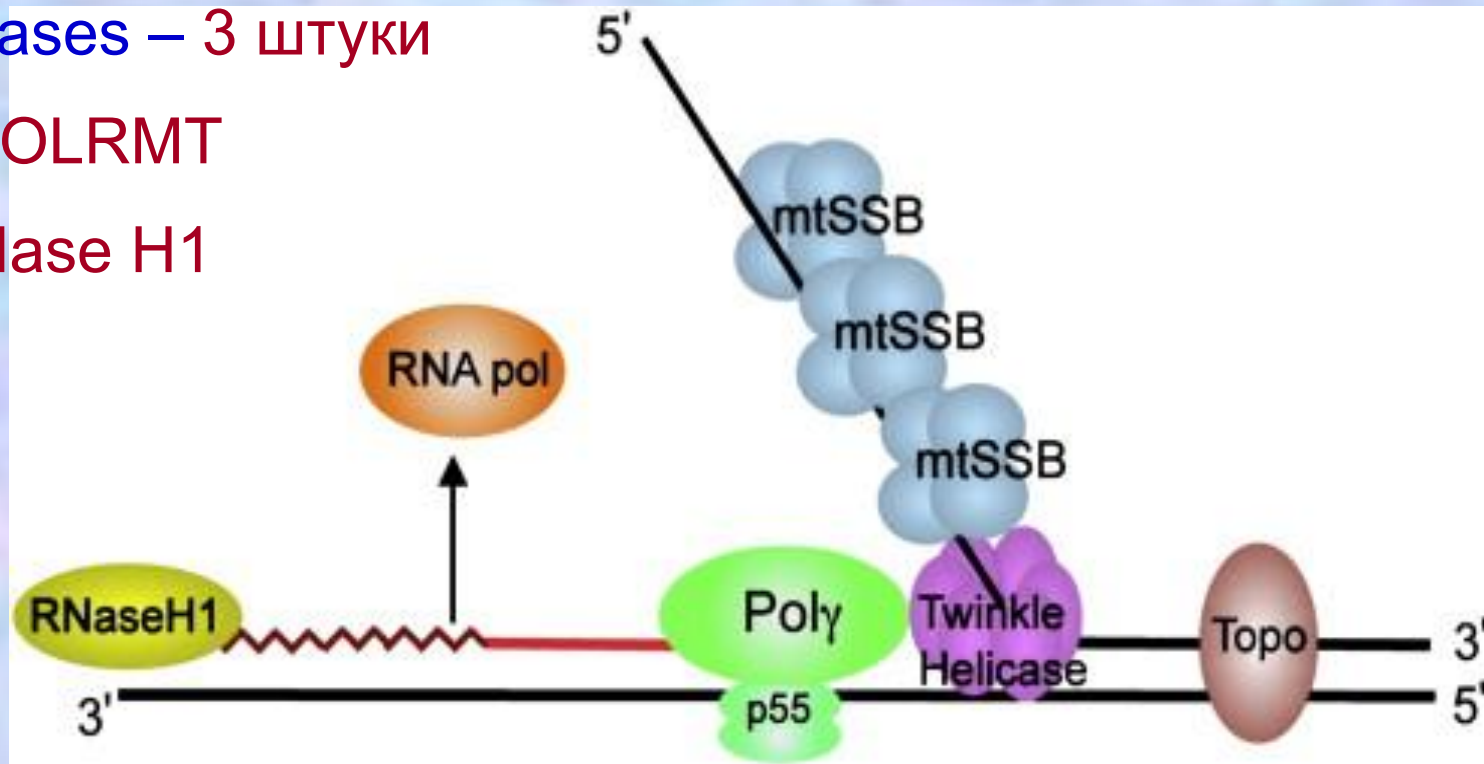


## Лекция 3:

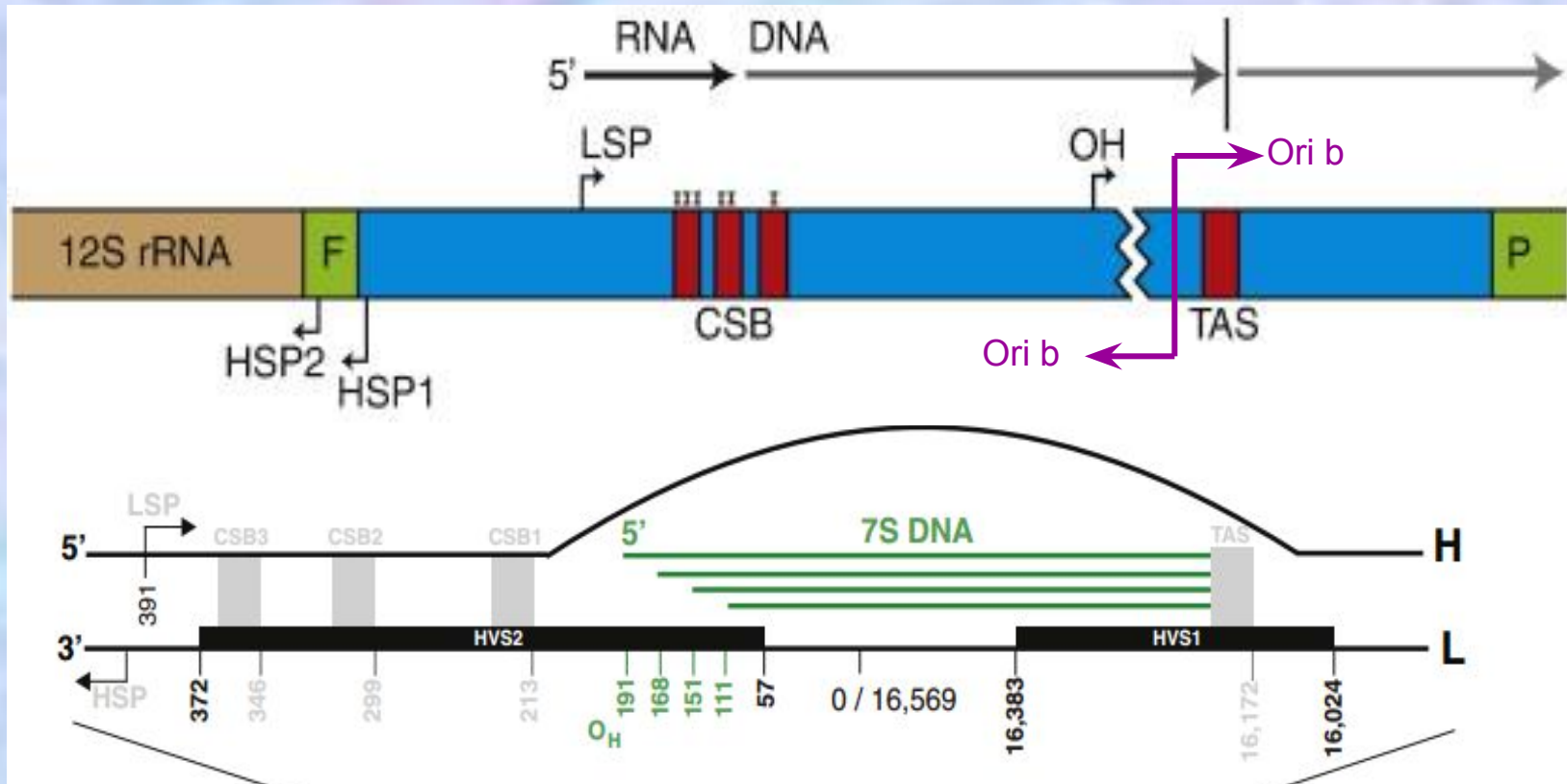
- Модели репликации мтДНК
- Ферменты репликации мтДНК

# Репликация мтДНК

- DNA pol – DNA pol  $\gamma$
- SSB (single strand DNA binding protein) - Mt SSB
- DNA helicase - TWINKLE
- Topoisomerases – 3 штуки
- RNA pol - POLRMT
- RNase - RNase H1

