

УДК 577.2

МАТРИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ

Обзор

© 2015 И.О. Мазунин^{1*}, С.А. Левицкий², М.В. Патрушев^{1,2},
П.А. Каменский^{1,2*}

¹ Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта,
Химико-биологический институт, 236038 Калининград,
ул. Александра Невского, 14; факс: +7(4012)595-595,
электронная почта: IMazunin@kantiana.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-4309,
электронная почта: piotr.kamenski@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.15

После доработки 16.07.15

Митохондрии содержат свой собственный геном, который, несмотря на свои малые размеры, критически важен для функционирования органелл, поскольку кодирует несколько десятков РНК и белков. В митохондриях показаны все матричные процессы, характерные для бактериальной и ядерной ДНК: репликация, репарация, рекомбинация, транскрипция. Их механизмы в целом схожи с таковыми у бактерий, однако характеризуются рядом уникальных особенностей. В данном обзоре приводится общее описание митохондриальных матричных процессов; особое внимание уделяется особенностям механизмов данных процессов, специфичным для органелл.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, мтДНК, нуклеоид, транскрипция, репликация, репарация, рекомбинация.

СТРУКТУРА И ДИНАМИКА НУКЛЕОИДА

Митохондриальная ДНК (мтДНК) млекопитающих организована в ДНК-белковые комплексы, которые принято называть нуклеоидами, аналогично структурам, представляющим генетический аппарат прокариот [1, 2]. Организация митохондриального нуклеоида является предметом множества научных исследований, поскольку именно она определяет такие процессы, как митотическая сегрегация и наследование мтДНК. Однако, несмотря на то, что нуклеоид

выделяют как дискретную единицу сегрегации мтДНК, исчерпывающих сведений о точном составе белкового компонента и стабильности этой структуры к настоящему моменту не имеется [1].

Группе исследователей под руководством Даниэля Богенхагена удалось выделить белки, наиболее плотно ассоциированные с мтДНК в составе нуклеоида. На основании полученных данных была предложена модель уровневой организации митохондриального нуклеоида [3]. Согласно данной модели, в центральной части нуклеоида сосредоточены белки, отвечающие за процессы репликации и транскрипции мтДНК. К ним относятся митохондриальные транскрипционные факторы А (TFAM), В1 (TFB1M) и В2 (TFB2M), митохондриальный белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (mtSSB), митохондриальная РНК-полимераза (POLRMT), митохондриальная ДНК-полимераза (POLG), митохондриальный фактор терминации транскрипции (mTERF), митохондриальная ДНК-геликаза (Twinkle), митохондриальная топоизомераза I и еще минимум 20 белков. На периферии нуклеоида находятся белки, связанные функционально с процессингом РНК и

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК; TFAM – митохондриальный транскрипционный фактор А; TFB1M и TFB2M – митохондриальные транскрипционные факторы В1 и В2 соответственно; POLRMT – митохондриальная РНК-полимераза; POLG – митохондриальная ДНК-полимераза; mtSSB – митохондриальный белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК; mTERF – митохондриальный фактор терминации транскрипции; Twinkle – митохондриальная ДНК-геликаза; а.о. – аминокислотные остатки; п.н. – пары нуклеотидов; BER – репарация по типу эксцизии оснований (Base Excision Repair); MMR – репарация неспаренных нуклеотидов (Mismatch Repair).

* Адресат для корреспонденции.

трансляцией. Белок TFAM является основным белком, ассоциированным с мтДНК. Этот белок как упаковывает мтДНК, так и вызывает ее локальное плавление, регулируя транскрипцию и репликацию мтДНК. Такие белки, как POLG, mtSSB и Twinkle, являются минимально необходимыми для репликации митохондриального генома. Аналогичным образом белки POLRMT, TFB1M, TFB2M и mTERF минимально необходимы для процесса транскрипции мтДНК. Все эти белки центральной части нуклеоида физически взаимодействуют с мтДНК. В настоящее время общепризнанным является положение, согласно которому нуклеоиды посредством белок-белковых взаимодействий связаны с внутренней митохондриальной мембраной.

В настоящее время в научном сообществе отсутствует единое мнение о количестве копий мтДНК в составе одного нуклеоида. Так, в ранних работах было показано, что нуклеоид включает в себя 1–2 молекулы мтДНК [4]. В других работах было продемонстрировано, что нуклеоид объединяет 6–10 молекул мтДНК [5], 2–8 молекул мтДНК [6], в среднем пять молекул мтДНК [7]. Последняя работа на эту тему была опубликована в 2011 г.; в ней исследователи с использованием микроскопии на основе подавления спонтанного испускания (STED) показали, что каждый нуклеоид включает в себя не более двух молекул мтДНК [8]. Высказывалось также мнение, что нуклеоиды, объединяющие 5–7 молекул мтДНК, характерны для соматических клеток, тогда как в половых клетках нуклеоиды содержат по 1–2 молекулы мтДНК [9]. Как предположили Даниэль Богенхаген с соавт., такая организация митохондриального генома (1–2 молекулы в нуклеоиде) позволяет молекулярно-биологическим системам митохондрий выявлять патогенные мутации значительно эффективнее, нежели в тех случаях, когда нуклеоид представлен несколькими молекулами мтДНК [10]. Дефектные митохондрии, в свою очередь, должны были бы элиминироваться митофагами [11]. Наличие в составе нуклеоида более одной молекулы ДНК в свое время позволило предположить, что подобная структура способствует сохранению нормальной структуры мтДНК, а близкое расположение нескольких молекул мтДНК друг к другу могло бы приводить в действие механизм репарации путем генной конверсии [12].

Другим актуальным вопросом, логически вытекающим из проблемы количества копий мтДНК в нуклеоиде, стал вопрос обмена молекулами мтДНК между нуклеоидами. Были предложены две модели функционального поведения мтДНК в составе нуклеоида: модель «стой-

кого нуклеоида» [13] и модель «динамичного нуклеоида» [14]. Первая модель постулирует, что нуклеоиды не обмениваются своей мтДНК, в связи с чем дочерние нуклеоиды после деления совпадают с родительскими в качественном и количественном отношении. Согласно второй модели мтДНК может перемещаться между нуклеоидами с последующей рекомбинацией. Такое заключение выдвинула группа исследователей под руководством Джованни Манфреди на основании данных по слиянию клеток, содержащих два различных гаплотипа мтДНК. Одна линия содержала точечную мутацию мтДНК, тогда как другая линия характеризовалась делецией. В результате дыхательная активность гибридных клеток была близка к нормальной, а в их митохондриях присутствовала мтДНК, являвшаяся результатом рекомбинации исходных молекул [14].

Для проверки истинной модели поведения мтДНК нуклеоидов в 2008 г. группа ученых под руководством Эрика Шона изучила сегрегацию двух различных вариантов мтДНК. Исследователи провели слияние клеточных линий, каждая из которых несла генетически различные нуклеоиды, меченые делециями в разных локусах. Популяции этих вариантов мтДНК отличали друг от друга с помощью цветных гибридизационных проб (FISH): зеленой, комплементарной участку мтДНК с одной делецией, и красной – с другой. Результаты данного эксперимента однозначно свидетельствовали о том, что митохондрии гибридных клеток содержали оба варианта мтДНК, но в составе разных нуклеоидов. Отсутствие смешения цветов между двумя популяциями различных нуклеоидов было отнесено в поддержку модели «стойкого нуклеоида» [7]. Другой коллектив под руководством Нильса-Горана Ларссона, используя STED-микроскопию, также получил данные в поддержку модели «стойкого нуклеоида» [8]. Этот вывод был сделан исходя из того, что количество мтДНК, подсчитанное ими на один нуклеоид, составляет в среднем 1,4. Трудно представить себе, чтобы нуклеоиды могли обмениваться своей мтДНК, если они состоят всего из одной молекулы мтДНК.

