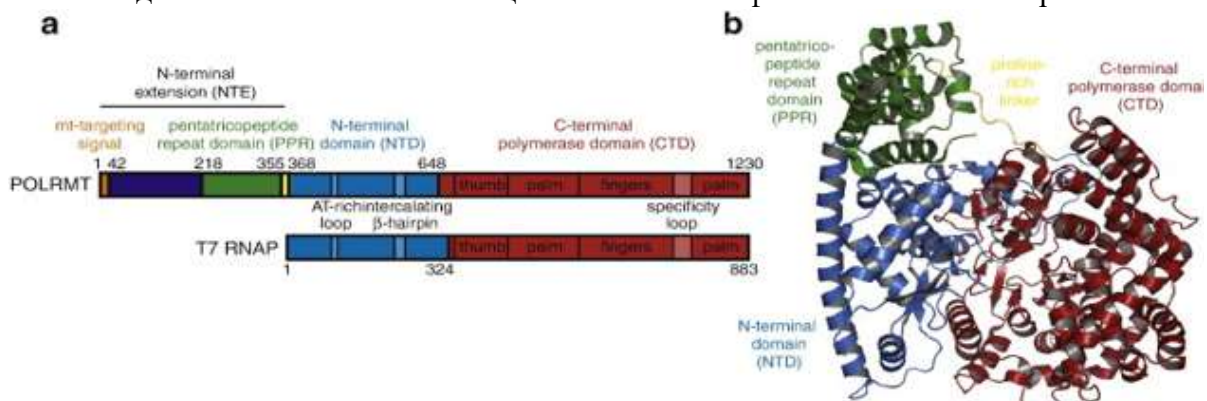


Рис. 6.21. Структура РНК-полимеразы POLRMT

PPR (*pentatricopeptide repeat domain*):

- Содержит 2 PPR тандемных мотива. В дрожжах этого домена нет, есть у растений.

- Образует 9  $\alpha$ -спиралей, из которых 4 включают в себя *PPR*-мотивы.

*PPR* мотив состоит из 35 аминокислот (повторяются от 2 до 26 раз) и образует 2 альфа-спирали. *PPR* мотив, вероятно, участвует в связывании с РНК, но механизм этого взаимодействия неизвестен. *PPR*-мотивы содержатся во многих белках митохондрий и хлоропластов.

Таких белков известно уже более нескольких сотен. Их много в хлоропластах и митохондриях.

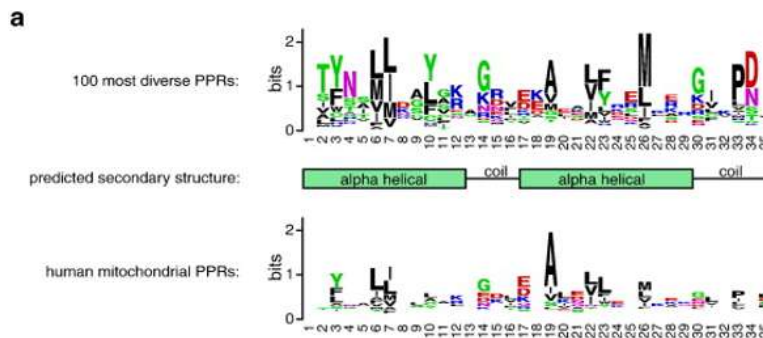


Рис. 6.22. *PPR* мотивы

В митохондриях человека 7 таких белков с мотивами:

1. *LRPPRC* (leucine-rich pentatricopeptide repeat containing protein) участвует в регуляции транскрипции.
2. *MRPP3* (mitochondrial RNase P protein 3) – компонент РНКазы Р, участвует в процессинге 5'-концов тРНК.
3. *MRPS27* (mitochondrial ribosomal protein of the small subunit 27) – компонент малой субъединицы рибосом.
4. *POLRMT* – каталитическая субъединица РНКполимеразы.
5. *PTCD1* (pentatricopeptide repeat domain protein 1) - участвует в процессинге 3'-концов тРНК.
6. *PTCD2* (pentatricopeptide repeat domain protein 2) – участвует в процессинге мРНК
7. *PTCD3* (pentatricopeptide repeat domain protein 3) – связан с 12S рРНК, не влияет на её стабильность и процессинг, функции неизвестны.

#### Участие TFAM в транскрипции.

РНК-полимераза *POLRMT* способна осуществлять транскрипцию только в присутствии TFAM и одного из транскрипционных факторов: *TFBM1* или *TFBM2*.

TFAM регулирует число копий мтДНК и участвует в регуляции транскрипции. Устройство TFAM:

- TFAM высоко консервативен: 77% гомологии у человека и мыши;
- У человека состоит из 246 аа, 25 кДа;
- 23% составляют + аминокислоты.

Доменная структура TFAM:

- Mitochondrial Targeting Sequence (MTS);
- HMG (High mobility group) box I;



- Linker;
- HMG box 2;
- C-terminal tail – нет гомологии ни с одной из известных последовательностей.

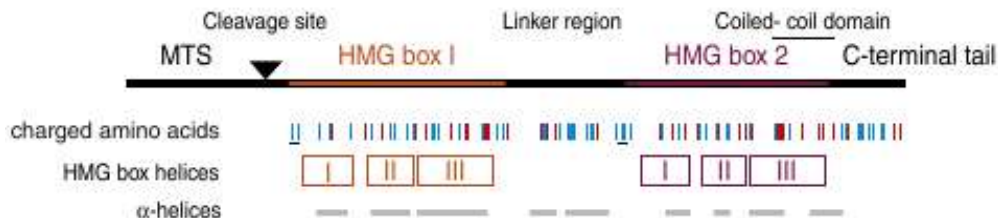


Рис. 6.23. TFAM

*TFAM* – транскрипционный фактор, стимулирующий активность *POLRMT* на двух промоторах: *LSP* и *HSP1*, связывается с ДНК upstream от промотора.

Его уровень направленно регулирует транскрипцию комплексами *TFBM1/POLRMT* и *TFBM2/POLRMT in vitro*.

Связывание *TFAM* с ДНК: *TFAM* способен связываться как со специфичными промоторными последовательностями, так и с неспецифическими последовательностями ДНК.

В низких концентрациях *TFAM* лучше связывается с промоторами *LSP* и *HSP1*, чем с неспецифической ДНК, и с *LSP* лучше, чем с *HSP1*. Разница нивелируется делецией С-конца.

Изгибает ДНК промоторов одинаково, и лучше, чем неспецифическую ДНК, изгиб зависит от наличия С-конца. С *LSP* связывается сильнее. При низких концентрациях *TFAM* активирует *LSP*, по мере возрастания концентрации включает и *HSP1*.

Мутанты *TFAM* (не в С-конце), которые связываются с *LSP*, но слабо сгибают ДНК, сильно снижают транскрипцию с *LSP* → *TFAM* должен изогнуть ДНК в области промотора для начала транскрипции.

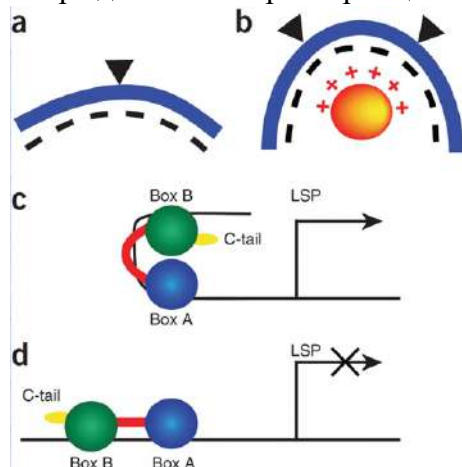


Рис. 6.24. TFAM  
Мутанты

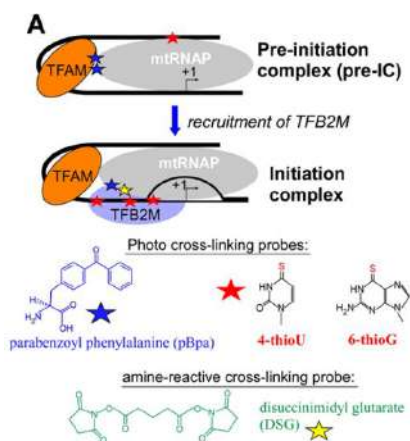


Рис. 6.25. Образование инициаторного комплекса для начала транскрипции

Инициаторный комплекс для транскрипции включает в себя три компонента: *TFAM*, РНК-полимераза и *TFB2M*. На рисунке 6.26 показана структура транскрипционного инициаторного комплекса: есть все взаимодействия, которые происходят между нуклеиновыми кислотами, между ДНК и белками и между белками и белками. Красным цветом показан *TFAM*, который изгибает два белка. *TFB2M* присоединился на последнем этапе.

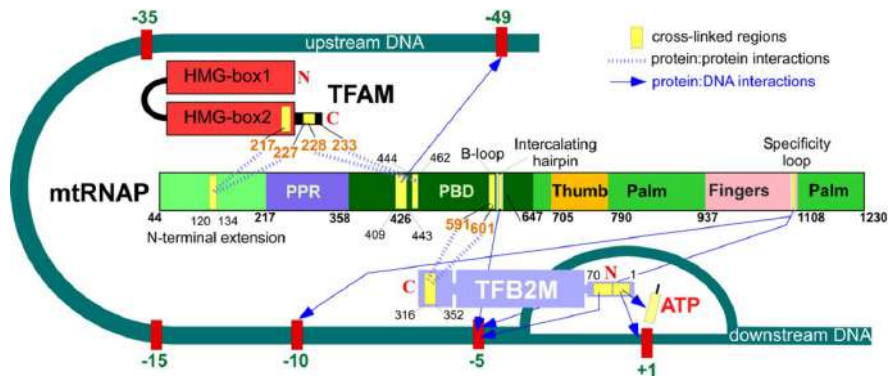


Рис. 6.26. Структура транскрипционного инициаторного комплекса

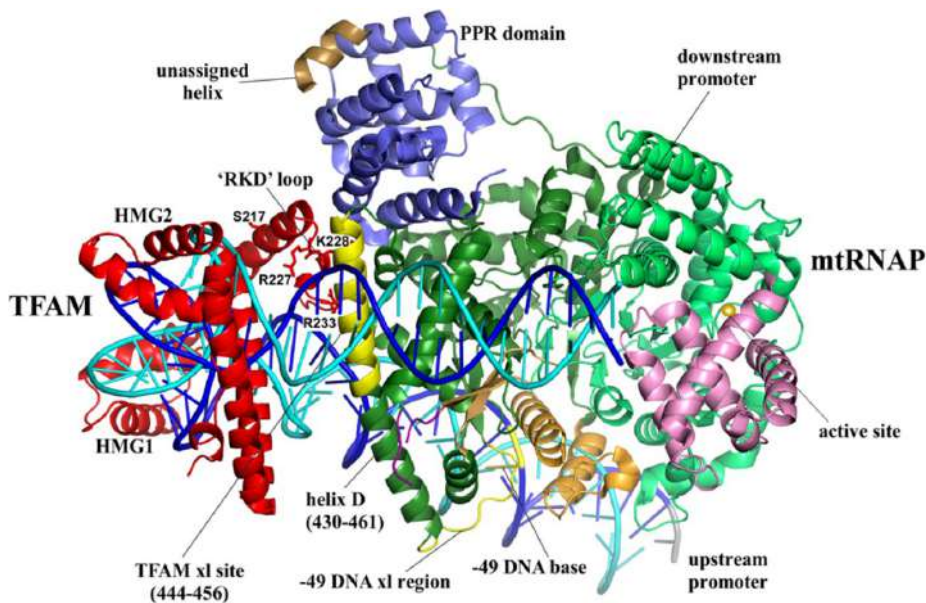


Рис. 6.27. 3D-структура транскрипционного инициаторного комплекса

Стадии образования транскрипционного инициаторного комплекса:

1. *TFAM* связывается с ДНК и изгибает её.
2. Образуется пре-инициаторный комплекс (pre-IC): *POLRMT* (*mtRNAP*) взаимодействует с комплексом *TFAM*-ДНК.
3. Образуется открытый инициаторный комплекс (IC): к pre-IC присоединяется *TFB2M*.

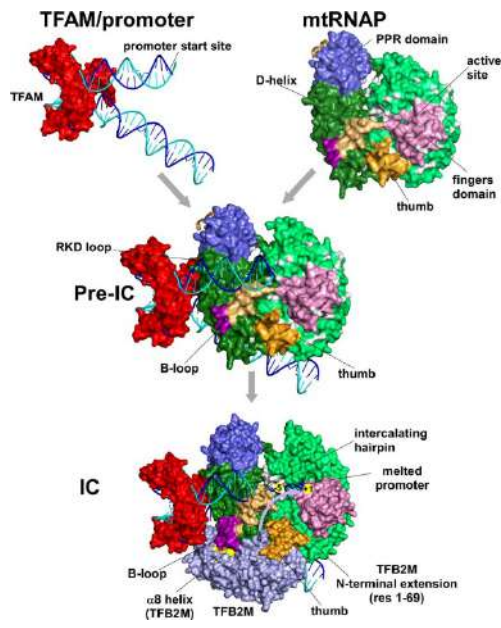


Рис. 6.28. Стадии образования транскрипционного инициаторного комплекса

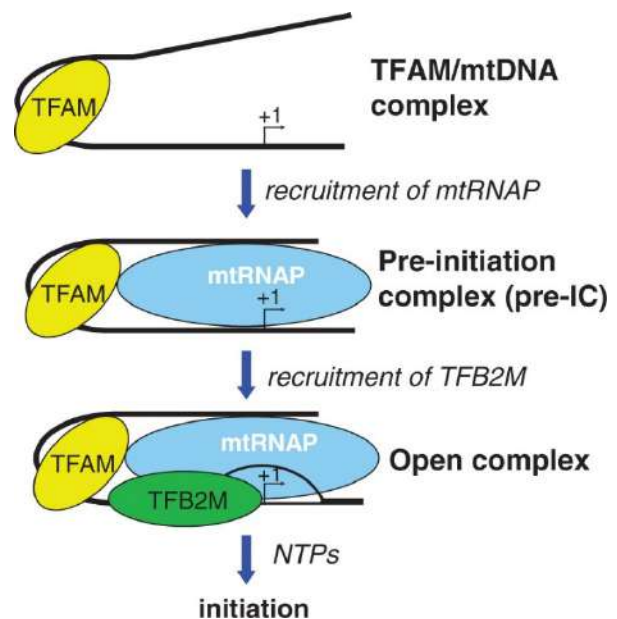


Рис. 6.29. Стадии образования транскрипционного инициаторного комплекса

**Кооперативность связывания TFAM:** одна молекула TFAM стимулирует присоединение следующей, при этом меняется локальная структура ДНК. Для этого важен С-конец.

**Мультимеризация TFAM:**

- Способен к гомодимеризации. Данные противоречивы: мономер или димер?
- Взаимодействует с промоторами и с неспецифической ДНК в форме димера, при наличии С-хвоста.
- При кристаллизации связан с LSP в форме мономера.

**TFAM упаковывает мтДНК в нуклеоидах:**

- При ↑ соотношения TFAM: ДНК ↓ доступность ДНК для ферментов и транскрипционных факторов:
- ДНК метилтрансфераза снижает доступ к ДНК при гиперэкспрессии TFAM, ↑ соотношения TFAM: ДНК ингибирует транскрипцию.

**Уровень TFAM регулирует состояние нуклеоида:**

- Репликация ДНК идет при низкой концентрации
- Экспрессия (транскрипция+трансляция) происходит при среднем уровне TFAM
- «Молчалий» геном наблюдается при высоком уровне

**Регулирование числа копий мтДНК TFAMом.**

Существует 2 гипотезы:

1. Высокая частота связывания TFAM с LSP увеличивает инициацию репликации.

**POLRMT** создает на LSP затравки для репликации. **TFAM** стимулирует транскрипцию с LSP в меньшей концентрации, чем нужна для активации **HSP1**.

## 2. Неспецифическое связывание *TFAM* по всему геному стабилизирует количество копий мтДНК

При гиперэкспрессии *TFAM* с делецией С-конца в клетках с нокдауном эндогенного *TFAM* уменьшается активация транскрипции, но увеличивается число копий мтДНК.

Количество *TFAM* на 1 копию мтДНК: 900-1600 молекул → *TFAM* может быть связан с мтДНК по всей длине через каждые 35-36 нуклеотидов.

Связывание *TFAM* с ДНК – динамичный процесс: *TFAM* способен полностью блокировать ДНК, но в то же время его связь с ДНК лабильна и обеспечивает регуляцию транскрипции.

*TFAM* уничтожается протеазой *Lon*. Известны посттрансляционные модификации: гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование и убиквитинилирование.

Фосфорилирование и протеолиз – основные пути регуляции работы *TFAM*. Протеаза *Lon* регулирует соотношение *TFAM*-ДНК в митохондриях:

- Нокдаун *Lon* увеличивает уровень *TFAM* и число копий мтДНК;
- Гиперэкспрессия *Lon* снижает уровень *TFAM* и количество мтДНК.

*TFAM* фосфорилируется внутри *HMG box 1 (HMG1)* cAMP-зависимой протеинкиназой PKA. Это фосфорилирование ухудшает способность *TFAM* связывать ДНК и активировать транскрипцию.

Только свободный от ДНК *TFAM (DNA-free TFAM)* уничтожается протеазой *Lon*.