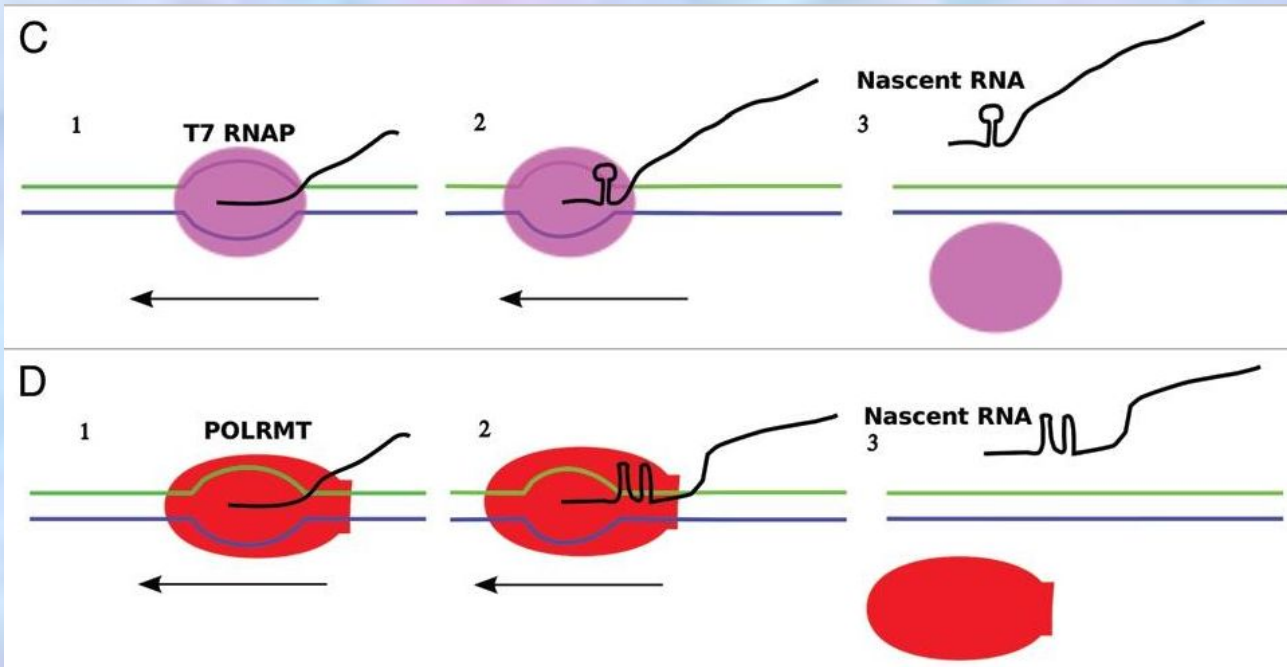


# Инициация репликации



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

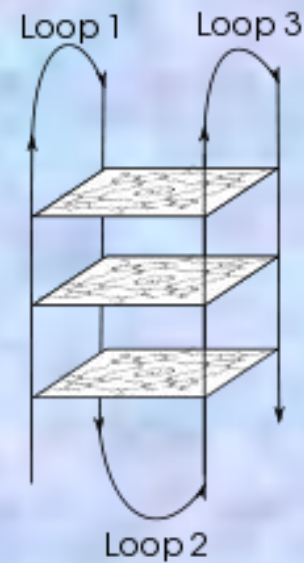
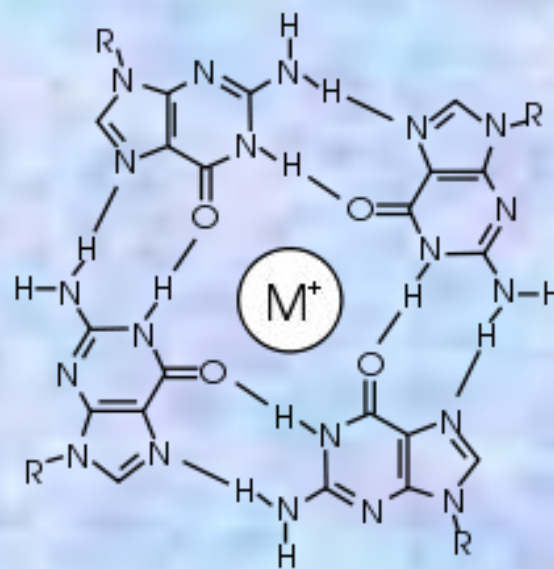