Предположение об отсутствии рекомбинации мтДНК было высказано на основании обширных филогеографических данных, в которых в качестве генетического маркера использовалась мтДНК [15]. Еще в 1960-х гг. с помощью электронного микроскопа впервые удалось увидеть сцепленные по 2–3 кольца мтДНК у пациентов с лейкемией [16, 17]. Позже аналогичные данные были получены на культивируемых клетках [18, 19]. В 1990 г. было показано, что основным способом возникновения протяженных

делеций в мтДНК человека является гомологичная рекомбинация по повторам, фланкирующим делетируемый участок [20]. В 2009 г. в культуре клеток сердца человека также с помощью электронной микроскопии было показано, что мтДНК этих клеток обладает сложной организацией, может существовать как в олигомерных, так и в мультимерных комплексах, а также содержит разветвленные структуры, такие как структуры Холлидея и структуры типа «Т-образный перекресток» [21]. Подобные молекулярные структуры обнаруживались лишь в клетках сердечной мышцы и нейронах головного мозга, в других исследованных тканях они не были выявлены. Эти данные позволяют предположить, что процессы гомологичной рекомбинации активно происходят в митохондриях, насыщенных активными формами кислорода. Аналогичным образом возникновение рекомбинантных вариантов мтДНК установили на мышечных моделях [22].

Важные доказательства наличия рекомбинации в клетках человека были получены в ходе исследования тканей индивидуума с доказанной наследуемостью митохондрий и от отца, и от матери [23]. В ходе секвенирования продуктов одномолекулярной ПЦР было выявлено наличие двух классов рекомбинантных молекул, содержащих участки как отцовской, так и материнской мтДНК. Обмен участками между молекулами мтДНК происходил в основном в трех участках генома – в районе участка инициации альтернативной репликации легкой цепи, а также в двух регионах по соседству с 5'-участком 7S ДНК, образующейся в ходе преждевременной терминации репликации мтДНК. Обмен участками ДНК именно в этих областях может объясняться образованием в них рекомбиногенных выступающих 3'-концов при остановках репликации. Такие свободные концы могут внедряться в находящуюся поблизости гомологичную ДНК, индуцируя процесс рекомбинации. Сходные результаты были получены при исследовании наличия продуктов рекомбинации в митохондриях мышечных клеток пациентов, имеющих высокую степень гетероплазмии [24].

Еще одно доказательство существования механизма гомологичной рекомбинации в митохондриях млекопитающих было получено на клетках мышей [25]. Авторы этой работы получили регулируемую систему экспрессии эндонуклеазы ScaI, направляемую в митохондрии с помощью присоединенной к ней сигнальной последовательности и вносящую двуцепочечные разрывы в мтДНК. Авторы показали, что после временной экспрессии эндонуклеазы и небольшого периода «восстановления» в ДНК митохондрией модифицированных клеток мышей вблизи

сайтов узнавания эндонуклеазы ScaI происходили процессы как внутримолекулярной, так и (существенно реже) межмолекулярной гомологичной рекомбинации. При этом частота рекомбинации зависела от взаиморасположения сайта узнавания рестриктазы и D-петли.

Важным аспектом изучения гомологичной рекомбинации в митохондриях является идентификация участников каждой из стадий процесса. Классический прокариотический путь рекомбинации включает в себя несколько ключевых белков, а именно: эндонуклеазы, образующие 3'-свободные концы после двуцепочечного разрыва; белок SSB (Single Strand Binding; белок, связывающий одноцепочечную ДНК), необходимый для стабилизации образующихся одноцепочечных 3'-концов; медиатор рекомбинации типа Rad52, привлекающий рекомбиназу; рекомбиназа Rad51/RecA, осуществляющая гомологичное спаривание и обмен ветвями; а также специфические эндонуклеазы – резольвазы, осуществляющие разрешение структур Холлидея, образовавшихся в результате рекомбинации [26]. К настоящему времени в митохондриях достоверно идентифицировано лишь несколько из приведенных выше компонентов. В первую очередь, это консервативный митохондриальный белок SSB, имеющий прокариотическое происхождение и существующий в форме гомотетрамера в митохондриях дрожжей и человека [27]. Помимо него достаточно хорошо охарактеризована резольваза SSE1 из митохондрий дрожжей [28, 29]. Для митохондрий человека кроссенко показано участие в рекомбинации транскрипционного фактора А (TFAM) и ДНК-хеликазы Twinkle, нарушения в экспрессии которых приводят к увеличению количества структур Холлидея в мтДНК [30].

Существование множества копий мтДНК в клетке зачастую приводит к существованию гетероплазмии, т.е. состоянию, при котором в одной клетке, ткани или органе сосуществует несколько вариантов мтДНК, в отличие от гомоплазмии, когда все мтДНК идентичны. Считается, что в состоянии гомоплазмии (за некоторым исключением) находятся нейтральные полиморфизмы, характеризующие принадлежность мтДНК к определенной гаплогруппе, тогда как патогенные мутации находятся, как правило, в состоянии гетероплазмии [31]. Однако в последнее время появляется все больше данных в пользу идеи о том, что мтДНК в организме человека находится скорее в виде смеси родственных вариантов гаплотипов мтДНК, т.е. в глобальном состоянии гетероплазмии по многим сайтам [32, 33].

При делении клетки митохондрии распределяются между дочерними клетками случайным

образом вследствие митотической сегрегации, в результате чего дочерние клетки могут различаться уровнем гетероплазмии [34]. На основании гипотезы «стойкого нуклеоида» и данных о наличии в составе нуклеоида нескольких молекул мтДНК в лаборатории Эрика Шона предположили, что в дочерних соматических клетках скорость сдвига в сторону мутантных мтДНК либо в сторону мтДНК дикого типа определяется составом нуклеоида родительской клетки. Как мутантная мтДНК, так и мтДНК дикого типа могут входить в состав одного нуклеоида (гетероплазматический нуклеоид) либо в отдельные нуклеоиды (гомоплазматический нуклеоид). Если материнская клетка содержит гетероплазматические нуклеоиды, то колебание уровня гетероплазмии дочерних клеток остается незначительным, однако если нуклеоиды гомоплазматические — уровень гетероплазмии дочерних клеток различается весьма значительно и зависит от отбора и дрейфа генов [35, 36]. При наличии в составе нуклеоида единственной молекулы мтДНК все нуклеоиды становятся гомоплазматическими, и их сегрегация между дочерними клетками определяется главным образом отбором между различными вариантами мтДНК. Помимо этого, делетированная мтДНК реплицируется быстрее в силу преимущества репликации как более короткая молекула. Клетки, составляющие основной состав этих тканей, являются постмитотическими, благодаря чему, вероятно, там накапливается мутантная мтДНК. Этот процесс принято называть «клональной амплификацией» мутантной мтДНК [37], и в ее основе лежит попытка клетки восстановить должный уровень выработки энергии путем увеличения числа копий митохондрий. Некоторые точечные мутации также могут давать мтДНК репликативное преимущество. Так, например, мутация *m.3243A > G* располагается в сайте узнавания белка *mTERT*. Наличие данной мутации уменьшает репликативную паузу, обеспечивая мтДНК преимуществом в репликации [38].

Интересно, что уровень гетероплазмии в митохондриях при первых трех зиготических делениях остается постоянным во всех бластомерах [39]. Вероятно, это связано с тем, что клетки до стадии 8-клеточного зародыша являются тотипотентными, и лишь с 16-клеточной стадии зародыша начинается их первая дифференцировка (на клетки трофобласта и клетки зародышевой массы). Можно предположить, что именно тогда происходит «включение» митохондриальной митотической сегрегации, т.е. процесса случайного распределения митохондрий между дочерними клетками. «Выключение» этого процесса, вероятно, происходит на стадии созрева-

ния яйцеклетки, поскольку показано, что как яйцеклетка, так и полярное тельце (первое и второе) также характеризуются одинаковым уровнем гетероплазмии [39]. Высказывается мнение, что митотическая сегрегация является постгастрюляционным событием [40].