### Итог.

1. *TFAM* связывается с ДНК как неспецифически, так и со специфичными промоторными последовательностями
2. При связывании с *TFAM* ДНК изгибается
3. *TFAM* – транскрипционный фактор, стимулирующий активность POLRMT на промоторах HSP1 и LSP
4. Связывание ДНК с *TFAM* необходимо для образования транскрипционного инициаторного комплекса.
5. При низких концентрациях *TFAM* активирует LSP, по мере возрастания его концентрации включается HSP1
6. *TFAM* должен изогнуть ДНК в области промотора для начала транскрипции
7. Уровень *TFAM* регулирует состояние мт ДНК в нуклеоиде
8. Фосфорилирование и протеолиз – основные пути регуляции работы *TFAM*

TEFM (mitochondrial transcription elongation factor):

- увеличивает процессивность POLRMT;
- связывается с POLRMT и препятствует терминации транскрипции в области CSB II.

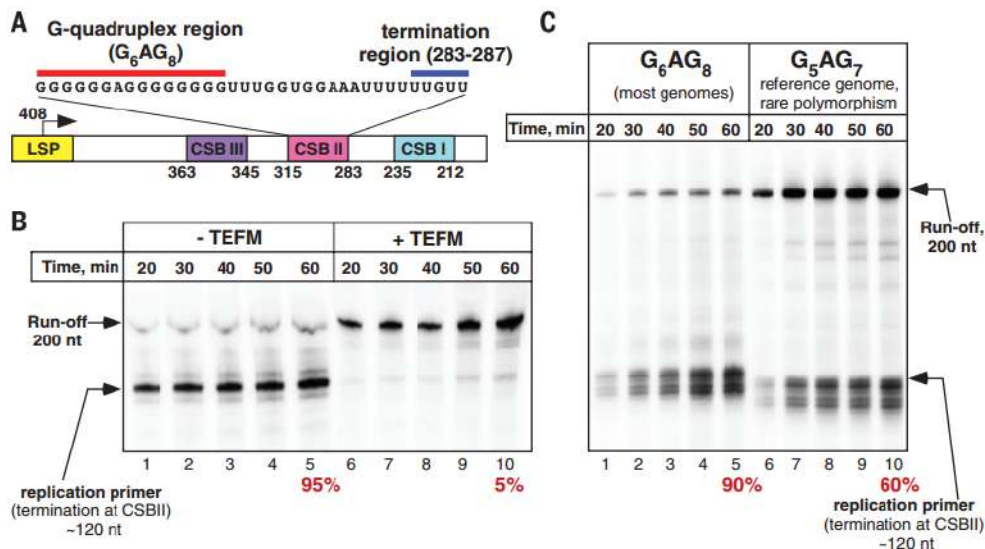


Рис. 6.30. TEFM (mitochondrial transcription elongation factor)

### Терминация транскрипции.

Есть один белок в митохондриях, про который известно точно, что он терминирует транскрипцию с двух из трех промоторов (LSP, HSP1).

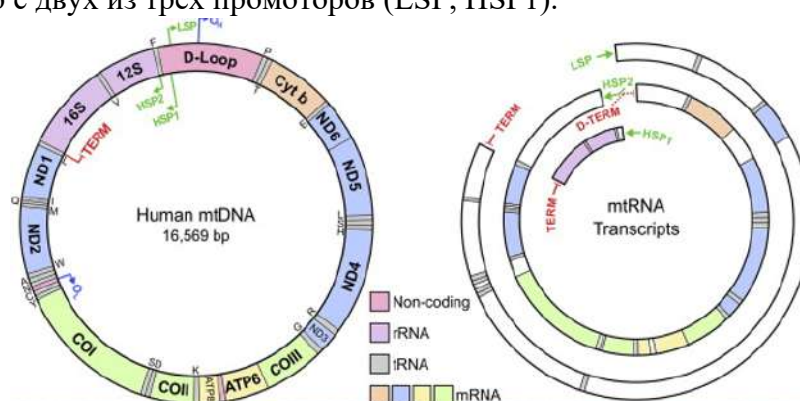


Рис. 6.31. Терминация транскрипции

- Транскрипт *H1* терминируется внутри *tRNA Leu*;
- Транскрипт *L* – вероятно, также терминируется внутри *tRNA Leu*;
- Транскрипт *H2* - точное место терминации неизвестно.

Терминация транскрипции осуществляется *mTERF1*.

*MTERF1* (mitochondrial termination factor) – белок 39 кДа, который содержит 8 *Mterf* мотивов и дополнительный искаженный С-концевой мотив. Между двумя соседними спиральями расположены гидрофобные аминокислоты (D).

*MTERF* связывается вдоль большой бороздки ДНК. Это приводит к изгибу ДНК на 25°. Затем концы ДНК вновь принимают В-конформацию, а центральная часть молекулы расплетается.

Три нуклеотида – А на L-цепи и С, и Т на H-цепи «выворачиваются» из дцДНК, они стабилизируются в таком состоянии тремя аминокислотными остатками *MTERF1*: *R162*, *F243*, *Y288*.

«Вывернутые» нуклеотиды стабилизированы дополнительно Н-связями с азотистыми основаниями и фосфатными группами.

Мутантный *MTERF1* (по *R162*, *F243*, *Y288*) связывается с ДНК (В), но «вывернутые» нуклеотиды нечем стабилизировать → только 1 нуклеотид – С остается вне цепи, хотя и в другой конформации.

Из трех аминокислот *R162*, *F243*, *Y288*, только *R162* консервативен → у других видов механизм связывания *MTERF1* с ДНК может быть другим.

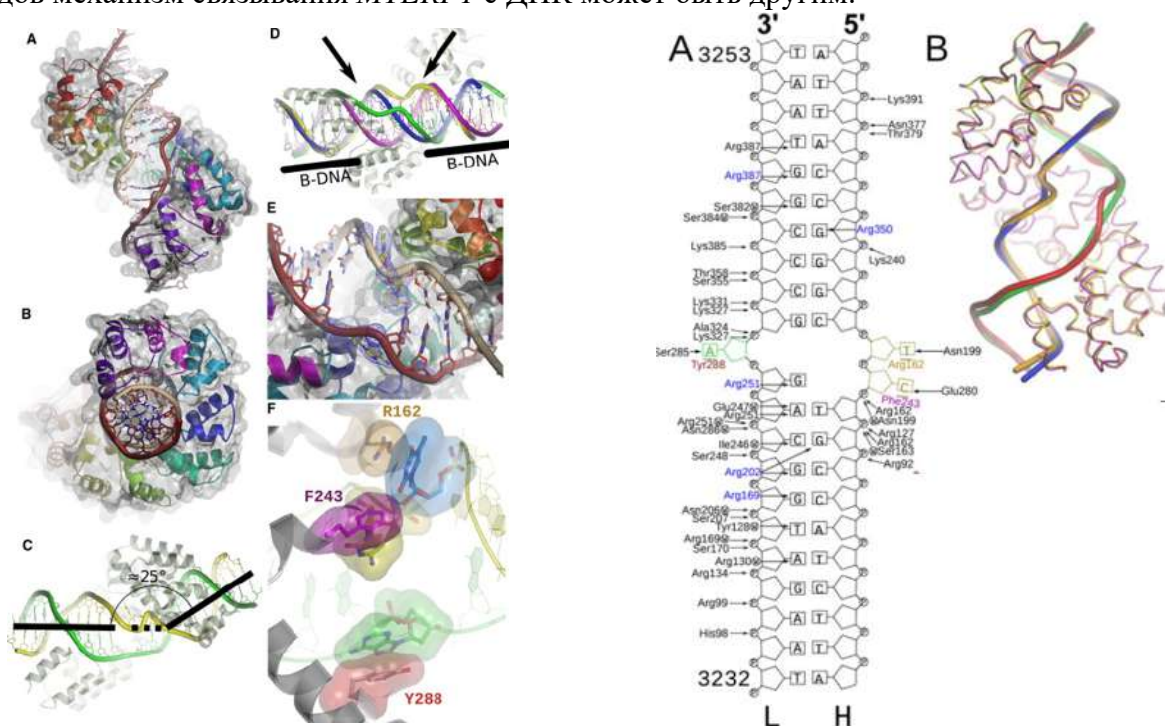


Рис. 6.32. *MTERF1*

*MTERF1* связывается с ДНК неспецифично: за счет электростатических взаимодействий между фосфатными группами и положительно заряженной поверхностью белка.

*MTERF1* связывается с ДНК неспецифично, но «вывертывание» 3-х нуклеотидов происходит только в результате узнавания специфической последовательности.

Мутантный *MTERF1* (по *R162*, *F243*, *Y288*) связывается с сайтом терминации хуже *wtMTERF1*, и примерно с такой же аффинностью как *wtMTERF1* связывает неспецифичную дцДНК → «вывертывание» нуклеотидов – результат специфичности связывания.

Вывертывание нуклеотидов не определяет специфичность, а только стабилизирует связывание.

Специфичность определяется Н-связями 5-ти *Arg MTERF1* с большим желобком ДНК. И *Arg*, и нуклеотиды, с которыми они взаимодействуют, консервативны в *MTERF1* и мтДНК соответственно. В других *MTERF Arg* не консервативны.

*MTERF1* способен связываться с неспецифической последовательностью ДНК.

Но «вывертывание» нуклеотидов, способствующее высокой аффинности связывания, происходит только при узнавании специфической последовательности – сайта терминации.

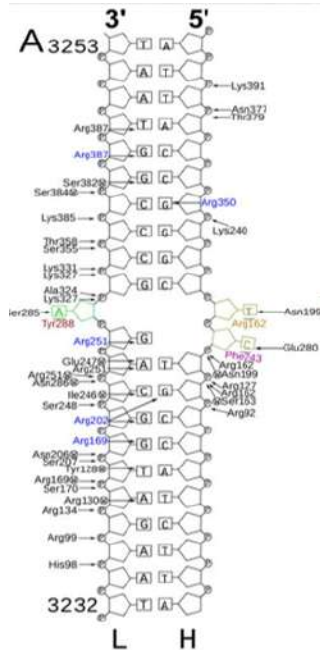


Рис. 6.33. Специфическая последовательность ДНК

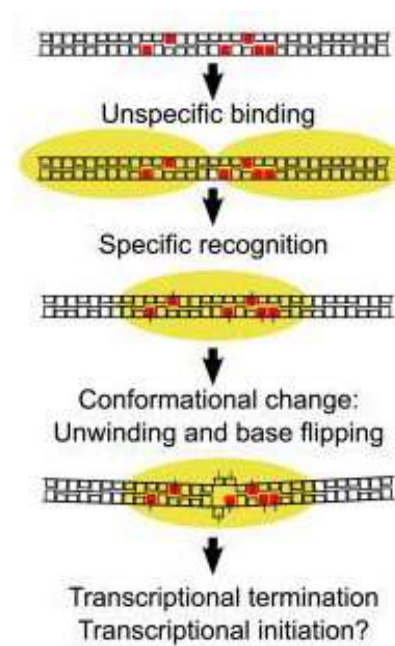


Рис. 6.34. Нуклеотиды гуанина, с которыми связываются аргенины

Мутации в сайте связывания *MTERF1* вызывают серьезные митохондриальные заболевания:

- Замена *A3243G* присутствует в 80% случаев *MELAS* (*Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like Episodes*). Такая замена несильно влияет на уровень транскрипции с *HSP*, но нарушает структуру *mРНК<sup>Leu</sup>*. По терминации *LSP* данных нет.
- Замена *G3249A* синдром *Kearns-Sayre*.
- Замена *G3242A* – неохарактеризованная митохондриальная патология.

*In vitro* терминация в тРНК<sup>Leu</sup> с помощью *MTERF1* двунаправлена: т.е. терминируется синтез транскриптов *H1* и *L*. Но терминация транскрипта с *LSP* гораздо более эффективна.

Терминация транскрипта *H2* происходит *upstream* тРНК *Phe*. Сайт терминации не определен. Известны 2 белка, которые связываются с этим участком.

Механизм терминации транскрипции *MTERF1* напоминает механизм терминации репликации у *E.coli*.

Фактор терминации *Tus* связывается с ДНК также выворачивая основания.

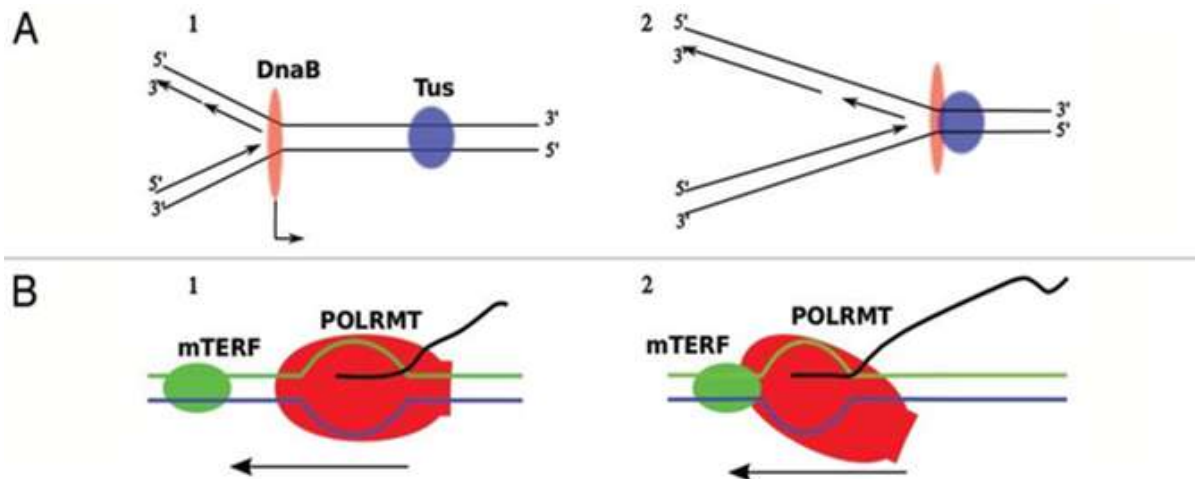


Рис. 6.35. Механизм терминации транскрипции

### Итог.

1. *MTERF1* связывается с ДНК неспецифично.
2. *MTERF1* связывается с сайтом терминации с большей аффинностью, чем с неспецифической последовательностью ДНК за счет «вывертывания» нуклеотидов.
3. Специфичность связывания *MTERF1* с сайтом терминации определяется взаимодействием 5-ти остатков *Arg* с несколькими консервативными нуклеотидами.
4. *MTERF1* способен инициировать транскрипцию *in vitro*.
5. Мутации в сайте терминации транскрипции вызывают серьезные митохондриальные заболевания.

### Другие белки семейства MTERF.

*MTERF1* и *MTERF2* уникальны для Позвоночных

*MTERF3* и *MTERF4* есть не только у Позвоночных, но и у Беспозвоночных животных (червей и насекомых)/

*MTERF1-3* участвуют в транскрипции, а *MTERF3* и *MTERF4* - в трансляции.

*MTERF2*:

- гиперэкспрессия ингибирует рост клеток
- связывается с ДНК неспецифически и присутствует в нуклеоидах

Нокаут в мыши: дефекты в дыхательной цепи при переходе с высокоуглеводной на низкоуглеводную диету: ↑ уровня большинства мРНК и тРНК и ↓ трансляции некоторых белков.

На стандартной диете – нормальный уровень всех РНК, кроме ↑ тРНК ближних к промотору и ↓ тРНК дальних от промотора → *MTERF2* позитивный регулятор транскрипции.

Нокаут также ↑ число копий мтДНК → *MTERF2* может быть регулятором репликации.

*MTERF3*:



Структура похожа на *MTERF1*, но в *MTERF3* есть только 1 *Arg* из пяти, необходимых для специфичного связывания с ДНК и только одна из трех аминокислот, необходимых для стабилизации вывернутых оснований.

Нокаут в мышцах: летален у эмбрионов, т.к. сильно изменен уровень транскрипции и соотношение разных транскриптов.

*MTERF3* регулятор транскрипции. Снижение экспрессии *MTERF3* активирует транскрипцию и нарушает сборку большой субъединицы рибосомы.

Вероятно, *MTERF3* – важный регулятор экспрессии митогенома, т.к. координирует регуляцию транскрипции и трансляции в митохондриях.

*MTERF4*:

*MTERF4* связывает 16SpРНК и формирует комплекс с мт рРНК-метилтрансферазой *NSUN4*, далее комплекс взаимодействует с большой субъединицей рибосомы.

Инактивация гена *MTERF4*:

- ингибирует трансляцию
- *NSUN4* не попадает в большую субъединицу
- количества малой и большой субъединиц возрастают, но они не взаимодействуют

**Итог (факторы транскрипции).**

1. POLRMT – РНК-полимераза, проводит транскрипцию и синтезирует праймеры для ДНК-полимеразы.
2. TFAM (h-mtTFA –transcription factor A) – регулирует число копий мтДНК и участвует в регуляции транскрипции.
3. TFBM1 (h-mtTFB1) – рРНК-метилтрансфераза (MT), участвует в регуляции трансляции, транскрипционный фактор
4. TFBM2 (h-mtTFB2) – транскрипционный фактор, образует гетеродимер с POLRMT, рРНК-метилтрансфераза (MT)
5. TFEM (transcriptional elongation factor mitochondrial) – ↑ процессивность POLRMT, основной «переключатель» между репликацией и транскрипцией
6. MTERF1 (mitochondrial termination factor) – терминатор транскрипции.