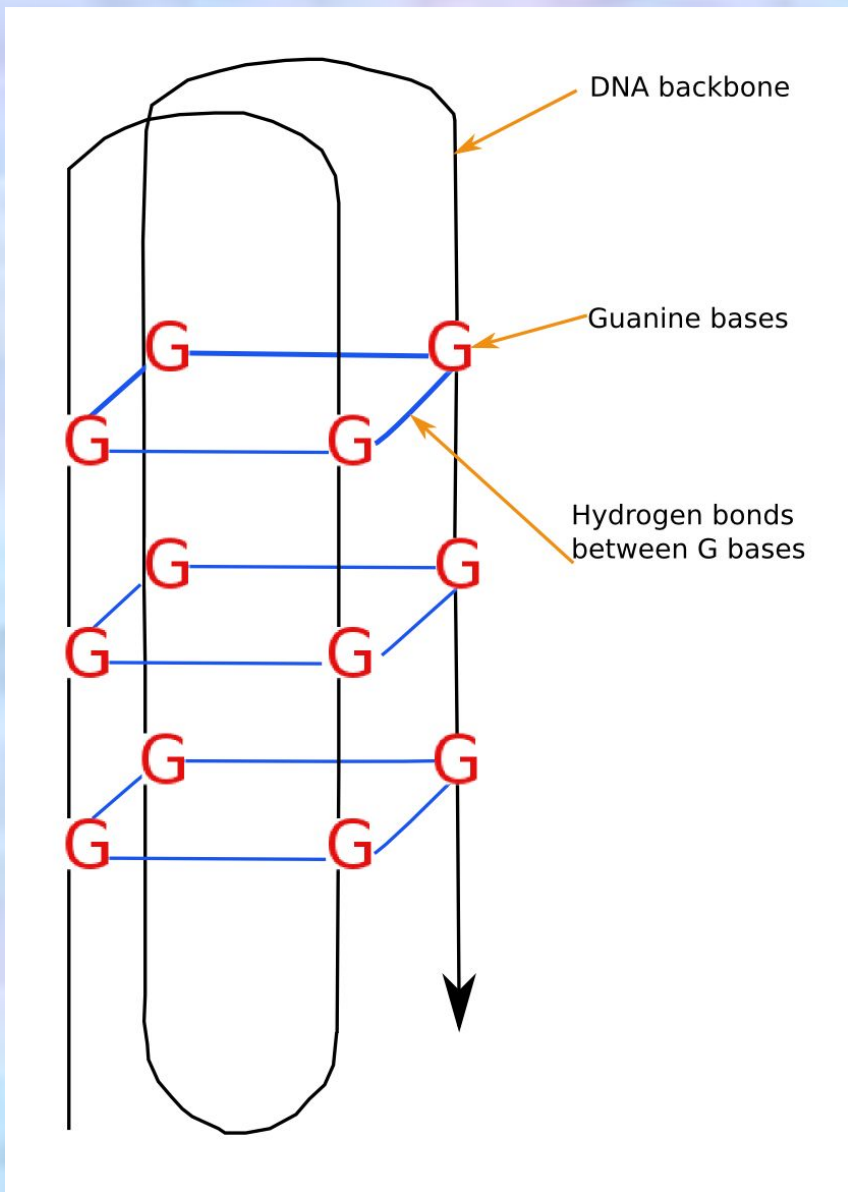
# Терминация транскрипции при синтезе праймеров для транскрипции POLRMT происходит за счет образования G-квадруплекса на РНК