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ НУКЛЕОИДА

POLRMT. Несмотря на общее признание эндосимбиотической гипотезы происхождения митохондрий, митохондриальная РНК-полимераза эволюционно ближе к РНК-полимеразам бактериофагов T3/T7. РНК-полимераза митохондрий человека представляет собой белок, состоящий из 1230 а.о., которые в свою очередь структурированы в три домена: С-концевой полимеразный домен (648–1230), N-концевой полимеразный домен (369–647) и N-концевой хвост (1–368). Только С-концевой домен показал сходство в последовательности с митохондриальной РНК-полимеразой и РНК-полимеразой фага — выявленные там консервативные блоки необходимы для каталитической активности фермента [41]. В N-концевых полимеразных доменах POLRMT и РНК-полимеразы фага сходства в последовательности не нашли, однако было установлено структурное сходство данных ферментативных доменов [42]. N-терминальный хвост является уникальной структурой POLRMT. Он, в свою очередь, включает в себя короткий, обогащенный пролином линкер (355–367), связывающий N-концевой хвост с N-концевым полимеразным доменом; PPR-домен (218–355); большой регион с неизвестной функцией (42–217) и сигнальную последовательность, направляющую предшественник белка на импорт в митохондрии после его синтеза в цитозоле (1–41). С-концевой домен включает субдомены, названные «пальцы» (939–1124), «ладонь» (791–831, 912–938, 1125–1176) и «большой палец» (705–790). Функция субдомена «большой палец» заключается, вероятно, в удержании РНК-полимеразы на матрице ДНК в ходе элонгации транскрипции [43]. Функция субдомена «пальцы» также заключается в связывании с ДНК-матрицей и удержании всего комплекса от диссоциации во время элонгации транскрипции.

N-концевой хвост POLRMT характеризуется множеством активностей, включая регуляцию инициации транскрипции, регуляцию стабильности мтДНК и репликации, обеспечение перемещения и процессинга РНК [44]. PPR-субдомен представляет собой суперспиральную струк-

туру, которая специфически связывается с одноцепочечной РНК, тем самым модулируя ее экспрессию [45]. С другой стороны, посредством белок-белковых взаимодействий POLRMT через PPR-субдомен взаимодействует с LRPPRC, связывая транскрипцию с посттранскрипционными событиями, такими как процессинг РНК, перемещение и трансляция [46].

Основная функция POLRMT – синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов на матрице ДНК. Механизм полимеризации носит название «механизм двух ионов металла» [47]. Двухвалентный ион магния координирует, с одной стороны, β- и γ-фосфатные группы входящего в цепь нуклеотида, и, с другой стороны, мотив А С-концевого домена POLRMT. Другой катион магния координирует 3'-ОН группу уже встроенного нуклеотида, α-фосфатную группу входящего нуклеотида и мотивы А и С С-концевого домена POLRMT. Такое положение второго катиона стимулирует нуклеофильную атаку на α-фосфатный атом. Следствием данной реакции является образование ковалентной связи между 3'-кислородом предыдущего рибонуклеотида и α-фосфатом следующего рибонуклеотида. Данный механизм характерен для всех полимераз и, соответственно, для полимеризации как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов. В целом процесс встраивания нового нуклеотида в цепь происходит в четыре этапа: связывание нуклеотида, конформационные изменения ферментов относительно нуклеотида, формирование химической связи между встроенным и предшествующим нуклеотидами и выделение пирофосфатной группы.

TFAM. Данный белок связывает мтДНК, участвует в ее локальном расплетении и сгибает ее в ходе компактизации при формировании нуклеоида. При низких концентрациях TFAM в экспериментах *in vitro* активируется транскрипция с промотора LSP, тогда как более высокие концентрации TFAM переключают процесс транскрипции на промотор HSP1 [48].

TFAM – высококонсервативный белок с молекулярной массой ~25 кДа. Данный белок состоит из нескольких хорошо охарактеризованных доменов. Среди них выделяют N-терминальную митохондриальную лидирующую последовательность длиной ~45 а.о., которая удаляется в ходе созревания белка при попадании в матрикс митохондрии [49]. TFAM содержит два ДНК-связывающих домена, называемых HMG-боксы (high-mobility group box), каждый из которых образован тремя α-спиралями, соединенными, соответственно, двумя пептидными петлями. При этом формируется структура, которая связывается с малой бороздкой ДНК, приводя к

ее изгибанию. Расположенный между HMG-боксами линкерный участок, как предполагается, дополнительно связывает сахарофосфатный остов ДНК [50, 51]. Согласно имеющимся данным, в ходе связывания HMG-боксов с ДНК происходит взаимодействие полярных аминокислотных сайтов цепей интеркалируют между азотистыми основаниями. Такое взаимодействие раздвигает основания, увеличивая длину малой бороздки ДНК и сокращая длину большой бороздки. Это, в свою очередь, приводит к изгибанию ДНК. Таким образом, TFAM способствует негативной суперспирализации двухцепочечной ДНК [52]. Высказывается мнение, что связывание ДНК одного белка TFAM меняет ее локальную структуру, что стимулирует взаимодействие с ДНК других TFAM. Кроме того, TFAM связывает ДНК в виде димера, и участок связывания составляет 37,2 п.н. [53]. Большое количество TFAM, связанного с ДНК, ингибирует как транскрипцию, так и репликацию мтДНК *in vitro* и *in vivo* [54, 55]. Установлено, что на одну мтДНК приходится 900–1600 молекул TFAM [8, 56] или ~500 димеров данного белка [57]. Поскольку в клетке присутствует множество копий мтДНК, часть из них, вероятно, находится в «выключенном» состоянии за счет инактивации митохондриального генома белком TFAM. Т.к. в клетке сохраняется определенное количество мтДНК, пусть даже и во временно неактивном состоянии, это не приводит к нарушению энергетического метаболизма клеток, что случается при уменьшении количества копий мтДНК [53].

Предполагается, что частое связывание TFAM с LSP-промотором повышает частоту формирования РНК-затравки для последующей репликации мтДНК. С другой стороны, связывание TFAM с множеством сайтов на мтДНК приводит к блокированию процесса репликации, тем самым стабилизируя количество митохондриального генома [53, 58]. Также TFAM стимулирует формирование D-петли *in vitro* [59].

TFB1M и TFB2M. Впервые белки TFB1M и TFB2M были охарактеризованы как участники процесса транскрипции дрожжей [59]. Было показано, что данные белки стимулируют транскрипцию в присутствии POLRMT и TFAM в системе *in vitro*, хотя TFB2M стимулирует транскрипцию в 10 раз активнее, нежели TFB1M [60]. Установлено, что в ходе транскрипции TFB1M и TFB2M связываются с TFAM, непосредственно взаимодействуя с COOH-терминальным активаторным доменом последнего.

Несмотря на этот факт, показано, что мыши, нокаутированные по TFB1M, погибают на стадии эмбриона [61]. Анализ нуклеотидной последо-

вательности генов, кодирующих данные белки, выявил их гомологию с бактериальной рРНК-диметилтрансферазой, что в дальнейшем подтвердилось способностью TFB1M метилировать два аденозиновых остатка 12S рРНК [62]. Установлено, что участие этих белков в процессах метилирования и транскрипции — независимые процессы, поскольку введенная мутация в метил-трансферазный мотив не подавляет способность белка активировать транскрипцию [63]. Как нокаут, так и нокдаун по гену, кодирующему TFB1M, приводит к угнетению процесса митохондриальной трансляции, вероятно, вследствие нарушения процесса сборки митохондриальных рибосомных субъединиц [64]. Гиперэкспрессия TFB1M вызывает повышенное метилирование 12S рРНК, угнетая митохондриальный биосинтез, и не способствует стимулированию процесса транскрипции мтДНК, в отличие от гиперэкспрессии гена *TFB2M*, которая этому способствует [65]. Вероятно, TFB2M у млекопитающих эволюционировал в сторону специализированного транскрипционного фактора [66]. Интересно, что следствием нокдауна TFB2M у *Drosophila* было снижение уровня транскриптов, тогда как нокдаун TFB1M приводил к снижению синтеза белков [67].