**Продукты мтДНК, регулирующие метаболизм.**

В митохондриальном геноме есть несколько коротких ORF, продукты которых являются важными регуляторами метаболизма:

- *Humanin* и *SHLPs* (*small humanin-like peptides*) закодированы внутри гена 16S rRNA;
- *MOTS-c* (*mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA type-c*) - закодирован внутри гена 12S rRNA;
- *Gau* – закодирован на комплементарной цепи в гене *cox1*.

*Humanin* – пептид, закодированный внутри митохондриального гена 16S rRNA. Действия пептида:

- Нейропротекторное действие: увеличивает жизнеспособность нейронов при нейродегенеративных патологиях;

- Противовоспалительное действие;
- Антиапоптотическое действие;
- Регулятор многих метаболических путей.

Генетический код в мтДНК несколько отличается от универсального (рис. 6.36, 6.37).

		Second letter				Third letter
		U	C	A	G	
First letter U	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA Stop AGG Stop	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Рис. 6.36. Митохондриальный генетический код

		SECOND LETTER				THIRD LETTER
		U	C	A	G	
FIRST LETTER	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Рис. 6.37. Универсальный генетический код

Humanin связывается со многими клеточными рецепторами и участвует во множестве сигнальных путей.

Возможные функции *MOTS-c*:

- Активен в мышцах;
- Ингибирует фолатный цикл, активирует AMPK;
- Участвует в регуляции метаболизма;
- Препятствует диет-зависимой инсулиновой резистентности и ожирению.

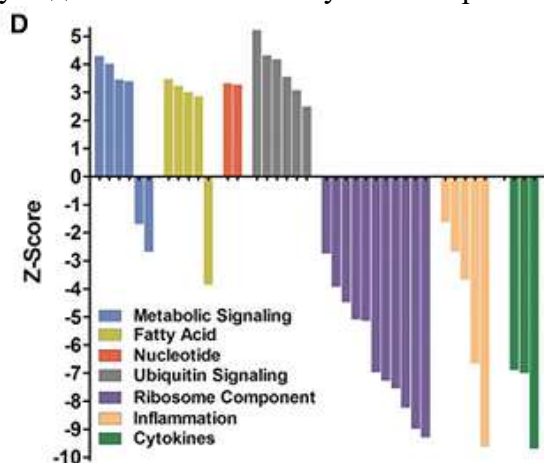


Рис. 6.38. Влияние MOTS-c на экспрессию генов разных функциональных групп

**Итог.**

В митохондриальном геноме закодированы короткие пептиды, возможно, являющиеся важными регуляторами многих метаболических путей:

- Humanin и SHLPs;
  - MOTS-c;
  - Gau.
2. ORFs для Gau-подобных и Humanin-подобных пептидов найдены в ядерных геномах Позвоночных.

## Лекция 7. Процессинг митохондриальных РНК

### 7.1. Транскрипция митохондриальных РНК

#### Транскрипты и промоторы в мтДНК.

Существует 3 транскрипта, которые образуются на митохондриальной ДНК:

- На L-цепи – 8 тРНК + 1 мРНК.
- На H-цепи – 2 рРНК + 14 тРНК + 11 мРНК.

Гены мтДНК у животных не содержат интронов.

#### Процессинг митохондриальных РНК.

В результате транскрипции мтДНК образуются полицистронные прекурсоры.

- Разрезание полицистронных прекурсоров;
- Полиаденилирование мРНК;
- Модификации нуклеотидов.

Полицистронные пре-РНК образуется в результате транскрипции с:

- *HSP2*: 10 мРНК (*ATP8/ATP6* и *ND4L/ND4* остаются бицистронными) + тРНК;
- *HSP1*: 2 рРНК + 2 тРНК;
- *LSP*: 1 мРНК (*ND6*) и тРНК.

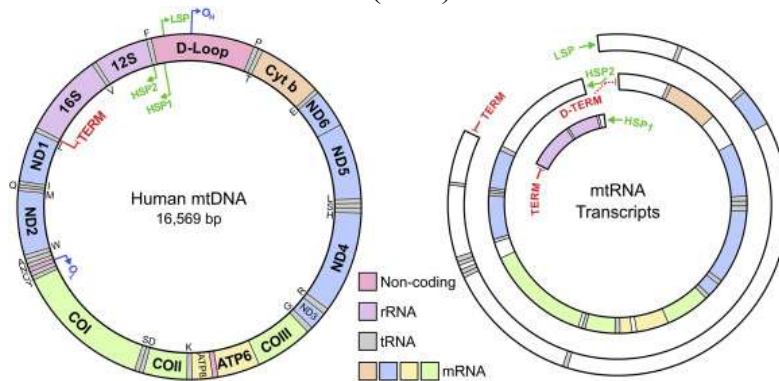


Рис. 7.1. Транскрипты и промоторы в мтДНК

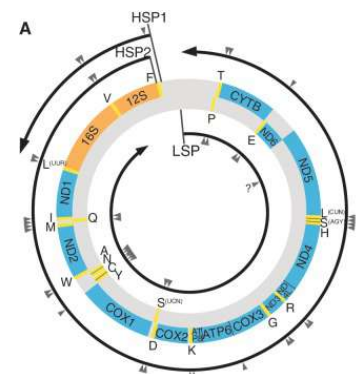


Рис. 7.2. Процессинг митохондриальных РНК

Для описания разреза полицистронных предшественников в 1981 году была предложена tRNA punctuation model of RNA processing (рис. 7.2), которая основана на том, что, посмотрев на митохондриальный геном, авторы обнаружили, что отдельные мРНК (показаны синим цветом на рисунке), рРНК (показаны оранжевым цветом на рисунке) и тРНК (показаны желтым цветом на рисунке). Если из полицистронных транскриптов вырезать тРНК, то это приведет к тому, что появятся отдельные мРНК, тРНК и рРНК. В дальнейшем эта модель подтвердилась экспериментально.

В геноме есть четыре места, которые не содержат тРНК, поэтому в этих местах необходимо вносить дополнительные разрезы. До сих пор не очень известно, какие ферменты участвуют в этом процессе.

Процессинг митохондриальных тРНК включает:

- Процессинг 5'-конца тРНК -РНКаза P;
- Процессинг 3'-конца тРНК -РНКаза Z;
- На 3'-конец тРНК добавляется триплет ССА - АТР (СТР)-тРНКтрансфераза;

- Модификация множества нуклеотидов.

**Процессинг 5'-конца тРНК осуществляет РНКаза Р.**

- *MRPP1* (*mitochondrial RNase P peptide 1*) – m<sup>1</sup>G<sup>9</sup> метилтрансфераза, участвующая в модификации тРНК;
- *MRPP2* (*mitochondrial RNase P peptide 2*) – имеет *NAD<sup>+</sup>-binding domain*, есть также в цитоплазме;
- *MRPP3* (*mitochondrial RNase P peptide 3*) – PPR-белок, имеет металлонуклеазный домен.

*MRPP1* (*mitochondrial RNase P peptide 1*) – m<sup>1</sup>G<sup>9</sup> метилтрансфераза.

Метилирует G и A в положении 9 мт-*tRNA*. Эта модификация важна для нормального аминокислотирования и транспорта тРНК к рибосоме.

Нокаут *MRPP1*, помимо падения уровня большинства тРНК, приводит к сильному уменьшению количества мРНК и сильному падению уровня трансляции.

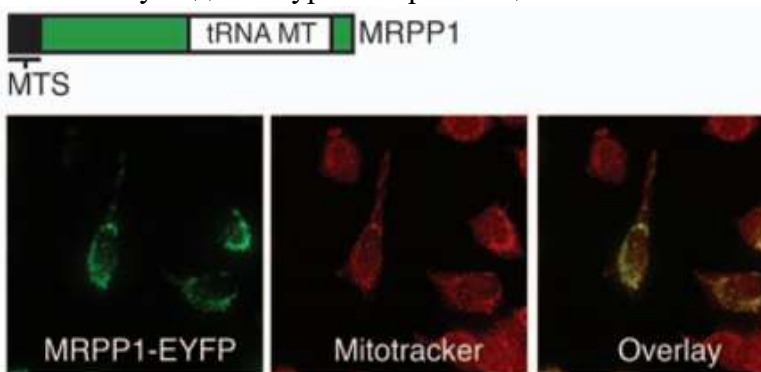
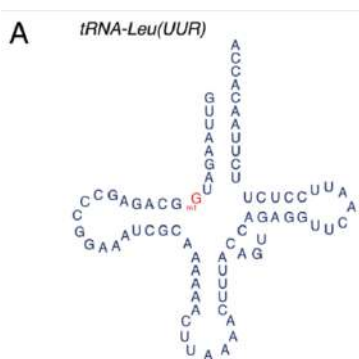


Рис. 7.3. *MRPP1*

Рис. 7.4. Митохондриальная локализация *MRPP1*

Роль белка *MRPP2* (*mitochondrial RNase P peptide 2*) практически не изучена. *MRPP3* (*mitochondrial RNase P peptide 3*).

Нокаут *MRPP3* снижает уровень многих тРНК, а также сильно уменьшает количество мРНК и бицистронных РНК и незначительно снижает уровень рРНК.

Нокаутная по гену *MRPP3* мышь нежизнеспособна. Тканеспецифичный нокаут в сердце и скелетных мышцах приводит к тяжелой кардиомиопатии.

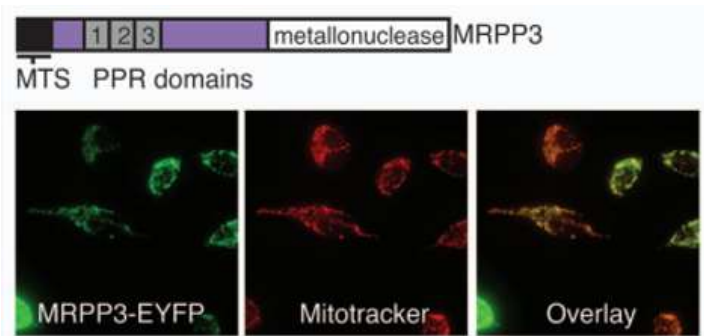


Рис. 7.5. Митохондриальная локализация *MRPP3*

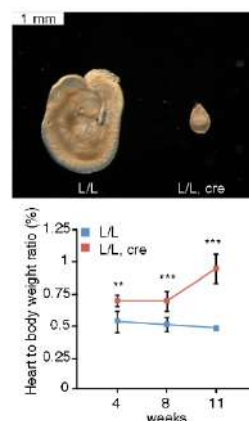


Рис. 7.6. Нокаутная по гену *MRPP3* мышь

На рисунке 7.6 показан график: по осям: время жизни мыши и соотношения веса сердца к телу, которое характеризует нормальное развитие сердца. Синим цветом показаны данные по нормальной мыши, красным цветом – по нокаутной мыши. У нормальной мыши соотношение веса сердца к телу сохранилось на протяжении всей жизни, у нокаутной мыши с 4 до 8 недели все показатели оставались нормальными, затем резко показатели изменились – это свидетельство плохого состояния нокаутной мыши.

*MRPP3 – human PRORP.*

Ортологи *MRPP3* найдены у многих эукариот и объединены в семейство *PRORP* (*PROteinaceous RNase P*).

На рисунке 7.8 показано филогенетическое древо: серым цветом показаны те организмы, у которых предсказано, но не доказано экспериментально наличие фермента и черным цветом показаны те организмы, у которых доказано наличие фермента.

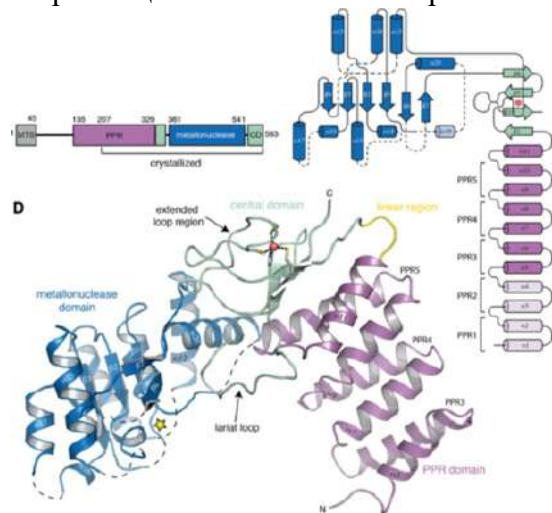


Рис. 7.7. Семейство PRORP (*PROteinaceous RNase P*)

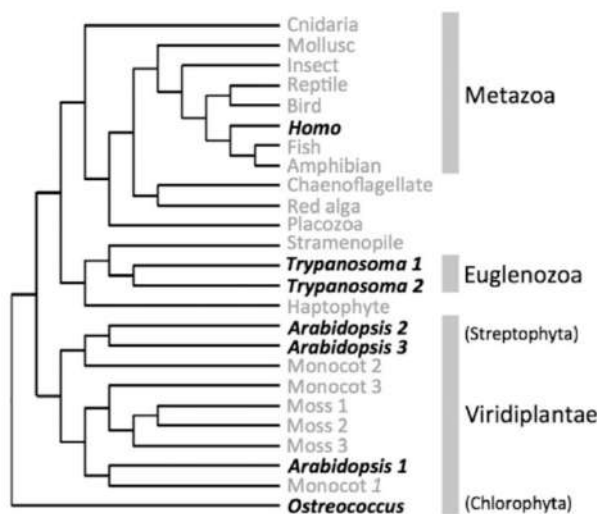


Рис. 7.8. Филогенетическое древо PRORP

Связывание рибозимной РНКазы P и PRORP с tRNA.

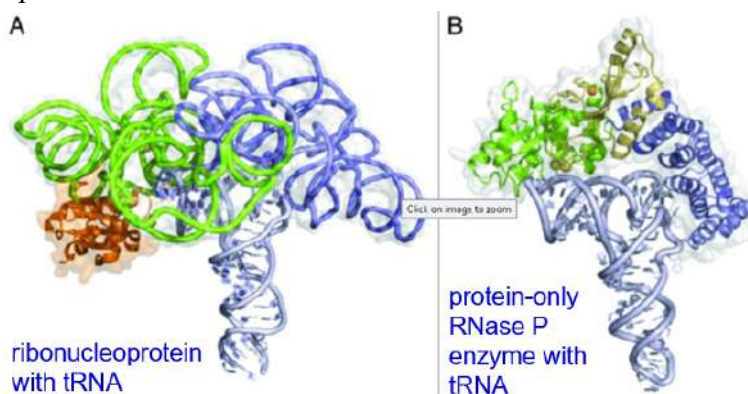


Рис. 7.9. Сравнение структур РНКазы P и PRORP с tRNA

На рисунке 7.9: каталитический домен – зеленый, РНК-связывающий домен – синий, белковая часть РНКазы Р – оранжевая, центральный домен PRORP – желтый, ион  $Zn^{2+}$  - оранжевый.

#### Процессинг 3'-конца тРНК осуществляет РНКаза Z.

Эндонуклеаза *ELAC2* (*elaC* homologue 2) оказалась РНКазой Z.

*ELAC2* взаимодействует с *PTCD1*, также участвующим в процессинге 3'-конца тРНК.

Нокдаун снижает уровень многих тРНК, не влияя на уровень мРНК и бицистронных РНК.

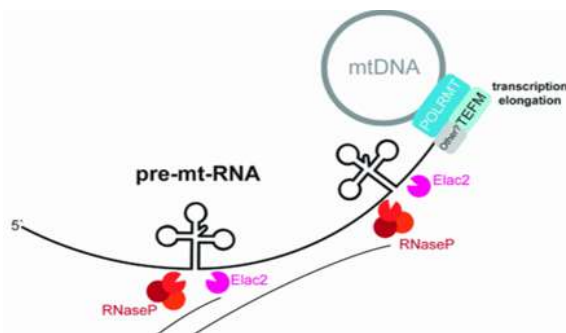


Рис. 7.10. Эндонуклеаза *ELAC2*

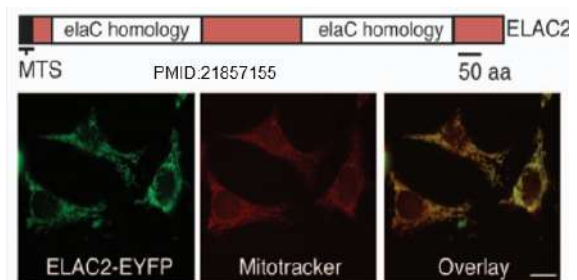


Рис. 7.11. Эндонуклеаза *ELAC2* (*elaC* homologue 2)

#### Итог.

1. Процессинг полицистронных мт-предшественников РНК происходит за счет вырезания из них тРНК – tRNA punctuation model.
2. Процессинг 5'-конца тРНК осуществляет мтРНКаза Р – комплекс из трех белков: *MRPP1*, *MRPP2*, *MRPP3*.
3. *MRPP3* (*mitochondrial RNase P peptide 3*) является *PRORP*.
4. Процессинг 3'-конца тРНК осуществляет РНКаза Z – эндонуклеаза *ELAC2*, возможно работающая в комплексе с белком *PTCD1*.
5. Процессинг 5' tRNA предшествует процессингу 3' tRNA.
6. На 3'-конец тРНК добавляется триплет *CCA*.
7. В мт-тРНК происходит модификация множества нуклеотидов.