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

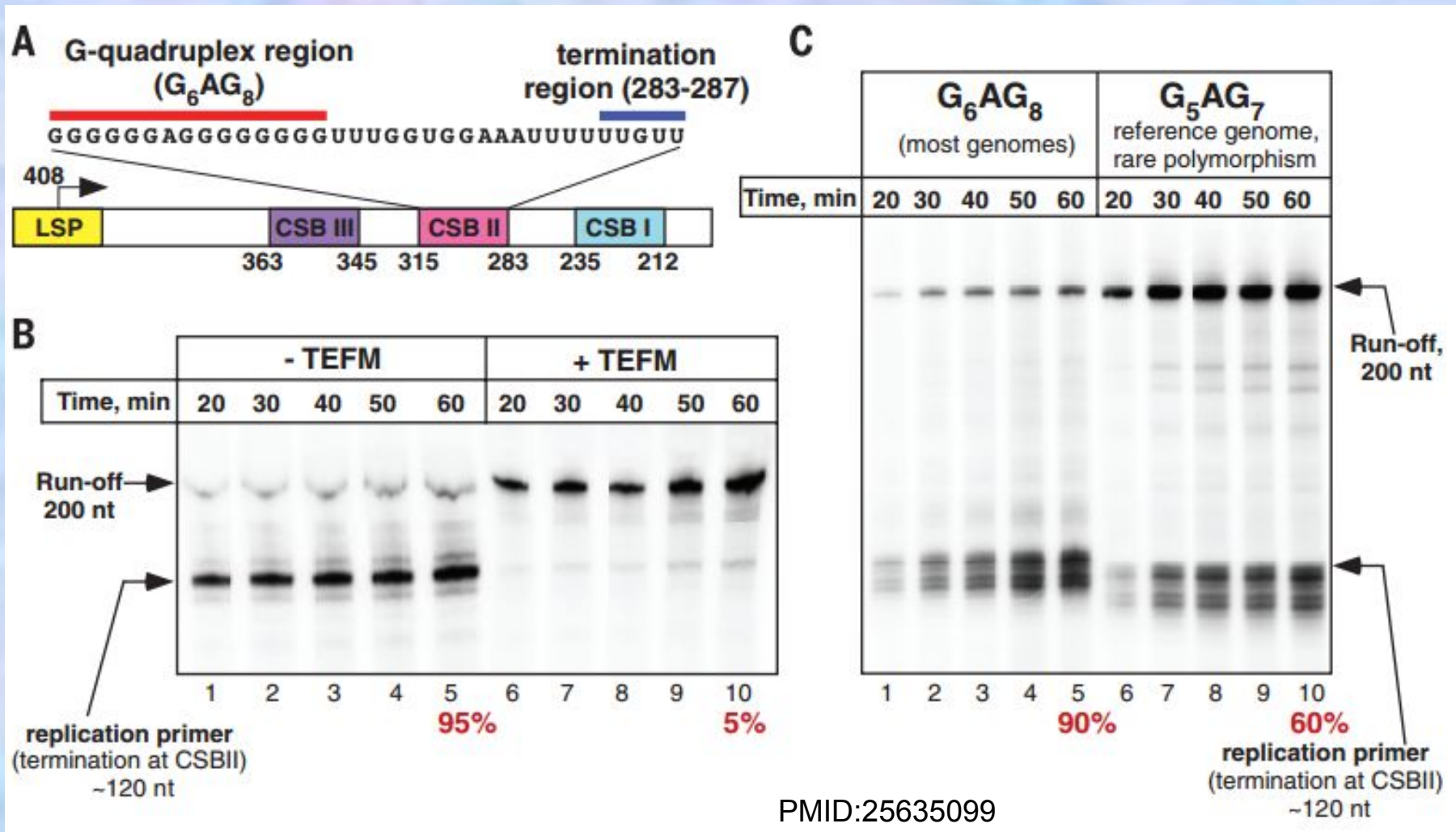
PMID: 21326908

# Структура G-квадруплекса

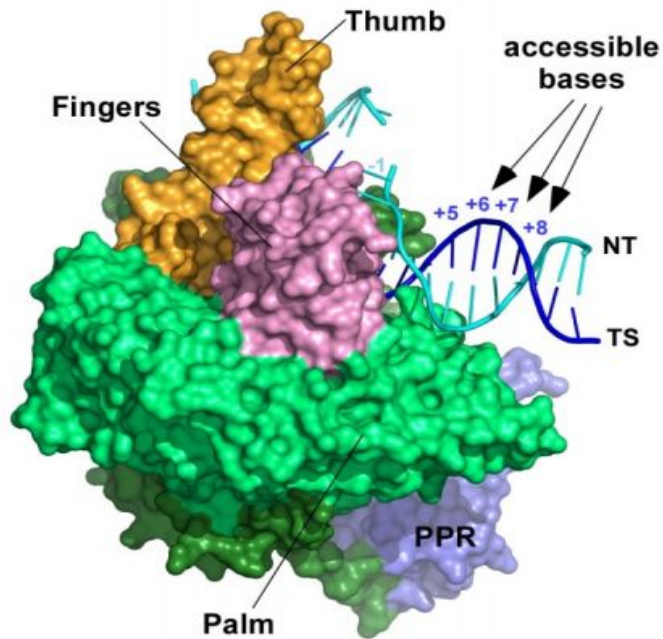