Белковый состав нуклеоида в настоящее время до конца неизвестен. Время от времени в научной периодике появляются работы, в которых идентифицируются все новые и новые компоненты митохондриального нуклеоида, однако чаще всего функции таких компонентов остаются неясными. Более или менее общепринятой является точка зрения, согласно которой в состав нуклеоида митохондрий входят, помимо вышеуказанных, следующие белки [2, 68]:

1) mtSSB — митохондриальный ортолог бактериального белка SSB, связывающийся с одноцепочечными участками ДНК, образующимися в ходе репликации;

2) ДНК-полимераза γ (POLG), осуществляющая собственно репликацию мтДНК;

3) ДНК-хеликаза Twinkle, также необходимая для репликации;

4) mTERF — митохондриальный фактор терминации транскрипции.

Функциональное описание этих белков приводится в соответствующих разделах ниже.

ТРАНСКРИПЦИЯ мтДНК

В составе тяжелой цепи мтДНК млекопитающих охарактеризованы последовательности промоторов транскрипции HSP1 и HSP2 [69]. Последовательности этих промоторов располо-

жены на ~100 п.н. друг от друга и инициируют транскрипцию в одном направлении, хотя роль промотора HSP2 все еще не показана в экспериментах по транскрипции *in vitro* [70]. Инициация транскрипции с HSP1-промотора дает начало короткой мРНК, включающей гены двух рРНК (12S и 16S) и двух тРНК (тРНК валина и фенилаланина). С промотора HSP2 инициируется синтез длинного полицистрона, включающего как короткий транскрипт, так и оставшуюся часть тяжелой цепи (12 мРНК и 11 тРНК). Каждый ген мРНК и рРНК фланкирован как минимум одним геном тРНК. После транскрипции тРНК вырезаются из транскриптов при помощи специальных процессирующих РНКаз, получивших обобщенное название РНКазы Р. Данную модель в научной литературе принято называть моделью тРНК-пунктуации [71]. Транскрипция легкой цепи мтДНК инициируется с промотора LSP и приводит к формированию полицистрона, включающего одну мРНК (ND6) и восемь тРНК [72].

TFAM, предположительно в виде димера, связывается с нуклеотидной последовательностью немного выше промоторов HSP и LSP [73]. Предполагается, что затем TFAM локально расплетает мтДНК, усиливая тем самым взаимодействие промотора с другими белками транскрипционного аппарата. Так, в частности, показано прямое белок-белковое взаимодействие С-терминального домена TFAM и факторов транскрипции TFB1M и TFB2M [63]. Кроме того, TFAM приводит к формированию изгиба ДНК в области промотора, что является критическим при инициации транскрипции [74]. Существует прямая зависимость между количеством TFAM и мтДНК в клетках: так, уменьшение экспрессии TFAM на 50% приводит к аналогичному уменьшению количества мтДНК [75]. Стоит отметить, однако, что общий уровень экспрессии митохондриальных генов оставался при этом в норме, определяя влияние TFAM лишь на количество мтДНК, но не на количество транскриптов. С другой стороны, полное отсутствие гена *TFAM* приводит не только к уменьшению количества копий мтДНК, но также и к уменьшению количества митохондриальных транскриптов [56]. Уменьшение количества копий мтДНК при уменьшении количества TFAM определяется взаимодействием транскрипции и репликации, т.к. для начала процесса репликации мтДНК необходимо инициировать синтез РНК [76]. Показано, что гетеродимер, формируемый POLRMT и TFB2M, закрывает нуклеотиды в позициях от +10 до -4 в промоторе легкой цепи. Установлено, что для инициации транскрипции важна не только определенная нуклео-

тидная последовательность промотора легкой цепи (LSP), но также и вышележащая нуклеотидная последовательность. Так, если заменить нуклеотидную последовательность выше LSP мтДНК человека на последовательность LSP мыши, данный участок начинают узнавать компоненты аппарата транскрипции мышей [77]. Точный механизм инициации транскрипции мтДНК млекопитающих неясен, однако имеются косвенные данные, полученные на культивируемых клетках. Так, показано, что β -шпилька в составе С-концевого домена POLRMT необходима для локального плавления дуплекса ДНК при инициации транскрипции [42]. Самостоятельно POLRMT, в отличие от РНК-полимеразы фага T7, не способна узнавать определенную последовательность, расплетать ее и запускать синтез РНК. Для этого ей необходимы дополнительные факторы. Поскольку POLRMT узнает три различных промотора и участок начала репликации, поверхность фермента, видимо, очень лабильна, хотя в данных процессах важную роль играют дополнительные факторы. Поскольку POLRMT не может непрерывно транскрибировать весь митохондриальный геном [44], для продолжительного синтеза РНК на матрице ДНК ей необходим дополнительный фактор, подобный тем, что способствуют элонгации транскрипции у прокариот и эукариот [78]. Было установлено, что митохондриальный фактор элонгации транскрипции (TEFM) увеличивает процессивность фермента, взаимодействуя с С-концевым доменом POLRMT и вновь синтезированной мРНК [79]. В составе субдомена «пальцы» выделяют О-петлю (968–1000), основные функции которой, как предполагается, заключаются в связывании нуклеотидов с последующим высвобождением пирофосфатных анионов [80].

Другой фактор, митохондриальный рибосомальный белок L12 (MRPL12), был идентифицирован как партнер в работе POLRMT [81]. Этот белок также регулирует метаболизм РНК [82], однако детальные механизмы его работы остаются неясными.

Терминация транскрипции изучена лишь в случае промотора HSP1 и происходит при участии белка MTERF1, который связывает 28-нуклеотидный участок на 3'-конце лейциновой тРНК. Этот участок называется участком терминации транскрипции [83]. Однако была показана и роль MTERF1 в инициации транскрипции – MTERF1 связывается с нуклеотидной последовательностью, расположенной вблизи HSP1. Предполагается, что взаимодействие белка с двумя регионами мтДНК способствует формированию петли, на которой происходит зацикливание

транскрипции, приводящее к увеличению содержания коротких транскриптов в митохондриях [70]. В мтДНК были обнаружены также дополнительные сайты узнавания MTERF1, которые расположены в D-петле, участке начала репликации легкой цепи, гене *ND1* и кластере тРНК изолейцина, глутамина и метионина. Связывание MTERF1 с этими сайтами, вероятно, способствует репликативной паузе, тем самым регулируя скорость репликации [84]. Терминация транскрипции с сайта инициации HSP2, вероятно, происходит в области контрольного региона, однако белки, участвующие в этом процессе, еще не выделены [85].

РЕПЛИКАЦИЯ мтДНК

В настоящее время обсуждаются три модели репликации мтДНК, две из которых осуществляются по асинхронному механизму, тогда как другая модель подразумевает одновременное копирование цепей ДНК. С глубоким анализом моделей репликации мтДНК читатель может ознакомиться в современных обзорных работах [38, 86]. При репликации мтДНК в роли затравки выступает транскрипт легкой цепи [76]. Предполагается, что замена POLRMT на POLG с последующим синтезом ДНК происходит немного ниже сайта CSBII, предположительно между позициями 282–300 [87]. Установлено, что этот район выступает в роли терминатора транскрипции с LSP *in vitro* [88]. TFAM дифференциально регулирует частоту событий транскрипции и репликации, и это зависит, как предполагается, от молярного соотношения TFAM к мтДНК [55]. Низкое содержание TFAM, видимо, является причиной запуска репликации. Растущая тяжелая цепь мтДНК часто терминируется через 700 нуклеотидов от участка начала репликации тяжелой цепи, что приводит к формированию D-петли. Как было сказано ранее, функция D-петли, вероятно, заключается в связывании митохондриального нуклеоида с внутренней мембраной митохондрий посредством белка ATAD3 [12]. Геликаза Twinkle в отсутствие mtSSB не способна расплетать двуцепочечную мтДНК более чем на 55 нуклеотидов, так же как и POLG не способна использовать двуцепочечную ДНК для синтеза цепей без дополнительных ферментов. Наличие POLG, Twinkle и mtSSB в реакции *in vitro* оказывается достаточным для репликации митохондриального генома. Скорость такой репликации была оценена как 270 п.н./мин [89].