#### Процессинг митохондриальных мРНК.

Для образования длинных транскриптов в транскрипции необходим фактор TEFM. Без него полимеразы могут осуществлять транскрипцию, но транскрипты получаются короткими. Для синтеза дистальных от промотора транскриптов на обеих цепях необходим TEFM (transcription elongation factor mitochondrial). Затем происходит нарезание полицистронного транскрипта (вырезание тРНК + разрезание в некоторых дополнительных местах). После этого происходит полиаденилирование всех мРНК.

В геноме митохондрий есть 4 сайта не содержащих тРНК, но в которых происходит разрезание транскриптов при созревании:

- 5'-конец *COX1* – *MRPP1*;
- между *ND5* и *CYT B* – предположительно участвует *PTCD2*;

- остальные 2 участка – механизм неизвестен.

### Полиаденилирование мРНК

У цитоплазматических мРНК *poly (A)* имеют разные функции:

- стабилизирует транскрипт;
- способствует выходу из ядра;
- способствует инициации трансляции.

У бактерий и в хлоропластах *poly (A)* стимулирует деградацию мРНК.

В митохондриях функции *poly (A)* различны у разных организмов:

- у растений – сигнал к деградации;
- у дрожжей – нет *poly (A)*, есть *AU*-богатый участок, необходимый для стабилизации;
- у простейших короткий *poly (A)* стабилизирует транскрипт во время редактирования, затем *poly (A)* удлиняется для трансляции.

Мт-мРНК имеют 3'-*poly (A)* длиной около 45 нуклеотидов.

У мРНК *ND5* короткий *poly (A)* хвост, у мРНК *ND6* – его нет совсем, но у этих двух мт-мРНК есть длинный 3'-*UTR*.

*ND5* и *ND6* имеют короткие 3'-*poly (A)* в силу того, что 3'-*UTR ND5* комплементарна кодирующей последовательности *ND6*, и наоборот – 3'-*UTR ND6* комплементарна кодирующей последовательности *ND5*.

- Возможно мРНК *ND5* и *ND6* образуют дц гибрид, что и препятствует полиаденилированию.
- Возможно, 3'-*UTR* мРНК *ND5* и *ND6* формируют стабильные вторичные структуры.

Кроме того, полиаденилирование мт-мРНК создает стоп-кодона для трансляции. Для семи мт-мРНК полиаденилирование создает стоп-кодон на 3'-конце, т.к. они заканчиваются на *U* или *UA* и не несут стоп-кодона.

Таблица 7.1. Стоп-кодона для трансляции

Митохондриальный транскрипт	Стоп-кодон
CO1	UAG
CO2	UAG
CO3	UAA
ND1	UAA
ND2	UAA
ND3	UAA
ND4/4L	UAA
ND5	UAA
ND6	UAG
CyB	UAA
ATP6/8	UAA
12S	
16S	



*Комментарий к таблице:* если стоп-кодона имеют подчеркнутую A, то это значит, что A довшиваются при создании *poly (A)* хвоста.

Ферменты полиаденилирования: *hmtPAP (poly (A)-polymerase)* – имеет гомологию с одной из цитоплазматических *PAP*.

Неизвестно, идет ли полиаденилирование в 2 стадии: олигоаденилирование, а уже затем образование длинного *poly (A)* с помощью *PAP*.

При нокдауне *PAP* полиА хвосты у всех мРНК короткие, уровень некоторых (*COX1* и *COX2*) понижается, а некоторых не меняется или повышается (*ND1, ND2, ND3, CYT B*).

При искусственном деаденилировании в митохондриях уровень мРНК *COX1* и *COX2* уменьшается, а мРНК *ND1, ND2, ND3, CYT B* наоборот увеличивается.

Фермент *PNPase (polynucleotide phosphorylase + 3'-5'- экзонуклеаза)* имеет две активности:

- 3'-5' экзорибонуклеаза;
- 3'-концевая олигонуклеотидполимераза.

Гомолог одной из основных экзонуклеаз бактерий, может синтезировать *poly (A)* в отсутствии *hmtPAP*. При ↓ уровня *PNPase* – удлиняются *poly (A)* хвосты мРНК *COX1* и *COX2, COX3, ATP8/6* и *ND3*, хотя это не влияет на их время жизни. *PNPase* локализована в межмембранном пространстве, где нет мРНК.

#### **Деградация мт-мРНК.**

Основные ферменты, участвующие в деградации митохондриальной мРНК:

1. *PNPase*.
2. *poly(A)-specific exoribonucleases: PARN, PDE12*.
3. *SUV3* РНК-хеликаза (её гомолог у дрожжей участвует в деградации мРНК).

*SUV3 in vitro* образует комплекс с *PNPase*, который разрушает РНК в направлении 3'-5'.

Гиперэкспрессия доминантно-негативного мутанта *SUV3* приводит к удлинению *poly(A)* хвостов мРНК.

Нокдаун как *PNPase*, так и *SUV3* приводит к практически полному отсутствию деградации мРНК и некоторая доля этих молекул имеет *poly(U)*. *PDE12* способен деградировать *poly(U)* последовательности.

Полиаденилирование мРНК митохондрий не оказывает решающего действия на их стабильность и не служит сигналом к их деградации.

На рисунке 7.12 показана таблица влияния полиаденилирования мРНК на стабильность митохондрий. Розовым цветом показаны работы, в которых производилось экспериментальное воздействие, которое должно было удлинить *poly (A)* хвост. Иногда в отсутствии *PNPase* хвосты не разрушаются, а так же любая инактивация *SUV3* (в разных работах она выполнена по-разному). Буквами *AA* обозначен нормальный хвост, тремя буквами *AAA* обозначен удлинённый относительно нормы хвост, одной буквой *A* обозначен короткий хвост. Фиолетовым выделены те работы, в которых экспериментальное воздействие было таким, что *poly (A)* хвосты укорачивались. Было Общй вывод о влиянии *poly (A)* хвоста влияет на уровень мРНК и на их стабильность сделать на данный момент нельзя.

**Table 1 Effects of mitochondrial protein manipulations on transcript stability, polyadenylation profile and processing**

A/AA, 'A' additions required for stop codon; A, <10; AA, 20–50; AAA, >50; †, changes in the steady-state levels of mature transcripts; -, no changes in the steady-state levels of mature transcripts; †, precursors and/or truncated mt-RNA species observed; †, inconsistent data on poly(A) between siRNA oligonucleotides; †, the length of the poly(A) tail deduced from reduced size on Northern blot; †, except for ND1 and CO2 the length of the poly(A) tail deduced from a reduced size on Northern blot; †, taken from [27]; KO, precursor RNAs analysed in mouse knockout (KO)-derived cells [19]; O-E, overexpression.

Mitochondrial transcript	Stop codon	3' UTR (nt)	Knockdown of PNPase	Inactivation of SUV3	Knockdown of mtPAP	O-E of PARN <sup>3</sup>	O-E of PDE12 <sup>4</sup>
CO1	UAG	72	-/AAA -/A/P <sup>+</sup> †/P <sup>+</sup> KO		†/A † †/A †		†/A
CO2	UAG	24	-/AAA †/P <sup>+</sup> KO	-/P <sup>+</sup>	†/A † †/A †		†/A
CO3	UAA	0	-/AAA -/AA -/P <sup>+</sup> KO		-/A † †/A †		-/A
ND1	UAA	0		†/P <sup>+</sup>	†† ~ ††/A ††/A		††/A
ND2	UAA	0		†/P <sup>+</sup>	†† - ††/A ††/A		††/A
ND3	UAA	0	-/AAA - <sup>2</sup>	††/AAA/P <sup>+</sup>	†/A †/A -/A - -/A -/A		-/A
ND4/4L	UAA	0		-/P <sup>+</sup>	† - -/A -/A		-/A
ND5	UAA	568	-/AAA -/AAA ~		- -/A -/A		-/A
ND6	UAG	33/34 <sup>5</sup>					~
CytB	UAA	0				~	†/A
ATP6/8	UAA	0		†/P <sup>+</sup> KO AAA/P <sup>+</sup>	†/A † †/A † †/A †		-/A
12S				†		-	-
16S			-/A/P <sup>-</sup> †	†/AAA/P <sup>+</sup>		-	-
Reference		[13]	[34] [43] [19]	[144]	[33] [48] [34] [47] [49]		[50]

Рис. 7.12. Влияние полиаденилирования мРНК на стабильность митохондрий

### Итог.

1. Процессинг мт-мРНК включает в себя нарезание полицистронного транскрипта (вырезание тРНК + разрезание в некоторых дополнительных местах) и полиаденилирование.
2. Мт-мРНК имеют 3'-poly (A) длиной около 45 нуклеотидов, исключение составляет ND6.
3. Полиаденилирование мт-мРНК создает стоп-кодоны для трансляции 7ми мРНК
4. Основные ферменты полиаденилирования в митохондрии: *hmtPAP* (poly (A)-polymerase) и *PNPase* (polynucleotide phosphorylase + 3'-5'- экзонуклеаза).
5. Основные ферменты, участвующие в деградации мт-мРНК: *PNPase* (polynucleotide phosphorylase + 3'-5'- экзонуклеаза) и РНК-хеликаза *SUV3*.
6. Полиаденилирование мРНК митохондрий не оказывает решающего действия на их стабильность и не служит сигналом к их деградации.

### 7.2. Регуляция уровня мт-мРНК

Количество разных молекул мРНК варьирует в широких пределах (6000 – 51000 на клетку). Существует активная регуляция количества мРНК:

- Комплекс *LRPPRC/SLIRP* увеличивает стабильность мРНК, стимулируя полиаденилирование мРНК мтPAPом;
- Регуляция уровня мРНК на посттранскрипционном уровне: *TACO1* (translational activator of mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I) – мутации в нем вызывают падение синтеза белка *COXI*.

### Посттранскрипционная регуляция стабильности мРНК в митохондриях.

Уровень 10 разных мРНК, образованных в результате нарезания пре-мРНК, существенно отличается. И имеет корреляцию с временем жизни: чем ↑ время жизни, тем большее количество данного вида мРНК содержится в митохондриях.

На графике (рис. 7.13) практически все мРНК укладываются на прямую линейную зависимость. Чем больше время жизни, тем больше количества копий у мРНК.

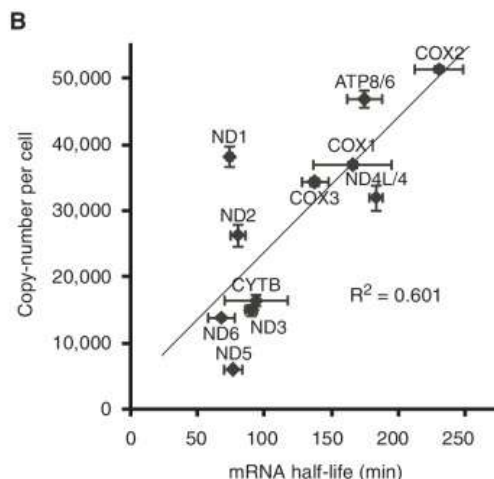


Рис. 7.13. График зависимости количества копий мРНК от времени жизни

Самая долгоживущая мРНК – *COX2* (табл. 7.2) – у нее больше всего копий. Самая короткоживущая *ND6*.

Таблица 7.2. Количество копий мт-мРНК и их время жизни в клетках HeLa

mRNA	Copy numbers/cell	Half-life (min)
<i>ND1</i>	38000±1600	74±2
<i>ND2</i>	26000±1600	80±6
<i>COX1</i>	37000±490	166±29
<i>COX2</i>	51000±480	231±18
<i>ATP8/6</i>	47000±1300	175±13
<i>COX3</i>	34000±600	138±10
<i>ND3</i>	15000±850	91±4
<i>ND4L/4</i>	32000±1900	183±5
<i>ND5</i>	6000±73	77±7
<i>CYTB</i>	16000±840	94±24
<i>ND6</i>	14000±290	68±10

Исключениями являются *ND5*, *ND2* и *ND1*. Довольно много копий у *ND1* и *ND2*, при этом время жизни – маленькое. Это можно объяснить следующим образом:

Если мтДНК имеет мутации, образовавшиеся под действием *ROS*, транскрипты могут быть короткими, т.к. *POLRMT* останавливается, дойдя до мутированных нуклеотидов.

Гены *ND1* и *ND2* находятся ближе всех к промотору *HSP2*. Фактор элонгации *TEFM* необходим *POLRMT* увеличения процессивности – т.е. для транскрипции дистальных генов. *TEFM* может не хватать, тогда будет образовываться больше проксимальных мРНК, чем дистальных.

Существует комплекс *LRPPRC* (leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein), который регулирует уровень всех мРНК. Комплекс локализован в митохондриях, содержит 16 *PPR* мотивов, связывающих оцННК. *LRPPRC* образует стабильный комплекс с *SLIRP*. *SLIRP* (stem-loop-interacting RNA-binding protein), имеет участок связывания с оцННК, локализован в митохондриях. Нокаунт или *LRPPRC* резко снижает уровень мРНК, не влияя на уровень рННК и тННК. Нокаут *LRPPRC* летален у мышей – у эмбрионов снижено полиаденилирование и они погибают.

Комплекс *LRPPRC* и *SLIRP* стабилизирует долгоживущие мт-мРНК. Уровень мт-мРНК в клетках *Hela* после нокадауна *LRPPRC* и *SLIRP* снижается, причем значительно у долгоживущих мРНК.

Комплекс *LRPPRC/SLIRP* связывается с мт-мРНК и пре-мРНК, состоящими из мРНК и тННК, но не связывается с пре-рННК, состоящими из тННК и рННК. тННК спонтанно приобретают вторичную и третичную структуру. *12S* и *16SpHНК* также имеют сложную вторичную и третичную структуру, необходимую для образования малой и большой субъединиц рибосом.

Комплекс *LRPPRC/SLIRP* связывается непосредственно с кодирующей частью мРНК:

- не с *poly (A)* последовательностью т.к. мРНК *ND6* не имеет *poly (A)* хвоста, но связывается с комплексом.
- не с *5'-UTR* или с *3'-UTR* (в мт мРНК они короткие или отсутствуют), т.к. мРНК *ND2* не имеет ни *5'-UTR*, ни *3'-UTR*, но связывается с комплексом.

Около 6 молекул *LRPPRC* связывается с каждой мРНК в кодирующей области, причем это связывание неспецифично.

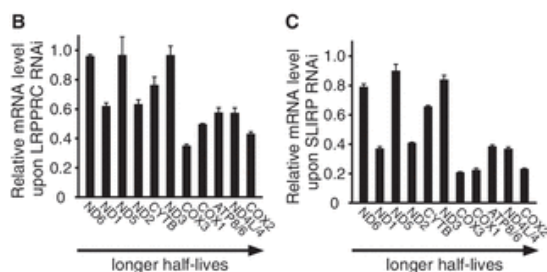


Рис. 7.14. Зависимость уровня мРНК при нокадауне от времени жизни

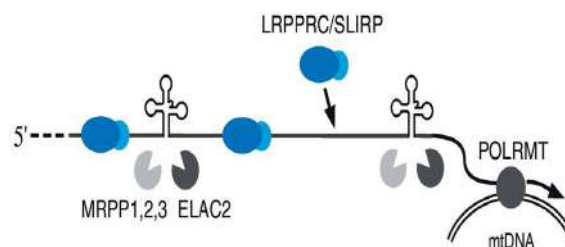


Рис. 7.15. Связь комплекса *LRPPRC/SLIRP* с мт-мРНК и пре-мРНК

*SLIRP*, видимо, стабилизирует *LRPPRC*. *In vitro* *LRPPRC* стимулирует полиаденилирование *mtPAP*ом мРНК. *SLIRP* стимулирует полиаденилирование *mtPAP*ом в значительно меньшей степени.

Комплекс *LRPPRC/SLIRP* стимулирует полиаденилирование мРНК *mtPAP*ом и защищает мРНК от деградации. Он стабилизирует комплекс мРНК за счет того, что он стимулирует *mtPAP*, который более активно полиаденилирует мРНК.

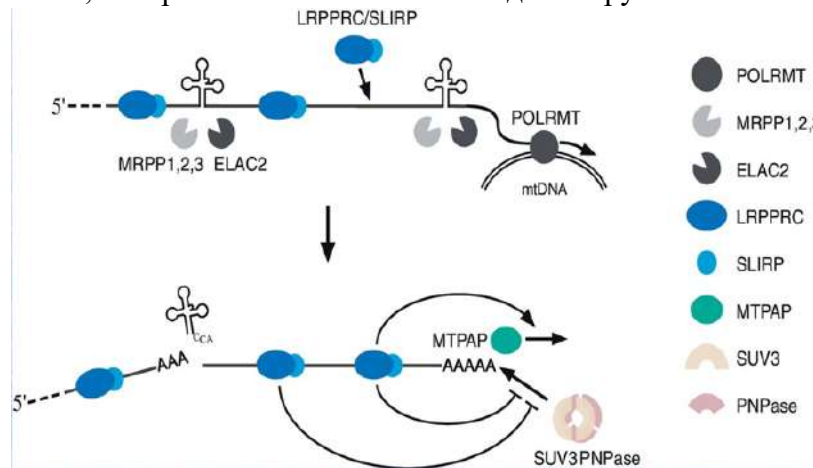


Рис. 7.16. Функция стабилизации *LRPPRC/SLIRP* комплекса

### Связывание комплекса *LRPPRC/SLIRP* с митохондриальным транскриптомом.

Исследователи попытались определить цепь связывания комплекса на РНК. Для этого было использовано два метода: *High-throughput RNase footprinting* и *PAR-CLIP*.