# TEFM (mitochondrial transcription elongation factor)

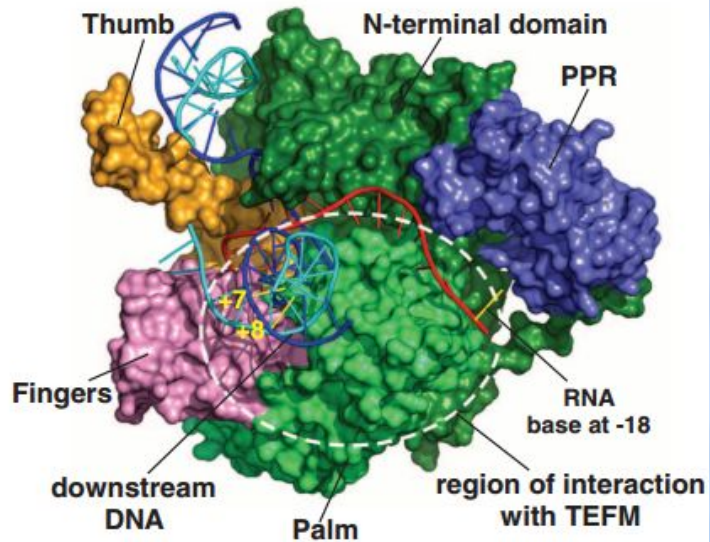
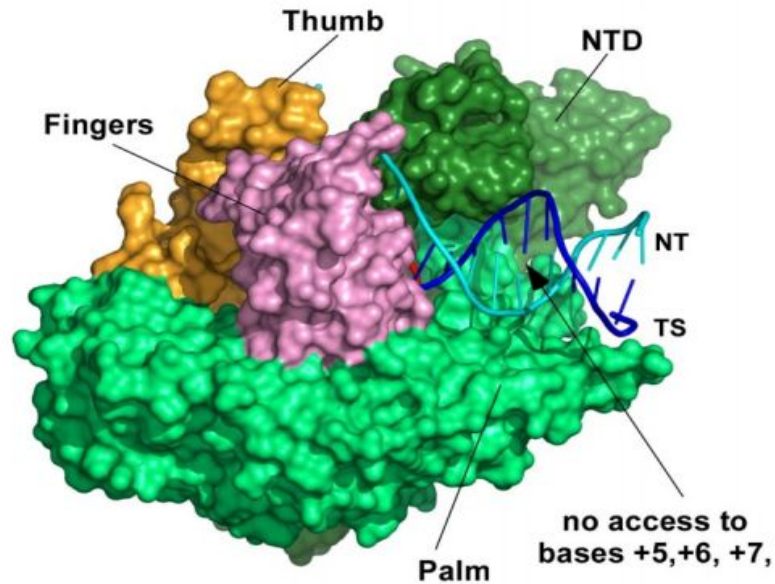
связывается с POLRMT и препятствует терминации транскрипции в области CSB II