Асинхронная модель репликации была высказана почти полвека назад [90] и к настоящему

времени развивается, не найдя своего опровержения [91–93]. Согласно данной модели, репликация начинается в OriH с запуска синтеза тяжелой цепи. Эта точка находится в пределах контрольного района мтДНК. Во время синтеза тяжелой цепи легкая цепь находится в одноцепочечном состоянии, при этом взаимодействуя с mtSSB. Такое одноцепочечное состояние способствует изменению конформации участка мтДНК, на котором расположен OriL, имеющий протяженность ~80 нуклеотидов. Этот участок принимает форму шпильки, которая узнается POLRMT, работающей в данном случае в качестве праймазы. Головка шпильки, состоящая из ~12 нуклеотидов, включает шесть остатков тимина, которые являются критическими для начала репликации легкой цепи — именно с них начинается синтез праймера-затравки. После синтеза ~25 нуклеотидов POLRMT заменяется POLG, которая продолжает синтез ДНК на легкой цепи [94]. Геликаза Twinkle расплетает двуцепочечную ДНК для последующей работы ферментов репликации. РНКазы H1 удаляют РНК-затравку, лигаза III сшивает фрагменты ДНК, а топоизомеразы снимают торсионное напряжение, возникающее при движении репликативной вилки. Остается открытым вопрос о существовании фактора, помогающего узнавать POLRMT шпильку ДНК в области oriL для формирования праймера-затравки и последующей репликации легкой цепи согласно асинхронной модели.

В 2002 г. группа исследователей под руководством Яна Холта, используя двумерный агарозный гель-электрофорез и набор специфических нуклеаз, показала наличие молекул РНК, комплементарно связанных с ДНК (которая должна была быть в одноцепочечном состоянии согласно предыдущей модели репликации) [95]. В дальнейшем данная модель была названа RITOLS (RNA Incorporated ThroughOut the Lagging Strand) [96]. В настоящее время в нескольких работах было показано, что молекула РНК связывается с протяженным участком считавшейся до этого одноцепочечной ДНК [97, 98]. Открытие РНК-посредника в процессе репликации мтДНК изначально было воспринято научным сообществом как артефакт и вызвало дебаты двух научных школ на страницах высокоимпактных журналов [99–101]. Недавно наличие дуплекса РНК/ДНК при асинхронной модели репликации было подтверждено на *Drosophila melanogaster* [102]. Ян Холт с коллегами, продолжая разработку этой модели, отмечают, что связывание ДНК с РНК вместо mtSSB имеет ряд преимуществ. В частности, РНК содержит ту же генетическую информацию, что и ДНК и, таким образом, может выступать в роли

матрицы для репарации повреждений при репликации отстающей цепи [38]. Вероятно, асинхронная модель связана с RITOLS, однако остается неясным взаимоотношение РНК и mtSSB относительно одноцепочечной ДНК в ходе репликации митохондриального генома.

Модель синхронной репликации мтДНК также была предложена группой Яна Холта [103]. Данная модель соответствует модели репликации ядерной ДНК и подразумевает наличие лидирующей и отстающей цепей. К настоящему времени показано, что митохондриальный протеом включает в себя белки, необходимые для созревания фрагментов Оказаки, в частности эндонуклеазы Pif1, Fen1 и Dna2 [104]. Репликация в данном случае начинается как двунаправленная, однако, достигая определенного участка D-петли, блокируется и продолжается как однонаправленная [105].

В настоящее время предполагается, что митохондрия использует один из механизмов репликации в зависимости от энергетических потребностей клетки. В стационарной фазе роста мтДНК реплицируется, вероятно, по синхронному механизму, переключаясь на асинхронный, когда необходимо быстро увеличить количество митохондрий [106].

Особый механизм регулирования репликации наблюдается в половых клетках [107]. Данный процесс получил название «бутылочное горлышко» (англ. bottleneck). Установлено, что до оплодотворения яйцеклетка несет ~200 тыс. митохондрий, в каждой из которых содержится 1–2 молекулы мтДНК, т.е. в среднем один нуклеоид. После оплодотворения в результате серии зиготических делений количество митохондрий уменьшается вдвое с каждым клеточным делением. Бластоциста содержит ~1000 митохондрий, т.е. ~100 митохондрий на бластомер. После имплантации в ходе дальнейшей дифференциации клеток обособляются первичные половые клетки, гоноциты. Эти первые в линии зародышевого пути клетки сначала скапливаются в энтодерме желточного мешка, а затем мигрируют через мезенхиму в зачатки гонад. До миграции каждый гоноцит содержит ~10 митохондрий. Однако после миграции количество митохондрий увеличивается до 100, затем в оогониях до 200, а в примордиальных фолликулах — до 5 тыс. После наступления половой зрелости в ходе созревания яйцеклетки количество митохондрий в ней увеличивается до 200 тыс. Деление митохондрий напрямую связано с репликацией мтДНК и количеством нуклеоидов в митохондрии. Показано, что после оплодотворения репликация мтДНК блокируется, что ограничивает и деление митохондрий.

РЕПАРАЦИЯ И РЕКОМБИНАЦИЯ мтДНК

ДНК митохондрий находится в существенно более агрессивной среде, нежели ядерная, что приводит к более высокой частоте возникновения мутаций [108]. При этом поддержание постоянства генома митохондрий имеет крайне важное значение для функционирования как самих органелл, так и клетки в целом. Однако о механизмах репарации повреждений в мтДНК известно не так много.

В частности, для митохондрий показано наличие двух путей репарации – репарации по типу эксцизии оснований (Base Excision Repair, BER) и репарации неспаренных нуклеотидов (Mismatch Repair, MMR).

Наиболее изученным путем репарации в митохондриях является BER. Репарация модифицированных оснований по типу BER подразумевает несколько этапов. Изначально необходимо найти поврежденный нуклеотид и гидролизовать β -N-гликозидную связь между модифицированным нуклеотидом и сахарофосфатным остовом. Эту функцию в ядре и митохондриях выполняет достаточно обширный класс ферментов – ДНК-гликозилазы. Различают два типа ДНК-гликозилаз – моно- и бифункциональные. Монофункциональные гликозилазы удаляют поврежденные основания только из двуцепочечной ДНК и образуют апуриновый или апириимидиновый сайт (АП-сайт). К ним относится урацил-ДНК-гликозилаза UNG1, удаляющая дезаминированный цитозин или ошибочно включенный dUMP, а также гомолог белка MutY *E. coli* – MYH, удаляющий аденин или гуанин, ошибочно включенные напротив 8-оксигуанина. Продукты экспрессии этих генов подвергаются альтернативному сплайсингу, что приводит к локализации их белковых продуктов как в ядре, так и в митохондриях [109–111]. Поскольку монофункциональные ДНК-гликозилазы заканчивают свою работу образованием АП-сайта, для создания свободного 3'-ОН для застраивания повреждения также необходимо наличие специфической АП-лиазы. В митохондриях такой лиазой является эндонуклеаза APE1, также локализованная как в ядре, так и в митохондриях [112].

Из бифункциональных ДНК-гликозилаз в митохондриях обнаружены OGG1 (8-оксигуанин ДНК-гликозилаза 1), NTH1 (гомолог эндонуклеазы III *E. coli*), NEIL1 и NEIL2 (гомологи Fpg и Nei гликозилаз *E. coli* соответственно). OGG1 и NTH1 локализованы как в ядре, так и в

митохондриях благодаря альтернативному сплайсингу их пре-мРНК, аналогично UNG1 и MYH, а путь импорта NEIL-белков в митохондрии неизвестен [111, 113]. Бифункциональные ДНК-гликозилазы могут узнавать и удалять поврежденные основания на различных структурах как в одно-, так и в двуцепочечной ДНК. Бифункциональные гликозилазы помимо ДНК-гликозилазной обладают и АП-лиазной активностью [114, 115].