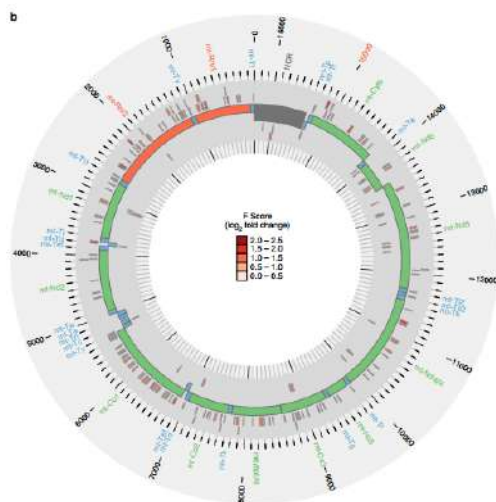


Рис. 7.17. High-throughput RNase footprinting

*High-throughput RNase footprinting.*

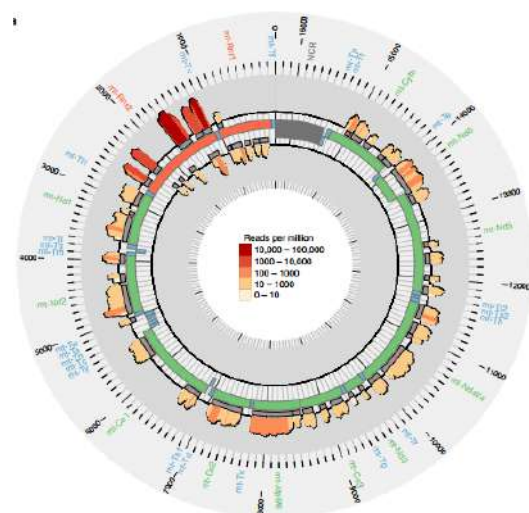


Рис. 7.18. PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation)

Метод High-throughput RNase footprinting заключается в том, что митохондрии обрабатываются смесью разных РНКаз. В этом случае получается деградированная РНК и только те места, которые защищены белковыми комплексами будут защищены от деградации. Многие РНК защищены от деградации вторичной структурой или взаимодействием с другими белками.

*PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation).*

В данном методе проводились фотоактивируемые сшивки рибонуклеазидов с белками, которые с ними взаимодействуют. Далее с помощью иммунопреципитации, с помощью тел *LRPPRC* выделяли комплексы. Поскольку к белку было пришито место РНК, с которым оно взаимодействует, то можно его проанализировать.

Полученные двумя методами данные были проанализированы: 98 мест, определенных путем *footprinting* и 16 мест, определенных с помощью *PAR-CLIP*. Таким образом:

- Комплекс *LRPPRC/SLIRP* связывается с РНК по всему транскриптому, преимущественно с мРНК и рРНК и почти не связывается с тРНК.
- Взаимодействие *LRPPRC/SLIRP* с РНК дестабилизирует ее вторичную структуру (нокаут *LRPPRC* приводит к увеличению количества транскриптов с выраженной вторичной структурой при обработке РНКзами, в отличие от нокаута *SLIRP*), облегчая взаимодействие с ней ферментов.
- В отсутствие *LRPPRC/SLIRP* снижается полиаденилирование митохондриальных мРНК: уменьшаются длины *poly (A)* хвостов.

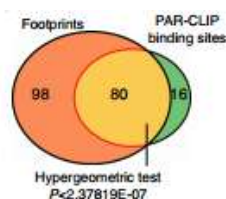


Рис. 7.19. Статистика использования методов

#### Итог.

1. Существует постранскрипционная регуляция стабильности мРНК в митохондриях
2. Уровень мт-мРНК в клетке зависит от времени её жизни.
3. Комплекс белков *LRPPRC* и *SLIRP* стабилизирует мт-мРНК, причем долгоживущие в большей степени
4. Взаимодействие *LRPPRC* с РНК ослабляет ее вторичную структуру, увеличивает стабильность мРНК, предположительно стимулируя полиаденилирование мРНК *mtPAPом* и защищая мРНК от деградации

### 7.3. Процессинг мт-рРНК.

Уровень экспрессии рРНК в 10-30 раз выше, чем уровень экспрессии наиболее распространенных мРНК (*COX1* или *COX2*), что связано с большей скоростью транскрипции с промотора *HSP1*, чем *HSP2*.

В свою очередь, 16S рРНК в митохондриях в 2 раза больше, чем 12S рРНК.

### Основные модификации рРНК в митохондриях.

В мт-рРНК значительно меньше модификаций, чем в цитоплазматических или бактериальных. *SnRNA* не участвуют в модификациях мт-рРНК, так же, как и у бактерий

Table 2 Ribosomal RNA modifications in bacteria and mitochondria of yeast and mammals

N/A, not applicable.

E. coli	Yeast mitochondria				Mammalian mitochondria				Gene	
	Position	Modification	Gene	Position	Modification	Gene	Hamster position	Hamster modification		Human position
<b>(a) Large rRNA</b>										
2251	Gm	<i>RimB</i>	2270	Gm	<i>Pet56p</i>	1144	Gm	1145	To be confirmed	Not identified
2552	Um	<i>Rmj1</i>	2791	Um	<i>MRM2</i>	1370	Um	1369	To be confirmed	Not identified
2553	Not modified	N/A	2792	Not modified	N/A	1371	Gm	1370	To be confirmed	Not identified
2580	Psi	<i>RluC</i>	2819	Psi	<i>PUS5</i>	1398	Not detected	1397	Psi	Not identified
<b>(b) Small rRNA</b>										
788	Not modified	N/A	1243	Not modified	N/A	426	m <sup>5</sup> U	429	To be confirmed	Not identified
1402	m <sup>4</sup> Cm	<i>RsmH, RsmI</i>	1862	Not modified	N/A	847	m <sup>4</sup> C	846	To be confirmed	Not identified
1403	Not modified	N/A	1863	Not modified	N/A	848	m <sup>5</sup> C	847	To be confirmed	Not identified
1518	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	<i>KsgA</i>	2002	Not modified	N/A	939	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	936	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	TFB1M (TFB2M)
1519	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	<i>KsgA</i>	2003	Not modified	N/A	940	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	937	m <sup>6</sup> <sub>2</sub> A	TFB1M (TFB2M)

Рис. 7.20. Основные модификации рРНК в митохондриях

### Итог.

1. Процессинг мт-рРНК включает в себя разрезание полицистронного транскрипта за счет вырезания тРНК.
2. Уровень экспрессии рРНК в митохондриях в 10-30 раз выше, чем уровень экспрессии наиболее распространенных мт-мРНК.
3. В мт-рРНК значительно меньше модификаций, чем в цитоплазматических рРНК
4. *TFB1M* и *TFB2M* диметилируют A<sup>936</sup> и A в *12S rRNA*.
5. *PTCD3* и *ERAL1* необходимы для сборки и нормальной работы малой субъединицы мт-рибосом.
6. *MTERF4* связывается с 16S рРНК и необходим для её вставки в большую субъединицу рибосом.
7. *NSUN4* имеет две независимых функции:
  - метилирует C<sup>911</sup> в *12S rRNA*;
  - в комплексе с *MTERF4* участвует в ассоциации большой и малой субъединиц при сборке рибосом.

## Лекция 8. Митохондриальная трансляция. Импорт биомакромолекул в митохондрии

### 8.1. Митохондриальная трансляция

Митохондриальный геном человека является кольцевой двуцепочечной молекулой размером около 16 кБ (*kilobase*) и кодирует 13 белков. При кодировании белков происходит и трансляция.

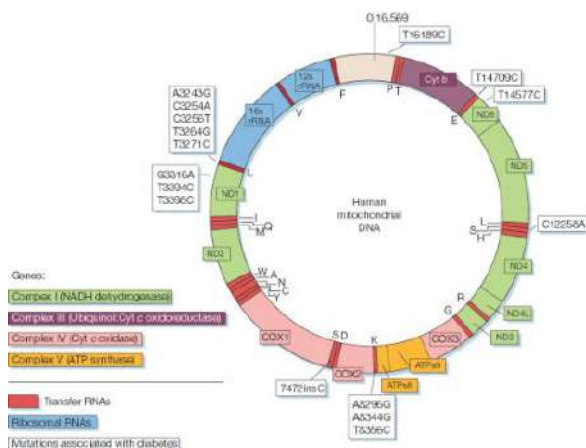


Рис. 8.1. Митохондриальный геном человека

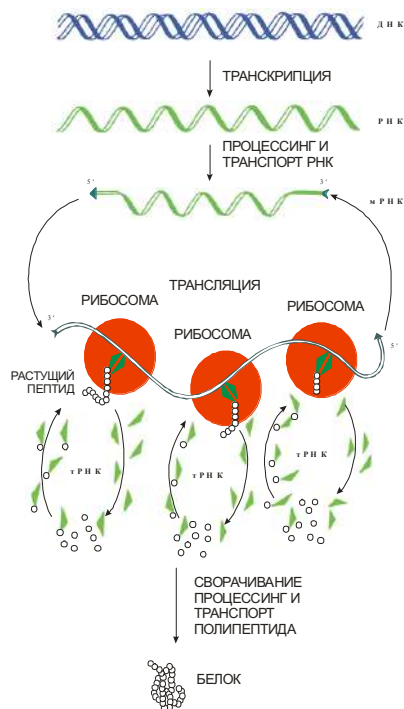


Рис. 8.2. Общая схема трансляции

Митохондриальная трансляция – процесс, который исследуется по нетипичной модели. Впервые экспериментальная митохондриальная трансляция была показана в 80-х годах XX века.

#### Структурные различия митохондриальных и бактериальных рибосом.

В таблице 8.1 показано сравнение простейших свойств бактериальных и митохондриальных рибосом. Основное отличие заключается в том, что у бактерий меньше белков в составе рибосомных субъединиц по сравнению с митохондриями. Соответственно, больше места занимает РНК. Это основной эволюционный тренд в митохондриях: редукция рибосомных ДНК по сравнению с бактериями и замещение этих редуцированных частей уникальными белками.

Таблица 8.1. Сравнение свойств бактериальных и митохондриальных рибосом

	Бактерии	Митохондрии млекопитающих ( <i>Bos taurus</i> )	Митохондрии протист ( <i>Leishmania tarentolae</i> )
--	----------	---	--



Молекулярная масса, МДа	2.3	2.7	2.2
Диаметр, Å	≈ 260	≈ 320	≈ 245
Молярное соотношение РНК:белок	≈ 2:1	≈ 1:2	≈ 1:3
рРНК малой субъединицы и ее длина	16S (1542 п.о.)	12S (950 п.о.)	9S (610 п.о.)
Количество белков в составе малой субъединицы	21	≈ 29	≈ 56
рРНК большой субъединицы и их длины	23S рРНК (2904 п.о.) 5SpРНК (120 п.о.)	16SpРНК (1560 п.о.) 5SpРНК (?)	12S рРНК (1173 п.о.)
Количество белков в составе большой субъединицы	34	≈ 50	≈ 77

На рисунках 8.3, 8.4 показаны структурные различия митохондриальных и бактериальных рибосом. Черным выделены участки бактериальной рРНК, отсутствующие у митохондриальных рРНК. Все отсутствующие участки рРНК в митохондриальных рибосомах заменены белками.

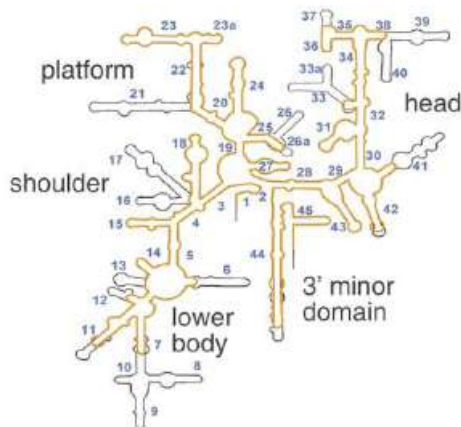


Рис. 8.3. рРНК малой субъединицы

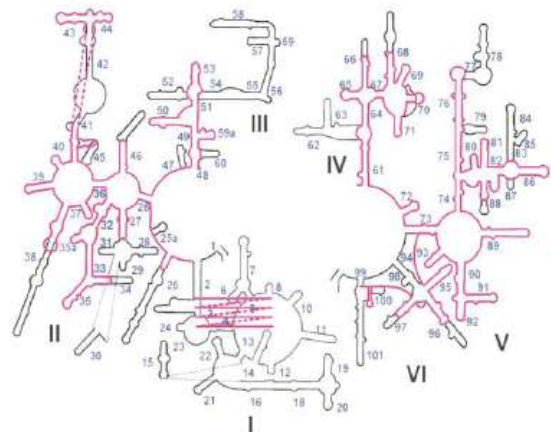


Рис. 8.4. рРНК большой субъединицы

На рисунке 8.5 показаны модели, нарисованные по результатам криоэлектронной микроскопии: положение каждого атома достоверно.

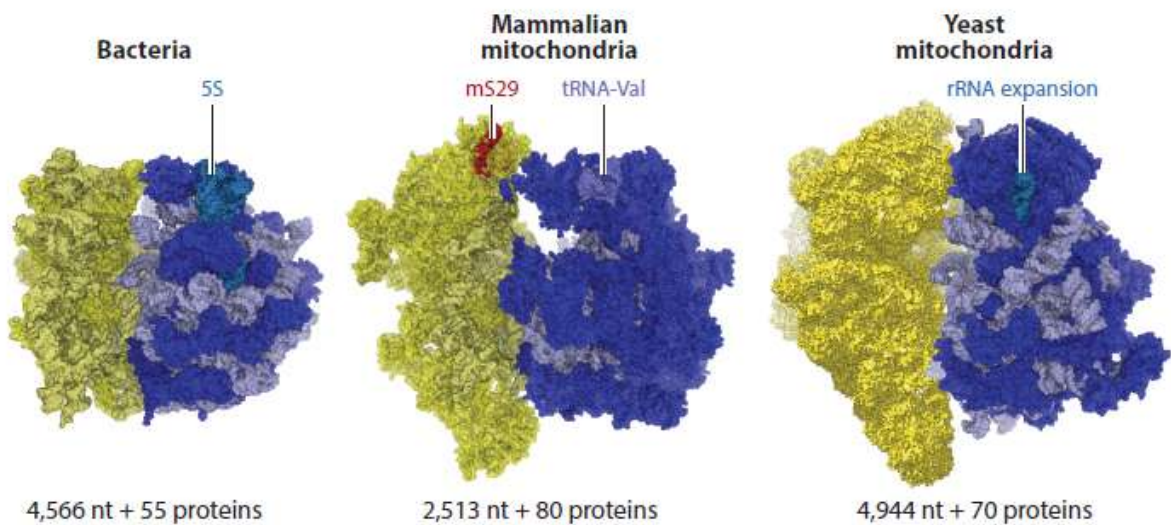


Рис. 8.5. Структурные различия митохондриальных и бактериальных рибосом

1. Миторибосомы больше по размерам, но гораздо рыхлее.
2. В миторибосоме нет 5S рРНК! (Только в растительных есть). У млекопитающих вместо нее в состав рибосомы входит тРНК, а у дрожжей имеется специальный домен рРНК большой субъединицы.
3. В миторибосоме млекопитающих имеется ГТФаза – белок mS29. В других рибосомах белков с такой активностью не обнаружено.

#### Структура митохондриальной рибосомы человека.

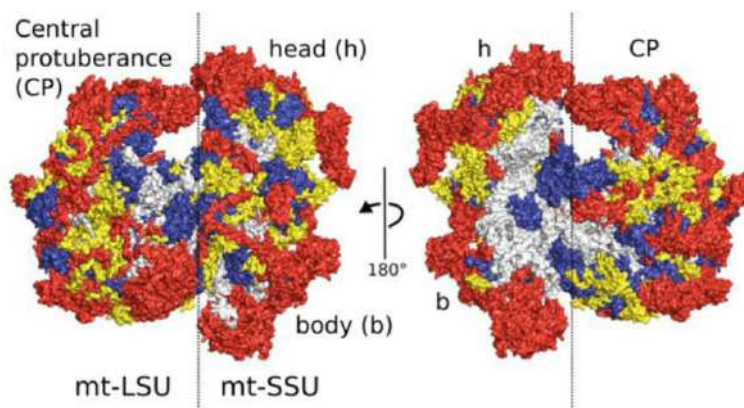


Рис. 8.6. Структура митохондриальной рибосомы человека

- *синим* выделены белки, консервативные в бактериях;
- *желтым* – гомологичные бактериальным;
- *красным* – специфические для митохондрий.

Практически все белки, которые кодируются митохондриальным геномом и синтезируются митохондриальными рибосомами – это интегральные белки внутренней мембраны, чаще всего коровые компоненты дыхательной цепи. Такие белки

гидрофобны. Таким образом, митохондриальные рибосомы закреплены на внутренней мембране и растущий полипептид выходит прямо в мембрану.

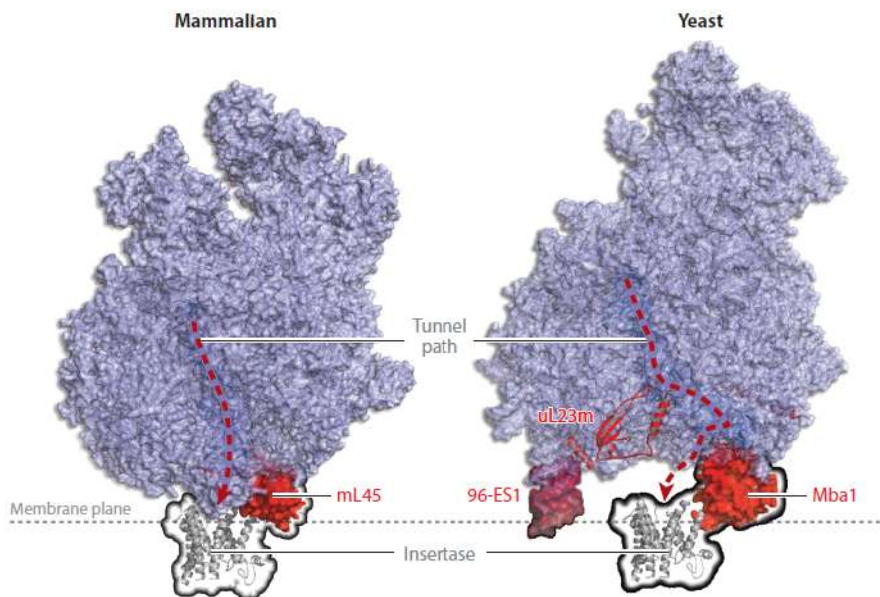


Рис. 8.7. Особенности работы митохондриальных рибосом

Exit channel в миторибосомах выстлан гидрофобными аминокислотами, видимо для того, чтобы облегчить проход гидрофобных растущих полипептидов.

Стадии процесса трансляции:

1. Инициация (рибосома связывается с сигнальными участками мРНК и «узнает» стартовый кодон).

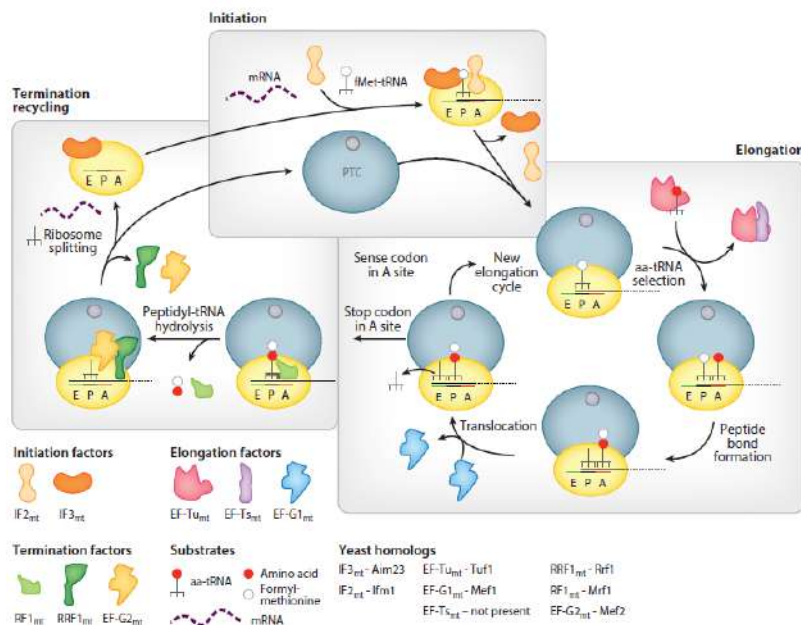


Рис. 8.8. Общая схема митохондриальной трансляции

2. Элонгация (рибосома последовательно считывает кодоны мРНК, присоединяя соответствующие новые аминокислоты к растущей полипептидной цепи).
3. Терминация (рибосома, дойдя до стоп-кодона, «узнает» его, в результате чего синтезированный белок высвобождается из рибосомы).

На самом деле существует еще 4 стадии трансляции, которая на данный момент считается классической – это так называемый рециклинг – процесс, который позволяет развалившейся после терминации рибосоме собраться для следующего уровня инициации.

*Основные отличия митохондриальной инициации от бактериальной:*

1. В митохондриях отсутствует *IF1*; его роль, по-видимому, выполняет дополнительный домен белка *IF2*.
2. Митохондриальные мРНК лишены длинных 5'-некодирующих областей; более того, добавление дополнительных нуклеотидов в 5'-НКО резко снижает эффективность образования инициаторных комплексов.

*NB: мито-мРНК дрожжей, напротив, содержат длинные 5'-НКО.*

3. В митохондриях млекопитающих имеется всего одна метиониновая тРНК, способная играть роль как инициаторной, так и элонгаторной тРНК
4. Фактор *IF3* в митохондриях имеется, однако чрезвычайно сильно отличается от бактериальных гомологов. К примеру, бактериальный *IF3* действует пассивно, то есть связывается с малой субъединицей и не дает ей ассоциировать с большой. Митохондриальный же *IF3* действует активно: связывается с целой миторибосомой и провоцирует ее диссоциацию.

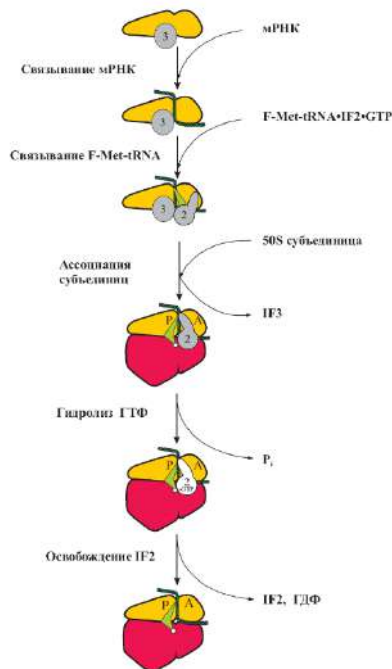


Рис. 8.9. Инициация трансляции у бактерий

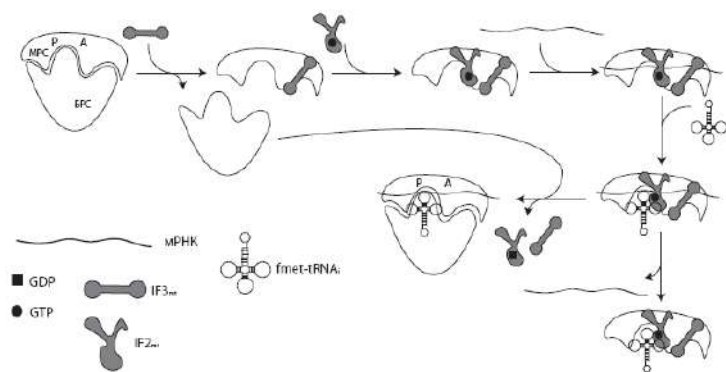


Рис. 8.10. Схема инициации трансляции в митохондриях млекопитающих

### Уникальная система трансляционных активаторов в митохондриях дрожжей.

Для каждой из 7 мито-мРНК дрожжей существуют специфические белки-активаторы, которые связываются только с данной конкретной мРНК (а иногда еще и с рибосомой, и с внутренней мембраной). Трансляция данной мРНК возможна только при наличии такого связывания.

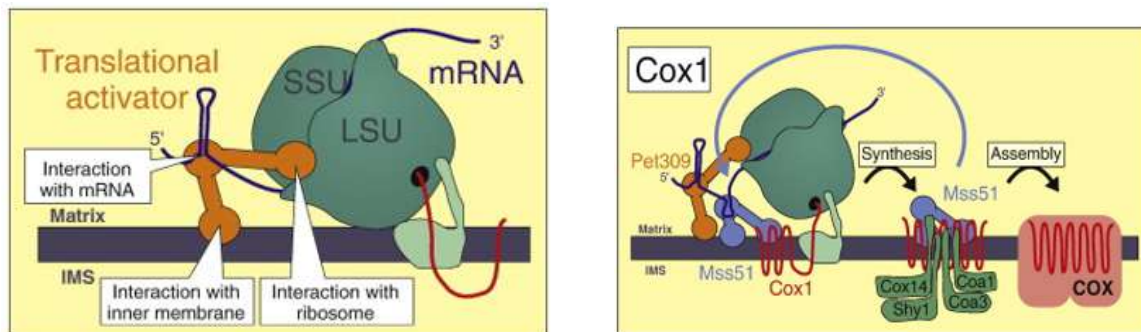


Рис. 8.11. Уникальная система трансляционных активаторов в митохондриях дрожжей

*Трансляционный активатор* – это белок, присутствующий в митохондриях в маленьком количестве. Каждый трансляционный активатор умеет специфически связываться с *UTR* одной конкретной митохондриальной мРНК. Это связывание критически необходимо для нормальной трансляции мРНК: если активатор не связался – мРНК не транслируется.

Для многих активаторов характерно участие в так называемых петлях обратной связи (на примере мРНК *COX I*). Один и тот же активатор нужен и для трансляции, и для встраивания новосинтезированного белка в комплекс дыхательной цепи. Активаторов в митохондриях очень мало, потому пока один белок не встроился в комплекс, синтез следующей молекулы того же белка невозможен.

### Основные отличия митохондриальной элонгации от бактериальной.

На самом деле отличий мало, элонгация митотрансляции максимально близка к таковой у бактерий:

1. Митохондриальный EF-Ts структурно организован принципиально иначе, чем бактериальный ортолог. *NB: в митохондриях S cerevisiae такого белка вообще нет, ну или его пока не нашли*
2. По последним данным, тот белок, который раньше принимали за *EF-Ts*, таковым вовсе не является! (Но это не точно, эксперименты несколько противоречивы).
3. У бактерий один и тот же *EF-G* работает и в элонгации, и в терминации. В митохондриях для этого имеются два разных белка.

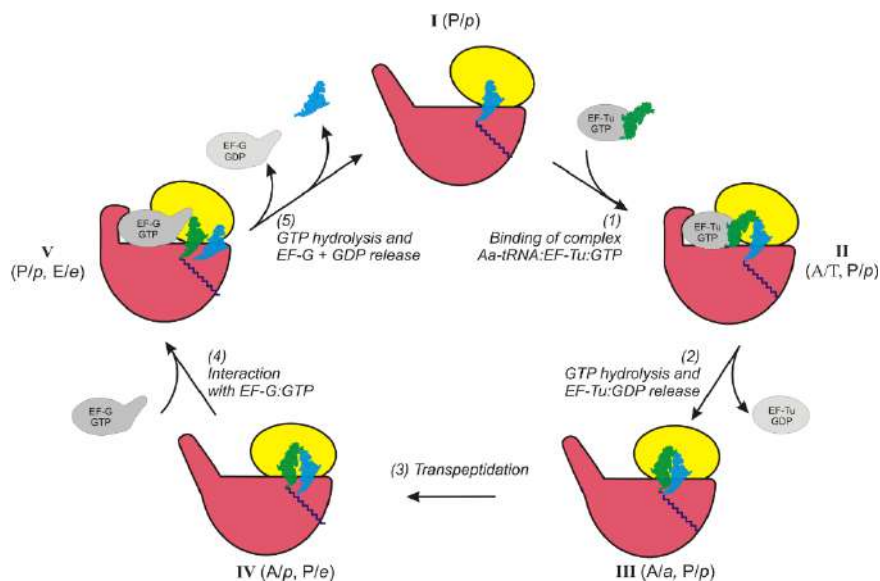


Рис. 8.12. Элонгация трансляции у бактерий

### Основные отличия митохондриальной терминации от бактериальной

1. У бактерий один и тот же *EF-G* работает и в элонгации, и в терминации. В митохондриях для этого имеются два разных белка.
2. Нестандартный набор стоп-кодонов. У млекопитающих 11 из 13 белок-кодирующих мРНК заканчиваются на стандартные *UAA* и *UAG*, а две оставшихся – на *AGA* и *AGG*, соответственно.

Недавно было показано, что на самом деле в одном случае имеет место сдвиг рамки считывания на один нуклеотид назад, в результате чего стоп-кодон становится стандартным. Однако этот механизм не является универсальным: мРНК, оканчивающиеся нестандартными стоп-кодонами, есть у многих эукариот, и далеко не во всех этих случаях frameshift будет приводить к установлению в ПТЦ стандартного стоп-кодона.

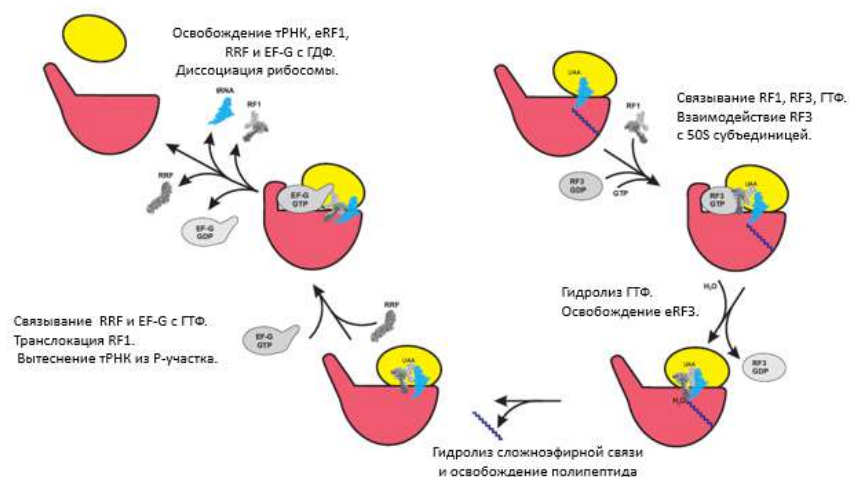


Рис. 8.13. Терминация трансляции у бактерий

## 8.2. Импорт биологических макромолекул в митохондрии

Импорт биологических макромолекул в митохондрии включает:

1. Импорт белков в митохондрии.
2. Импорт РНК в митохондрии.

### Импорт белков в митохондрии.

Митохондрии – сложноорганизованные органеллы, осуществляющие множество самых разнообразных функций.

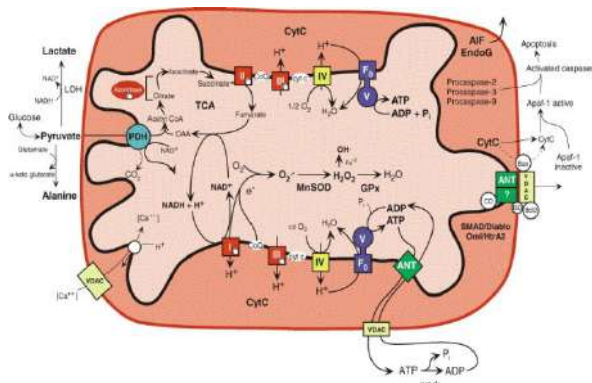


Рис. 8.14. Митохондрии

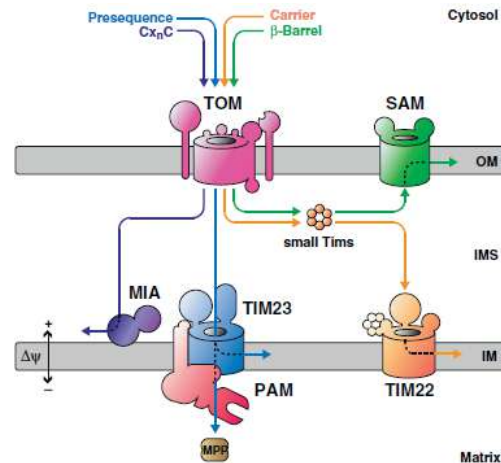


Рис. 8.15. Общая схема импорта белков в митохондрии

В митохондриальном геноме закодировано всего около 10 белков. Всего в митохондриях более 1000 различных белков. Более 95% митохондриальных белков импортируются в органеллы из цитозоля.

Импорт белков в митохондрии – редкий случай молекулярно-биологического процесса в митохондриях, который протекает практически по универсальным механизмам в любой эукариотической клетке (за исключением простейших).

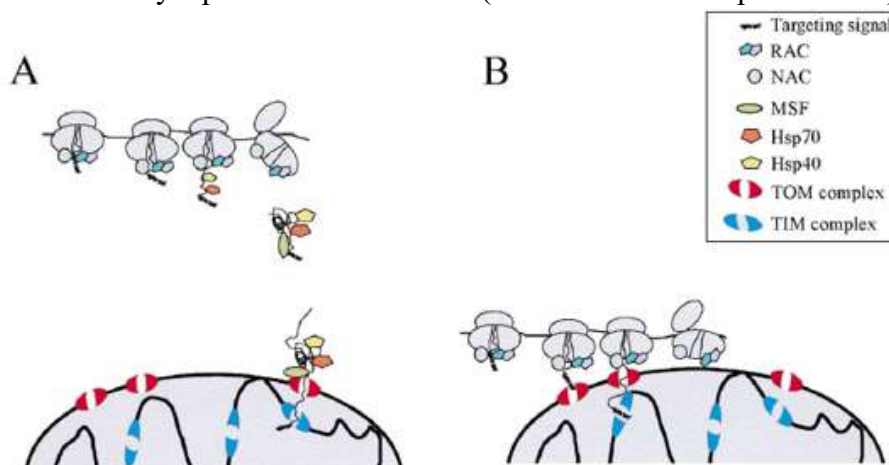


Рис. 8.16. Импорт посттрансляционный (A), котрансляционный (B)

Предшественники митохондриальных белков синтезируются на цитозольных рибосомах. Предшественниками принято называть митохондриальные белки,

находящиеся в цитозолях, потому что у них есть сигнальные последовательности и большинство этих последовательностей отщепляемые.