Помимо ДНК-гликозилаз и АП-лиазы в митохондриях также обнаружены и другие участники BER-репарации: полинуклеотидкиназа/фосфатаза (PNKP), осуществляющая застройку 3'-конца однонуклеотидной бреши [116]; субъединица митохондриальной ДНК-полимеразы Pol γ – Pol γ 1, имеющая dRP-лиазную активность и образующая на 5'-конце лигируемый фосфат, а также присоединяющая «правильный» нуклеотид на место удаленного [117]. Наконец, в митохондриях идентифицирована ДНК-лигаза 3, осуществляющая лигирование репарируемой цепи [118].

Более подробная информация о молекулярных механизмах BER-репарации, а также о некоторых из участников MMR-репарации в митохондриях представлена в детальном обзоре Казака с соавт. [119].

Как уже говорилось выше, в научном сообществе до сих пор отсутствует единая точка зрения на то, имеется ли в митохондриях млекопитающих процесс, аналогичный ядерной гомологичной рекомбинации. Тем не менее к настоящему времени накоплена достаточно большая доказательная база существования такого механизма.

Таким образом, можно предположить, что в митохондриях млекопитающих имеются механизмы осуществления гомологичной рекомбинации ДНК, однако они требуют дальнейшего тщательного изучения.

Авторы глубоко признательны всем сотрудникам своих лабораторий в Калининграде и Москве за помощь в написании данной работы.

Работа в БФУ имени И. Канта выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.», идентификатор RFMEFI57514X0108), в МГУ им. М.В. Ломоносова – при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spelbrink, J.N. (2010) Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges, *IUBMB Life*, **1**, 19–32.
2. Bogenhagen, D.F. (2012) Mitochondrial DNA nucleoid structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 914–920.
3. Bogenhagen, D.F., Rousseau, D., and Burke, S. (2008) The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids, *J. Biol. Chem.*, **6**, 3665–3675.
4. Satoh, M., and Kuroiwa, T. (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell, *Exp. Cell Res.*, **1**, 137–140.
5. Iborra, F.J., Kimura, H., and Cook, P.R. (2004) The functional organization of mitochondrial genomes in human cells, *BMC Biol.*, **2**, 9.
6. Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA, *J. Cell Sci.*, **117**, 2653–2662.
7. Gilkerson, R.W., Schon, E.A., Hernandez, E., and Davidson, M.M. (2008) Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation, *J. Cell Biol.*, **7**, 1117–1128.
8. Kukat, C., Wurm, C.A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.G., and Jakobs, S. (2011) Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **33**, 13534–13539.
9. Van Blerkom, J. (2009) Mitochondria in early mammalian development, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **3**, 354–364.
10. Bogenhagen, D.F. (2010) Does mtDNA nucleoid organization impact aging? *Exp. Gerontol.*, **45**, 473–477.
11. Goldman, S.J., Taylor, R., Zhang, Y., and Jin, S. (2010) Autophagy and the degradation of mitochondria, *Mitochondrion*, **4**, 309–315.
12. Holt, I.J., He, J., Mao, C.C., Boyd-Kirkup, J.D., Martinsson, P., Sembongi, H., Reyes, A., and Spelbrink, J.N. (2007) Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome, *Mitochondrion*, **5**, 311–321.
13. Jacobs, H.T., Lehtinen, S.K., and Spelbrink, J.N. (2000) No sex please, we're mitochondria: a hypothesis on the somatic unit of inheritance of mammalian mtDNA, *Bioessays*, **6**, 564–572.
14. D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lin, M.T., Mauck, W.M., Shao, L.Z., Lenaz, G., Moraes, C.T., and Manfredi, G. (2004) Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells, *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 3171–3179.
15. Elson, J.L., Andrews, R.M., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., and Howell, N. (2001) Analysis of European mtDNAs for recombination, *Am. J. Hum. Genet.*, **1**, 145–153.
16. Clayton, D.A., and Vinograd, J. (1967) Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes, *Nature*, **5116**, 652–657.
17. Clayton, D.A., and Vinograd, J. (1967) Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **4**, 1077–1084.
18. Holt, I.J., Dunbar, D.R., and Jacobs, H.T. (1997) Behaviour of a population of partially duplicated mitochondrial DNA molecules in cell culture: segregation, maintenance and recombination dependent upon nuclear background, *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1251–1260.
19. Tang, Y., Manfredi, G., Hirano, M., and Schon, E.A. (2000) Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long-term cultured transmitochondrial cell lines, *Mol. Biol. Cell*, **7**, 2349–2358.
20. Mita, S., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Shanske, S., Arnaudo, E., Fabrizi, G.M., Koga, Y., DiMauro, S., and Schon, E.A. (1990) Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Res.*, **3**, 561–567.
21. Pohjoismaki, J.L., Goffart, S., Tyynismaa, H., Willcox, S., Ide, T., Kang, D., Suomalainen, A., Karhunen, P.J., Griffith, J.D., Holt, I.J., and Jacobs, H.T. (2009) Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks, *J. Biol. Chem.*, **32**, 21446–21457.
22. Fan, W., Lin, C.S., Potluri, P., Procaccio, V., and Wallace, D.C. (2012) mtDNA lineage analysis of mouse L-cell lines reveals the accumulation of multiple mtDNA mutants and intermolecular recombination, *Genes Dev.*, **4**, 384–394.
23. Kraysberg, Y., Schwartz, M., Brown, T.A., Ebralidse, K., Kunz, W.S., Clayton, D.A., Vissing, J., and Khrapko, K. (2004) Recombination of human mitochondrial DNA, *Science*, **5673**, 981.
24. Zsurka, G., Kraysberg, Y., Kudina, T., Kornblum, C., Elger, C.E., Khrapko, K., and Kunz, W.S. (2005) Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy, *Nat. Genet.*, **8**, 873–877.
25. Bacman, S.R., Williams, S.L., and Moraes, C.T. (2009) Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after *in vivo* induction of multiple double-strand breaks, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4218–4226.
26. Chen, X.J. (2013) Mechanism of homologous recombination and implications for aging-related deletions in mitochondrial DNA, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **3**, 476–496.
27. Yang, C., Curth, U., Urbanke, C., and Kang, C. (1997) Crystal structure of human mitochondrial single-stranded DNA binding protein at 2.4 Å resolution, *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 153–157.
28. White, M.F., and Lilley, D.M. (1996) The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Biol.*, **2**, 330–341.
29. Fogg, J.M., Schofield, M.J., Declais, A.C., and Lilley, D.M. (2000) Yeast resolving enzyme CCE1 makes sequential cleavages in DNA junctions within the lifetime of the complex, *Biochemistry*, **14**, 4082–4089.
30. Ohno, T., Umeda, S., Hamasaki, N., and Kang, D. (2000) Binding of human mitochondrial transcription factor A, an HMG box protein, to a four-way DNA junction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 492–498.
31. Wang, J., Schmitt, E.S., Landsverk, M.L., Zhang, V.W., Li, F.Y., Graham, B.H., Craigen, W.J., and Wong, L.J. (2012) An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience, *Genet. Med.*, **6**, 620–626.
32. He, Y., Wu, J., Dressman, D.C., Iacobuzio-Donahue, C., Markowitz, S.D., Velculescu, V.E., Diaz, L.A., Jr., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Papadopoulos, N. (2010) Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells, *Nature*, **7288**, 610–614.
33. Payne, B.A., Wilson, I.J., Yu-Wai-Man, P., Coxhead, J., Deehan, D., Horvath, R., Taylor, R.W., Samuels, D.C., Santibanez-Koref, M., and Chinnery, P.F. (2013) Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA, *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 384–390.
34. Wonnapijit, P., Chinnery, P.F., and Samuels, D.C. (2008) The distribution of mitochondrial DNA heteroplasmy due to random genetic drift, *Am. J. Hum. Genet.*, **5**, 582–593.
35. Gilkerson, R.W., and Schon, E.A. (2008) Nucleoid autonomy: an underlying mechanism of mitochondrial genetics