На рисунке 8.16 показано два принципиально разных механизма того, что происходит с предшественниками в цитозоле. Оба эти механизма связаны с синтезом. Импорт может осуществляться как посттрансляционно (A), так и котрансляционно (B). В этом случае происходят разные события. В случае посттрансляционного импорта сначала синтезируется белок, сворачивается в структуру, далее при помощи большого количества вспомогательных белков молекула транспортируется к митохондриальной поверхности, где обратно разворачивается. Каналы белкового импорта в митохондриальных мембранах не широкие. Котрансляционно импорт происходит проще, потому что там необходимы рибосомы, которые ассоциируются с митохондриальной поверхностью. У любого эукариотического организма такие рибосомы есть. Сигнальные последовательности определяют, в какой митохондриальный субкомпармент должен попасть импортируемый белок.

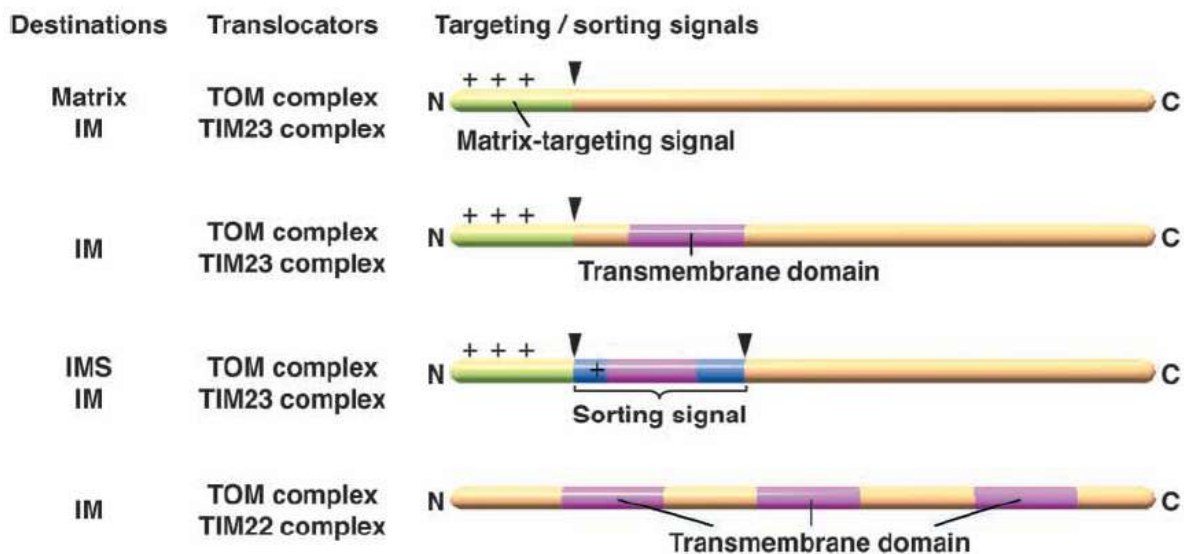


Рис. 8.17. Сигнальные последовательности предшественников

Сигнальные последовательности определяют, в какой митохондриальный субкомпармент должен попасть импортируемый белок.

*Первый тип* – белки, попадающие в матрикс.

*Второй тип* сигнальной последовательности – белки, погруженные в мембрану, но не целиком, а одним доменом.

*Третий тип* сигнальной последовательности – это белки, которые предназначены для работы в межмембранном пространстве. У них две отщепляемых сигнальной последовательности.

*Четвертый тип* – внутренние сигнальные последовательности интегральных мембранных белков (все погружены в мембрану). У них есть много трансмембранных доменов и между ними клетки. Совокупность этих трансмембранных доменов и есть сигнальная последовательность.

**Рецепторы внешней мембраны: Tom20/Tom22 и Tom70.**



*Транслоказа* – большой белковый комплекс, который располагается во внешней митохондриальной мембране и через который импортируются 99% всех белковых предшественников. Все белковые комплексы, участвующие в импорте белков называются транслоказа.

Транслоказа состоит из трех типов разных белков: рецепторы, канал и вспомогательные белки.

Рецепторы у *Tom*-комплекса:

*Tom20* и *Tom22* распознают N-концевые сигнальные пептиды, связываясь с их гидрофобной поверхностью.

*Tom70* распознает внутренние сигнальные последовательности.

*Tom22* – основная мишень регуляции белкового импорта, происходящей за счет его фосфорилирования / де фосфорилирования.

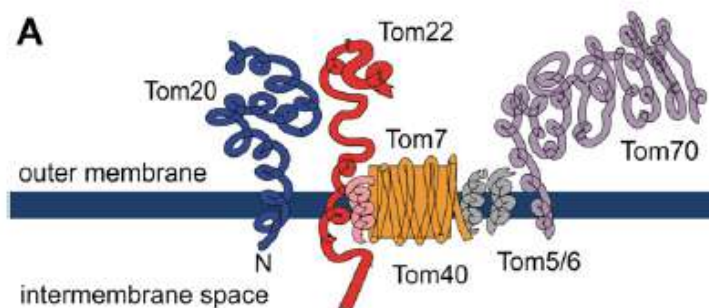


Рис. 8.18. Рецепторы внешней мембраны

Канал *Tom*-комплекса – это белок *Tom-40*, который представляет себя интегральный мембранный белок. Это похоже на белок *VDACs*. До некоторой степени этот белок может заменять *Tom-40*.

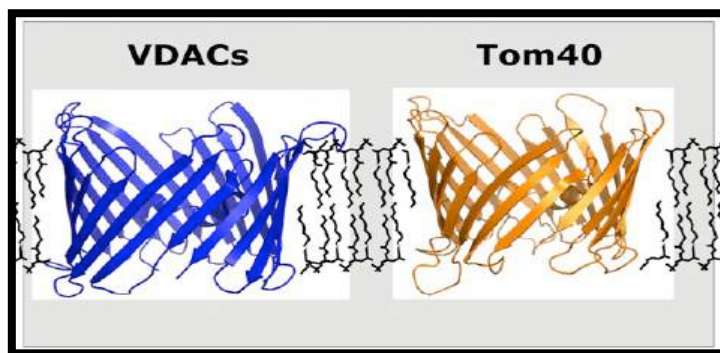


Рис. 8.19. Белок *Tom-40*

Вспомогательные белки: *Tom-5*, *Tom-40-6*, *Tom-7*. *Tom5* участвует в переносе предшественников с *Tom20/Tom22* на *Tom40*. *Tom6* и *Tom7* участвуют в сборке *TOM*-комплекса и регуляции его активности: *Tom6* стабилизирует структуру комплекса, а *Tom7* дестабилизирует.

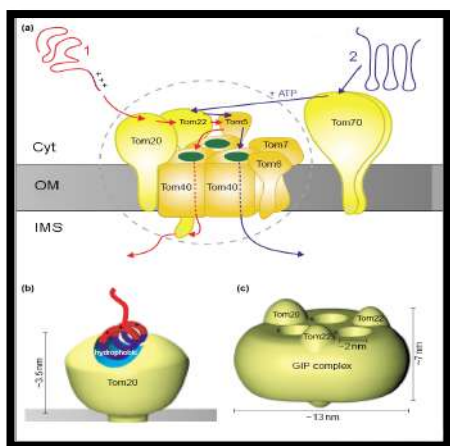


Рис. 8.20. Малые TOM-белки: Tom5, Tom6, Tom7

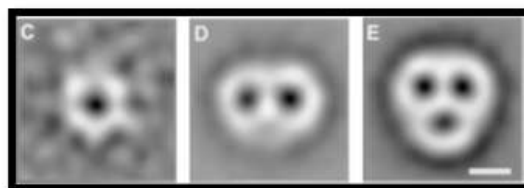


Рис. 8.21. Структура TOM-комплекса

Структура *TOM*-комплекса: C – одиночный *Tom40*; D – комплекс без *Tom20* и *Tom70*; E – *TOM*-комплекс.

Типовой путь для белков называется *SAM* – комплекс, который осуществляет встраивание интегральных мембранных белков во внешнюю мембрану. Основная его функция – это встраивание таких белков, как *Tom40*. После этого в межмембранном пространстве белок подхватывается т.н. малыми *Tim* белками. Белок  $\beta$ -barrel загружается в виде «синусоиды» в *SAM*-комплекс и происходит латеральное открытие канала.

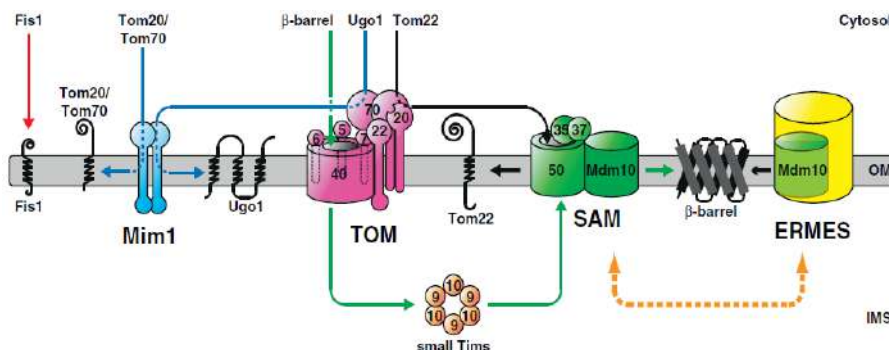


Рис. 8.22. Пути встраивания белков во внешнюю митохондриальную мембрану

## Лекция 9. Импорт белков

### 9.1. Импорт белков

#### Транслоказа внутренней мембраны *TIM23*.

*TIM23*-комплекс осуществляет (1) транспорт белков в митохондриальный матрикс и (2) встраивание некоторых белков во внутреннюю мембрану. Транслоказа называется *TIM23*, потому что коровый белок называется аналогично.

Транслоказа *TIM23* (число 23 обозначает молекулярную массу) является основной транслоказой, потому что через нее проходит больше предшественников. Кроме того, *TIM23*-комплекс отвечает за встраивание предшественников во внутреннюю мембрану, встраивание белков происходит одним доменом.

Коровый комплекс *TIM23* (*TIM23<sub>CORE</sub>*):

1. *Tim17* и *Tim23* формируют канал
2. *Tim50* поддерживает канал в закрытом состоянии в отсутствие предшественников
3. *Tim21* (неконститутивный компонент *TIM23<sub>CORE</sub>*) связывается с *Tom22* и облегчает перенос предшественников с *TOM*- на *TIM23*-комплекс.

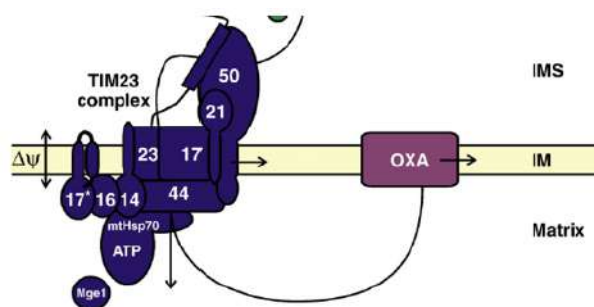


Рис. 9.1. Транслоказа внутренней мембраны *TIM23*

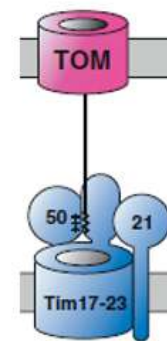


Рис. 9.2. Коровый комплекс *TIM23* (*TIM23<sub>CORE</sub>*)

Стадии транслокации предшественников через *TIM23*-комплекс в матрикс:

1. *Pam17*, связываясь с *TIM23*-комплексом со стороны матрикса, стимулирует высвобождение *Tim21* и проникновение сигнальной последовательности предшественника в матрикс.
2. К комплексу со стороны матрикса привлекаются белки *Pam16*, *Pam18* и *Tim44*. После этого *Pam17* спонтанно отсоединяется от комплекса.
3. Предшественник частично проникает в матрикс, где к его сигнальной последовательности присоединяется шаперон *mtHsp70*, который, вместе с *Tim44*, обеспечивает проникновение в матрикс остальной части белка.

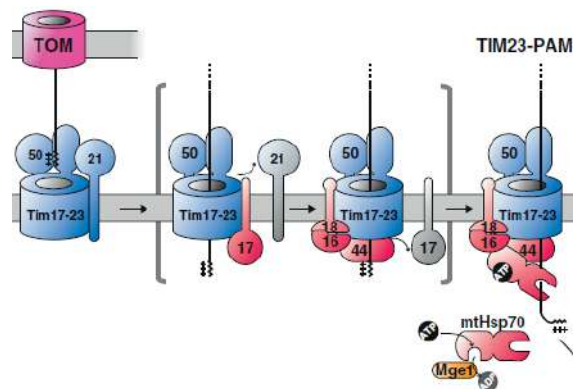


Рис. 9.3. Стадии транслокации предшественников через TIM23-комплекс в матрикс

«Мотор» импорта.

Модель *Power-stroke*: некоторые белки встраиваются во внутреннюю мембрану непосредственно из TIM23-комплекса. Этот процесс не требует участия АТФ и обеспечивается только мембранным потенциалом.

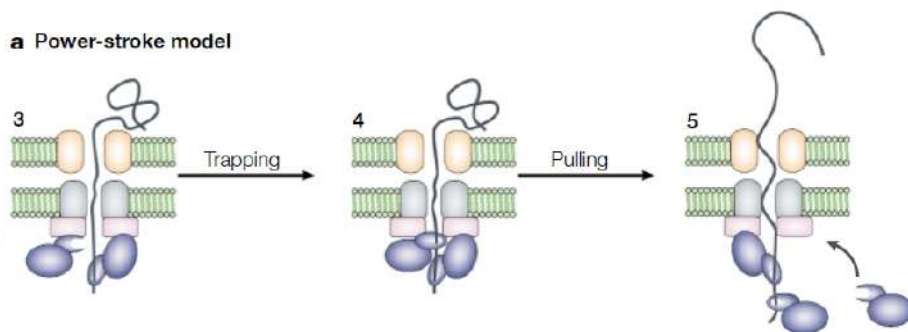


Рис. 9.4. Модель *Power-stroke*

Модель *Brownian-ratchet*: Импортируемый белок совершает «статистические» движения в канале. Как только белок немного продвинулся в сторону матрикса, с ним связывается молекула *mtHsp70*, и это запрещает движение белка в обратную сторону. Процесс повторяется много раз, в результате чего белок оказывается целиком в матриксе.

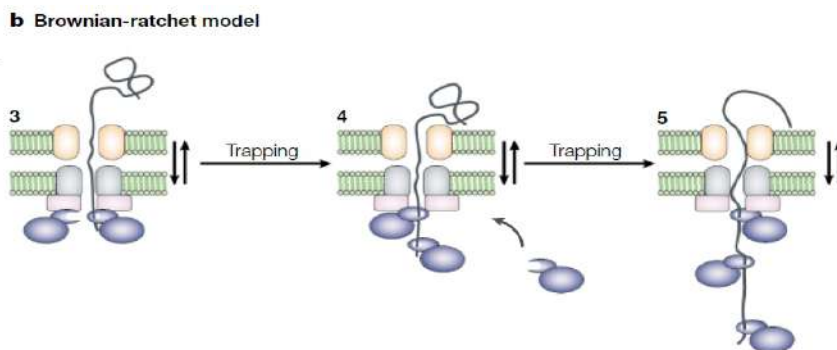


Рис. 9.5. Модель *Brownian-ratchet*

В настоящее время неизвестно, какая именно из двух моделей реализуется при импорте белков в митохондрии.

Некоторые белки встраиваются во внутреннюю мембрану непосредственно из *TIM23*-комплекса. Этот процесс не требует участия АТФ и обеспечивается только мембранным потенциалом.

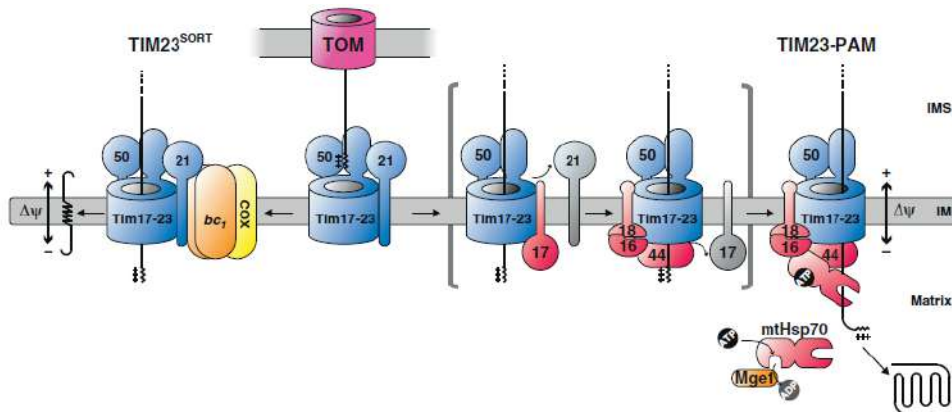


Рис. 9.6. Общая схема работы *TIM23*-комплекса

Другим белком внутренней мембраны является *TIM22*-комплекс, который встраивает во внутреннюю мембрану интегральные белки (например, АТФ/АДФ-переносчик). Особенности:

1. *Tim22* – канальный белок.
2. *Tim54* привлекает к комплексу малые *Tim*-белки.
3. *Tim18* и *Sdh3* участвуют в сборке комплекса и регулируют его стабильность.

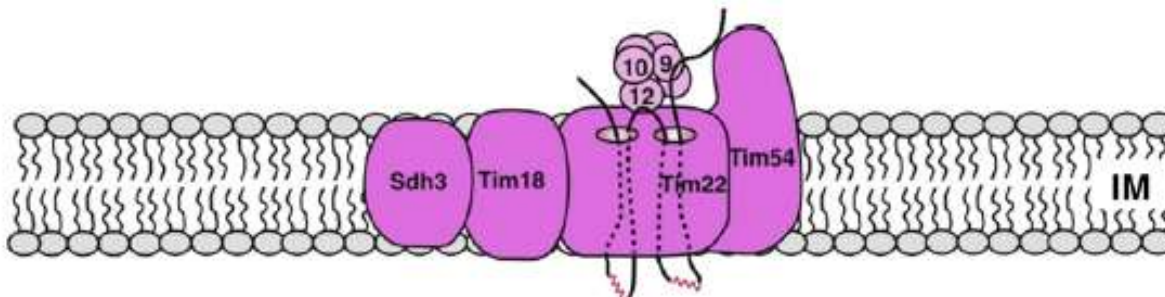


Рис. 9.7. Транслоказа внутренней мембраны *TIM22*

Схема встраивания интегральных белков во внутреннюю мембрану:

1. Белок в цитозоле связывается с рецептором *Tom70*
2. Белок транспортируется через внешнюю мембрану
3. В межмембранном пространстве с белком связываются малые *Tim*-белки: *Tim9* и *Tim10*
4. Эти белки переносят белок к *TIM22*-комплексу, он встраивается в канал, после чего происходит его латеральное открывание, и белок встраивается в мембрану

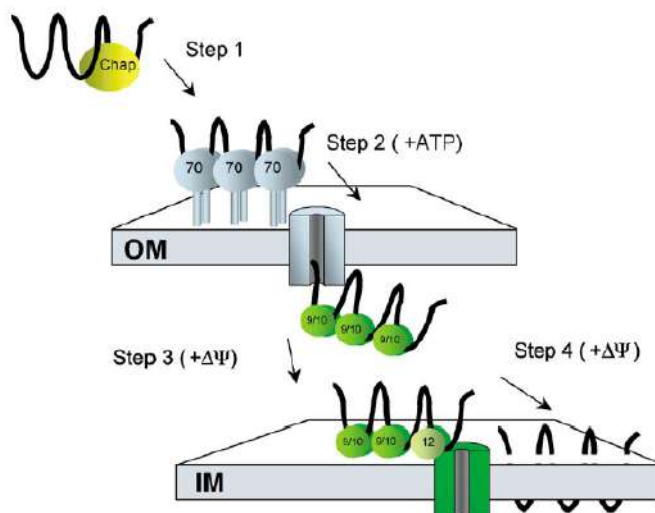


Рис. 9.8. Схема встраивания интегральных белков во внутреннюю мембрану  
 Отщепление сигнальных последовательностей в матриксе: в настоящее время более или менее подробно описан только механизм отщепления N-концевых сигнальных последовательностей посредством MPP.

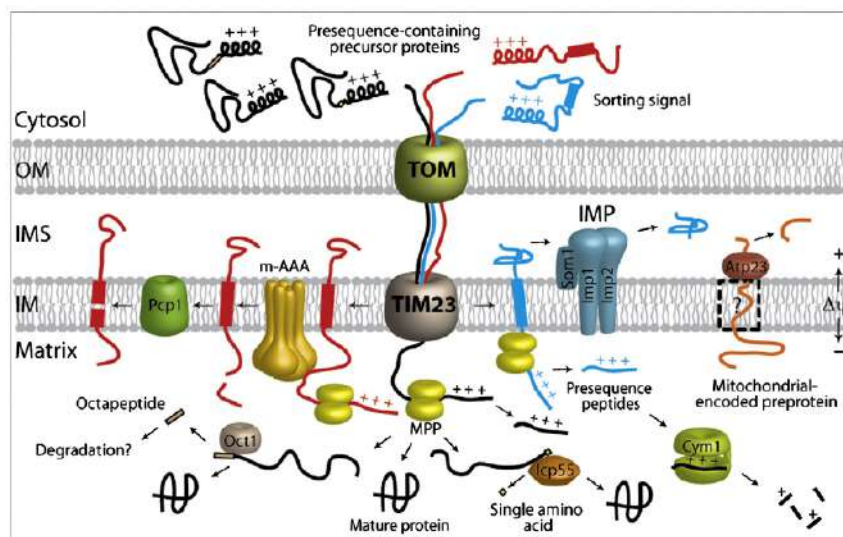


Рис. 9.9. Общая схема отщепления сигнальных последовательностей

## 9.2. Импорт РНК в митохондрии

Импорт ДНК в митохондрии тоже существует и описан, но этот процесс является экспериментальным «артефактом». В то же время РНК находятся в цитозоле и у них есть теоретическая возможность быть импортированным. Импорт РНК в митохондрии – видоспецифичный процесс. В митохондрии могут импортироваться тРНК, 5S рРНК, а также РНК-компоненты РНКаз (у млекопитающих)

Class <sup>1</sup>	Species/taxon	Eukaryotic supergroup <sup>b</sup>	Amino acids specified by mitochondrially encoded tRNA genes <sup>c</sup>	Amino acids specified by imported tRNAs <sup>d</sup>	Redundant tRNA import <sup>e,f</sup>
I	<i>Homo sapiens</i>	Opisthokonta (Metazoa)	20	0	tRNA <sup>Gln</sup>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Opisthokonta (Fungi)	20	0	tRNA <sup>Gln</sup> tRNA <sup>Leu</sup>
	<i>Allomyces macrogynus</i>	Opisthokonta (Fungi)	20	0	n.d.
	<i>Osareilla carmella</i>	Opisthokonta (Porifera)	20	0	n.d.
II	<i>Didelphis virginiana</i>	Opisthokonta (Metazoa)	19 (1 tRNA <sup>Leu</sup> pseudogene)	1 (tRNA <sup>Leu</sup> <sub>CUU</sub> )	n.d.
	<i>Reclinomonas americana</i>	Excavata	19	1 (tRNA <sup>Thr</sup> )	n.d.
	<i>Phytophthora infestans</i>	Chromalveolata	19	1 (tRNA <sup>Thr</sup> )	n.d.
	<i>Chondrus crispus</i>	Archaeplastida	19	1 (tRNA <sup>Thr</sup> )	n.d.
III	<i>Plakortis angulospiculatus</i>	Opisthokonta (Porifera)	6	14	n.d.
	<i>Hydrozoa</i>	Opisthokonta (Fungi)	7	13	n.d.
	<i>Segetaria magna</i>	Opisthokonta (Metazoa)	6	14	n.d.
	<i>Teratymena heterophila</i>	Chromalveolata	7	13	–
	<i>Araulopsis thaliana</i>	Archaeplastida	14	6	–
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Archaeplastida	3	17	–
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Amoebozoa	14	6	n.d.
	IV	Cnidaria	Opisthokonta (Metazoa)	1 or 2 (tRNA <sup>Met</sup> or tRNA <sup>Met</sup> and tRNA <sup>Trp</sup> )	19 or 18
<i>Igarnella rosabitis</i>		Opisthokonta (Porifera)	2 (tRNA <sup>Met</sup> and tRNA <sup>Trp</sup> )	19 or 18	n.d.
Chaetognatha		Opisthokonta (Metazoa)	1 (tRNA <sup>Met</sup> )	19	n.d.
Trypanosomatidae (e.g., <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania</i> )		Excavata	0	20	–
Apicomplexa (e.g., <i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma</i> )		Chromalveolata	0	20	–
<i>Polyommella carolina</i>		Archaeplastida	1 (tRNA <sup>Met</sup> )	19	–

Рис. 9.10. Импорт РНК в митохондрии

### Импорт тРНК в митохондрии простейших.

Простейшие являются крайним случаем импорта:

1. Импортируются все элонгаторные тРНК;
2. Для доставки тРНК к поверхности митохондрий необходим *eEF1a*;
3. *VDAC* не принимают участия в импорте; мембранные белки, обеспечивающие импорт, неизвестны.

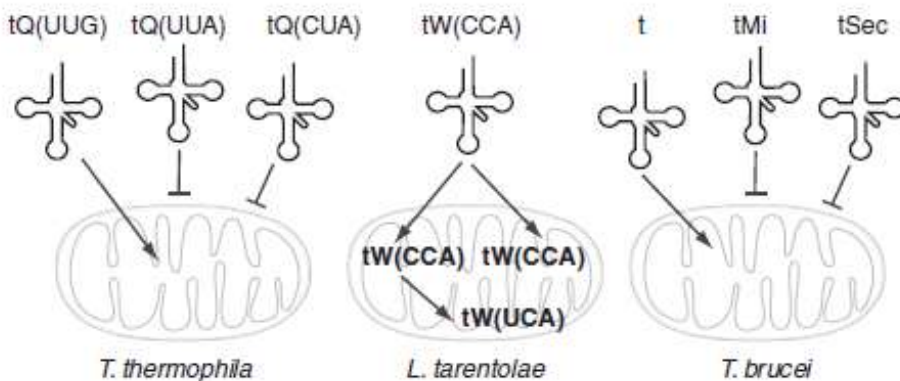


Рис. 9.11. Импорт тРНК в митохондрии простейших

### Импорт тРНК в митохондрии Chlamydomonas.

Митохондриальный геном *Chlamydomonas* кодирует всего две тРНК: импорт у этого организма – процесс массовый. На каждой панели есть две полоски, левая обозначена буквой t – total – гибридизуется цитозольная фракция, правая m – mitochondria – гибридизуется только митохондриальная фракция. По соотношению интенсивности этих сигналов можно судить об эффективности импорта: когда полоски

примерно одинаковой интенсивности, получается, что тРНК распределена почти поровну между цитозолем и митохондриями. Есть такие тРНК, которых почти нет в цитозоле, и они почти полностью импортируются в митохондрии.

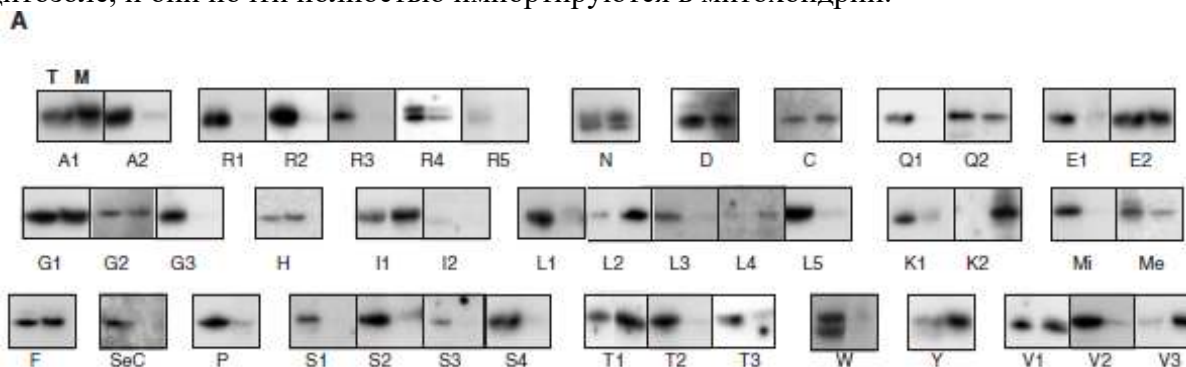


Рис. 9.12. Импорт тРНК в митохондрии *Chlamydomonas*

### Импорт тРНК в митохондрии растений.

Импорт изучался на нескольких модельных растениях и механизмы импорта получились разные.

1. Растворимые цитозольные белки не требуются.
2. Показаны три компонента внешней мембраны, принимающие участие в импорте: *Tom40*, *Tom20*, *VDAC*.
3. Белки внутренней мембраны, необходимые для импорта, неизвестны.

### Импорт тРНК в митохондрии дрожжей.

Дрожжи – это самый удобный объект для изучения импорта тРНК. *mPL1* закодирована в ядре (95% в цитозоле, 5% в митохондриях). *mPL2* в митохондрии не импортируется вообще. *mPL3* не импортируется в цитозоль.

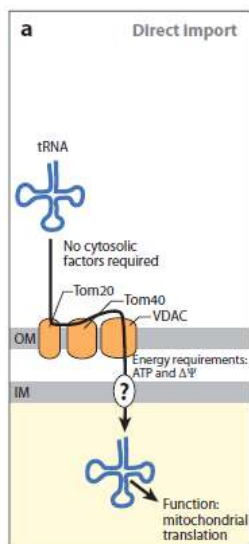


Рис. 9.13. Импорт тРНК в митохондрии растений

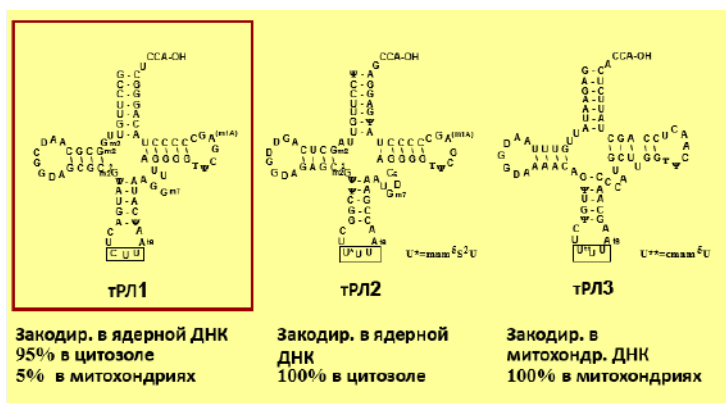


Рис. 9.14. Импорт тРНК в митохондрии дрожжей

Необходимые условия импорта тРНК:



1. Нуклеотидные детерминанты импорта.
2. Третичная структура тРНК.
3. АТФ и мембранный потенциал.
4. Белки-компоненты аппарата импорта белков в митохондрии и/или порины.
5. Растворимые цитозольные белки:
  - цитоплазматическая лизил-тРНК-синтетаза (*Krs1p*);
  - энолаза 2 (*Eno2p*);
  - предшественник митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (*preMsk1p*).

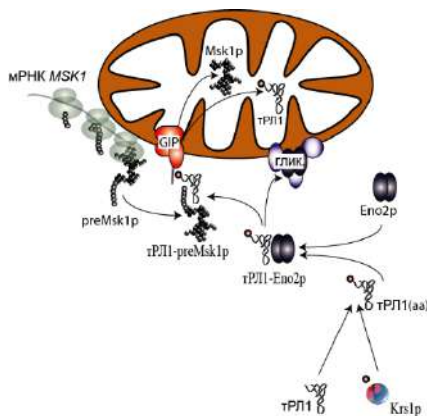


Рис. 9.15. Схема событий в цитозоле, предшествующих импорту тРНК в митохондрии дрожжей

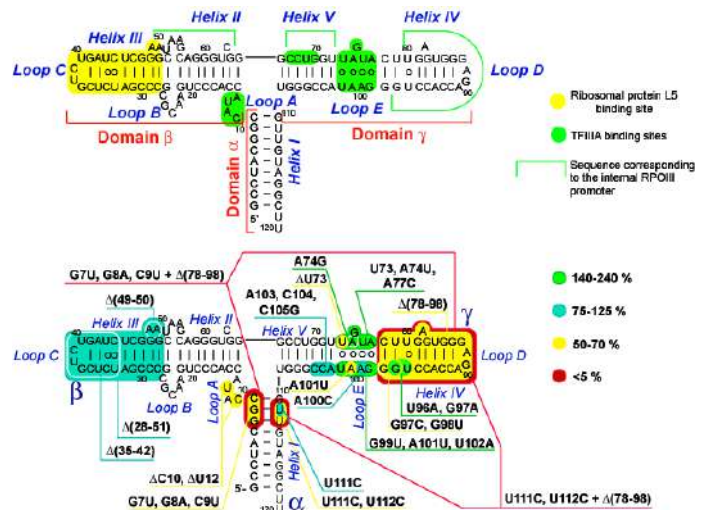


Рис. 9.16. Нуклеотидные детерминанты/антидетерминанты импорта 5S рРНК

### Импорт 5S рРНК в митохондрии млекопитающих.

В 2015 году появились структурные работы, в которых миторибосомах на месте 5S рРНК находится тРНК.

*Белковые факторы импорта 5S рРНК в митохондрии клеток человека:*

1. Белок *preMRP-L18* обеспечивает связывание 5S рРНК с роданезой.
2. Роданеза, связываясь с 5S рРНК, меняет свою конформацию и становится способной (видимо, в комплексе с 5S рРНК) проникать через внешнюю мембрану.

5S рРНК детектируется только в присутствии обеих субъединиц. Видимо, их диссоциация приводит к высвобождению 5S рРНК из митохондриальных рибосом.



ФАКУЛЬТЕТ  
БИОИНЖЕНЕРИИ И  
БИОИНФОРМАТИКИ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА

*teach-in*  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