- with therapeutic potential, *Commun. Integr. Biol.*, **1**, 34–36.
36. Gilkerson, R.W. (2009) Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **10**, 1899–1906.
 37. de Grey, A.D. (2009) How is mutant mitochondrial DNA clonally amplified? Much new evidence, still no answers, *Rejuven. Res.*, **3**, 217–219.
 38. Holt, I.J., and Reyes, A. (2013) Human mitochondrial DNA replication, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, 12.
 39. Dean, N.L., Battersby, B.J., Ao, A., Gosden, R.G., Tan, S.L., Shoubridge, E.A., and Molnar, M.J. (2003) Prospect of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases, *Mol. Hum. Reprod.*, **10**, 631–638.
 40. St. John, J.C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., and Salah, R. (2010) Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells, *Hum. Reprod. Update*, **5**, 488–509.
 41. Cermakian, N., Ikeda, T.M., Miramontes, P., Lang, B.F., Gray, M.W., and Cedergren, R. (1997) On the evolution of the single-subunit RNA polymerases, *J. Mol. Evol.*, **6**, 671–681.
 42. Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y.I., Litonin, D., Cramer, P., and Temiakov, D. (2011) Structure of human mitochondrial RNA polymerase, *Nature*, **7368**, 269–273.
 43. Sousa, R. (2001) T7 RNA polymerase, *Uirusu*, **1**, 81–94.
 44. Arnold, J.J., Sharma, S.D., Feng, J.Y., Ray, A.S., Smidansky, E.D., Kireeva, M.L., Cho, A., Perry, J., Vela, J.E., Park, Y., Xu, Y., Tian, Y., Babusis, D., Barauskus, O., Peterson, B.R., Gnat, A., Kashlev, M., Zhong, W., and Cameron, C.E. (2012) Sensitivity of mitochondrial transcription and resistance of RNA polymerase II dependent nuclear transcription to antiviral ribonucleosides, *PLoS Pathog.*, **11**, e1003030.
 45. Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2008) PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression, *Biochem. J.*, **1**, 5–6.
 46. Shadel, G.S. (2004) Coupling the mitochondrial transcription machinery to human disease, *Trends Genet.*, **10**, 513–519.
 47. Steitz, T.A., and Steitz, J.A. (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **14**, 6498–6502.
 48. Shutt, T.E., Lodeiro, M.F., Cotney, J., Cameron, C.E., and Shadel, G.S. (2010) Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **27**, 12133–12138.
 49. Garstka, H.L., Schmitt, W.E., Schultz, J., Sogl, B., Silakowski, B., Perez-Martos, A., Montoya, J., and Wiesner, R.J. (2003) Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5039–5047.
 50. Ngo, H.B., Kaiser, J.T., and Chan, D.C. (2011) The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1290–1296.
 51. Rubio-Cosials, A., Sidow, J.F., Jimenez-Menendez, N., Fernandez-Millan, P., Montoya, J., Jacobs, H.T., Coll, M., Bernado, P., and Sola, M. (2011) Human mitochondrial transcription factor A induces a U-turn structure in the light strand promoter, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 1281–1289.
 52. Fisher, R.P., Lisowsky, T., Parisi, M.A., and Clayton, D.A. (1992) DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein, *J. Biol. Chem.*, **5**, 3358–3367.
 53. Campbell, C.T., Kolesar, J.E., and Kaufman, B.A. (2012) Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 921–929.
 54. Matsushima, Y., Goto, Y., and Kaguni, L.S. (2010) Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **43**, 18410–18415.
 55. Shutt, T.E., Bestwick, M., and Shadel, G.S. (2011) The core human mitochondrial transcription initiation complex: it only takes two to tango, *Transcription*, **2**, 55–59.
 56. Ekstrand, M.I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C.B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.G. (2004) Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals, *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 935–944.
 57. Alam, T.I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N., and Kang, D. (2003) Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1640–1645.
 58. Kaufman, B.A., Durisic, N., Mativetsky, J.M., Costantino, S., Hancock, M.A., Grutter, P., and Shoubridge, E.A. (2007) The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures, *Mol. Biol. Cell*, **9**, 3225–3236.
 59. McCulloch, V., Seidel-Rogol, B.L., and Shadel, G.S. (2002) A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine, *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1116–1125.
 60. Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA, *Nat. Genet.*, **3**, 289–294.
 61. Metodiev, M.D., Lesko, N., Park, C.B., Camara, Y., Shi, Y., Wibom, R., Hultenby, K., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.G. (2009) Methylation of 12S rRNA is necessary for *in vivo* stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome, *Cell Metab.*, **4**, 386–397.
 62. Seidel-Rogol, B.L., McCulloch, V., and Shadel, G.S. (2003) Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop, *Nat. Genet.*, **1**, 23–24.
 63. McCulloch, V., and Shadel, G.S. (2003) Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5816–5824.
 64. Cotney, J., McKay, S.E., and Shadel, G.S. (2009) Elucidation of separate, but collaborative functions of the rRNA methyltransferase-related human mitochondrial transcription factors B1 and B2 in mitochondrial biogenesis reveals new insight into maternally inherited deafness, *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2670–2682.
 65. Cotney, J., Wang, Z., and Shadel, G.S. (2007) Relative abundance of the human mitochondrial transcription system and distinct roles for h-mtTFB1 and h-mtTFB2 in mitochondrial biogenesis and gene expression, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4042–4054.
 66. Rantanen, A., Gaspari, M., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.G. (2003) Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2, *Mamm. Genome*, **1**, 1–6.
 67. Matsushima, Y., Adan, C., Garesse, R., and Kaguni, L.S. (2005) *Drosophila* mitochondrial transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells, *J. Biol. Chem.*, **17**, 16815–16820.

68. Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J.M., and Spelbrink, J.N. (2014) To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins, *Biochimie*, **100**, 219–226.
69. Micol, V., Fernandez-Silva, P., and Attardi, G. (1997) Functional analysis of *in vivo* and in organello footprinting of HeLa cell mitochondrial DNA in relationship to ATP and ethidium bromide effects on transcription, *J. Biol. Chem.*, **30**, 18896–18904.
70. Martin, M., Cho, J., Cesare, A.J., Griffith, J.D., and Attardi, G. (2005) Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis, *Cell*, **7**, 1227–1240.
71. Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria, *Nature*, **5806**, 470–474.
72. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, **5806**, 457–465.
73. Gangelhoff, T.A., Mungalachetty, P.S., Nix, J.C., and Churchill, M.E. (2009) Structural analysis and DNA binding of the HMG domains of the human mitochondrial transcription factor A, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3153–3164.
74. Malarkey, C.S., Bestwick, M., Kuhlwilm, J.E., Shadel, G.S., and Churchill, M.E. (2012) Transcriptional activation by mitochondrial transcription factor A involves preferential distortion of promoter DNA, *Nucleic Acids Res.*, **2**, 614–624.
75. Larsson, N.G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S., and Clayton, D.A. (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice, *Nat. Genet.*, **3**, 231–236.
76. Bonawitz, N.D., Clayton, D.A., and Shadel, G.S. (2006) Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery, *Mol. Cell*, **6**, 813–825.
77. Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2004) The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells, *EMBO J.*, **23**, 4606–4614.
78. Yoh, S.M., Cho, H., Pickle, L., Evans, R.M., and Jones, K.A. (2007) The Spt6 SH2 domain binds Ser2-P RNAPII to direct Iwsl-dependent mRNA splicing and export, *Genes Dev.*, **2**, 160–174.
79. Minczuk, M., He, J., Duch, A.M., Ettema, T.J., Chlebowski, A., Dzionek, K., Nijtmans, L.G., Huynen, M.A., and Holt, I.J. (2011) TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 4284–4299.
80. Steitz, T.A. (2009) The structural changes of T7 RNA polymerase from transcription initiation to elongation, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 683–690.
81. Wang, Z., Cotney, J., and Shadel, G.S. (2007) Human mitochondrial ribosomal protein MRPL12 interacts directly with mitochondrial RNA polymerase to modulate mitochondrial gene expression, *J. Biol. Chem.*, **17**, 12610–12618.
82. Gohil, V.M., Nilsson, R., Belcher-Timme, C.A., Luo, B., Root, D.E., and Mootha, V.K. (2010) Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression, *J. Biol. Chem.*, **18**, 13742–13747.
83. Spahr, H., Samuelsson, T., Hallberg, B.M., and Gustafsson, C.M. (2010) Structure of mitochondrial transcription termination factor 3 reveals a novel nucleic acid-binding domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 386–390.
84. Hyvarinen, A.K., Pohjoismaki, J.L., Reyes, A., Wanrooij, S., Yasukawa, T., Karhunen, P.J., Spelbrink, J.N., Holt, I.J., and Jacobs, H.T. (2007) The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6458–6474.
85. Camasamudram, V., Fang, J.K., and Avadhani, N.G. (2003) Transcription termination at the mouse mitochondrial H-strand promoter distal site requires an A/T rich sequence motif and sequence specific DNA binding proteins, *Eur. J. Biochem.*, **6**, 1128–1140.
86. McKinney, E.A., and Oliveira, M.T. (2013) Replicating animal mitochondrial DNA, *Genet. Mol. Biol.*, **3**, 308–315.
87. Xu, B., and Clayton, D.A. (1995) A persistent RNA–DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence, *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 580–589.
88. Pham, X.H., Farge, G., Shi, Y., Gaspari, M., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2006) Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **34**, 24647–24652.
89. Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M., and Falkenberg, M. (2004) Reconstitution of a minimal mtDNA replisome *in vitro*, *EMBO J.*, **12**, 2423–2429.
90. Roberson, D.L., and Clayton, D.A. (1972) Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase-derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **12**, 3810–3814.
91. Clayton, D.A. (2003) Mitochondrial DNA replication: what we know, *IUBMB Life*, **5**, 213–217.
92. Falkenberg, M., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 679–699.
93. Pomerantz, R.T., and O'Donnell, M. (2008) The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase, *Nature*, **7223**, 762–766.
94. Fuste, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I.J., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2010) Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication, *Mol. Cell*, **1**, 67–78.
95. Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2002) Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication, *Cell*, **4**, 495–505.
96. Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T.J., Yang, M.Y., Bowmaker, M., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2006) Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand, *EMBO J.*, **22**, 5358–5371.
97. Pohjoismaki, J.L., Holmes, J.B., Wood, S.R., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Bailey, L.J., Cluett, T.J., Goffart, S., Willcox, S., Rigby, R.E., Jackson, A.P., Spelbrink, J.N., Griffith, J.D., Crouch, R.J., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2010) Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid, *J. Mol. Biol.*, **5**, 1144–1155.
98. Reyes, A., Kazak, L., Wood, S.R., Yasukawa, T., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2013) Mitochondrial DNA replication proceeds via a «bootlace» mechanism involving the incorporation of processed transcripts, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 5837–5850.
99. Bogenhagen, D.F., and Clayton, D.A. (2003) The mitochondrial DNA replication bubble has not burst, *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 357–360.

100. Holt, I.J., and Jacobs, H.T. (2003) Response: the mitochondrial DNA replication bubble has not burst, *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 355–356.
101. Bogenhagen, D.F., and Clayton, D.A. (2003) Concluding remarks: the mitochondrial DNA replication bubble has not burst, *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 404–405.
102. Joers, P., and Jacobs, H.T. (2013) Analysis of replication intermediates indicates that *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA replicates by a strand-coupled θ mechanism, *PLoS One*, **1**, e53249.
103. Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA, *Cell*, **5**, 515–524.
104. Holt, I.J. (2009) Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap, *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 358–365.
105. Bowmaker, M., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H.T., Huberman, J.A., and Holt, I.J. (2003) Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone, *J. Biol. Chem.*, **51**, 50961–50969.
106. Fish, J., Raule, N., and Attardi, G. (2004) Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis, *Science*, **5704**, 2098–2101.
107. St. John, J.C. (2012) Transmission, inheritance and replication of mitochondrial DNA in mammals: implications for reproductive processes and infertility, *Cell Tissue Res.*, **3**, 795–808.
108. Howell, N. (1996) Mutational analysis of the human mitochondrial genome branches into the realm of bacterial genetics, *Am. J. Hum. Genet.*, **4**, 749–755.
109. Slupphaug, G., Markussen, F.H., Olsen, L.C., Aasland, R., Aarsaether, N., Bakke, O., Krokan, H.E., and Helland, D.E. (1993) Nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase are encoded by the same gene, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2579–2584.
110. Nilsen, H., Otterlei, M., Haug, T., Solum, K., Nagelhus, T.A., Skorpen, F., and Krokan, H.E. (1997) Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the *UNG* gene, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 750–755.
111. Nakabeppu, Y. (2001) Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **68**, 75–94.
112. Demple, B., and Sung, J.S. (2005) Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair, *DNA Repair (Amsterdam)*, **12**, 1442–1449.
113. Ikeda, S., Kohmoto, T., Tabata, R., and Seki, Y. (2002) Differential intracellular localization of the human and mouse endonuclease III homologs and analysis of the sorting signals, *DNA Repair (Amsterdam)*, **10**, 847–854.
114. Demple, B., and Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 915–948.
115. Dou, H., Theriot, C.A., Das, A., Hegde, M.L., Matsumoto, Y., Boldogh, I., Hazra, T.K., Bhakat, K.K., and Mitra, S. (2008) Interaction of the human DNA glycosylase NEIL1 with proliferating cell nuclear antigen. The potential for replication-associated repair of oxidized bases in mammalian genomes, *J. Biol. Chem.*, **6**, 3130–3140.
116. Tahbaz, N., Subedi, S., and Weinfeld, M. (2012) Role of polynucleotide kinase/phosphatase in mitochondrial DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 3484–3495.
117. Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H., and Copeland, W.C. (1998) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase γ and its role in mitochondrial base excision repair *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **21**, 12244–12248.
118. Pinz, K.G., and Bogenhagen, D.F. (2006) The influence of the DNA polymerase gamma accessory subunit on base excision repair by the catalytic subunit, *DNA Repair (Amsterdam)*, **1**, 121–128.
119. Kazak, L., Reyes, A., and Holt, I.J. (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 659–671.

MATRIX PROCESSES IN MITOCHONDRIA

I. O. Mazunin^{1*}, S. A. Levitskiy², M. V. Patrushev^{1,2},
P. A. Kamenski^{1,2*}

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Institute of Chemistry and Biology, ul. Alexandra Nevskogo 14, Kaliningrad 236038, Russia; fax: +7(4012)595-595, E-mail: IMazunin@kantiana.ru

² M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-4309, E-mail: piotr.kamenski@gmail.com

Received July 6, 2015

Revision received July 16, 2015

Mitochondria contain their own genome, which, despite of its small size, is critically important for the function of the organelle. This is due to the fact that mitochondrial DNA codes for several dozens of organellar RNAs and proteins. All matrix processes known for bacterial and nuclear DNA, namely replication, transcription, reparation, and recombination, are described in mitochondria. The molecular mechanisms of these processes are generally similar to those in bacteria, but they are characterized by several unique features. This review is dedicated to the overall description of mitochondrial matrix processes. Special attention is given to the peculiarities of these processes that are specific for these organelles.

Key words: mitochondria, mtDNA, nucleoid, replication, transcription, reparation, recombination