## mtRNAP EC



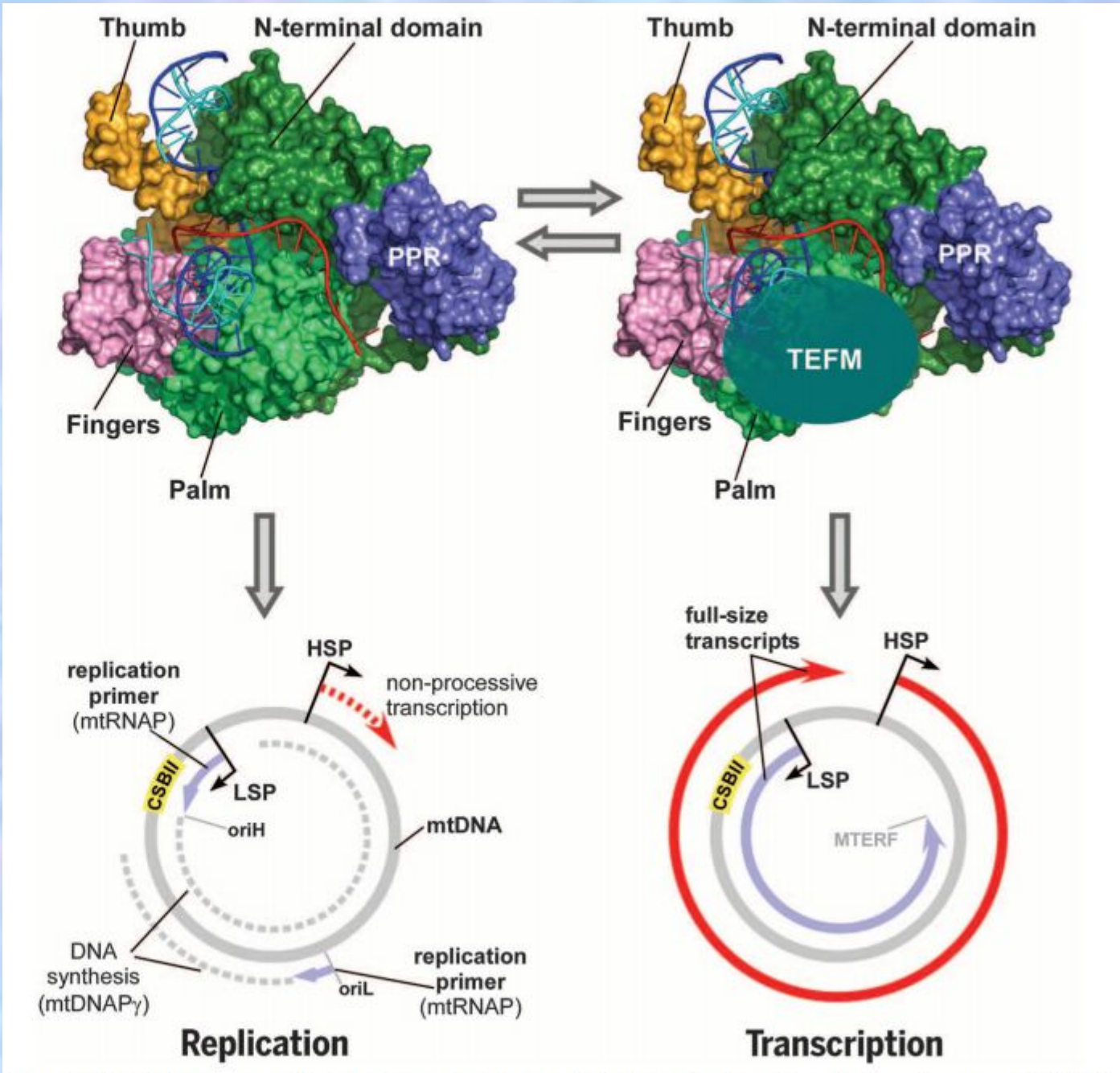
## T7 RNAP EC



TEFM взаимодействует со всеми компонентами транскрипционного комплекса:

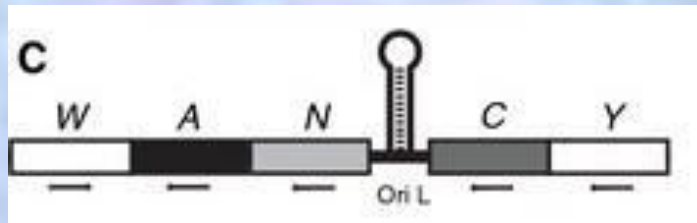
- с РНК
- с матрицей ДНК
- с POLRMT (с субдоменом palm вблизи домена PPR)

Это взаимодействие каким-то образом мешает образованию G-квадруплекса.<sup>7</sup>

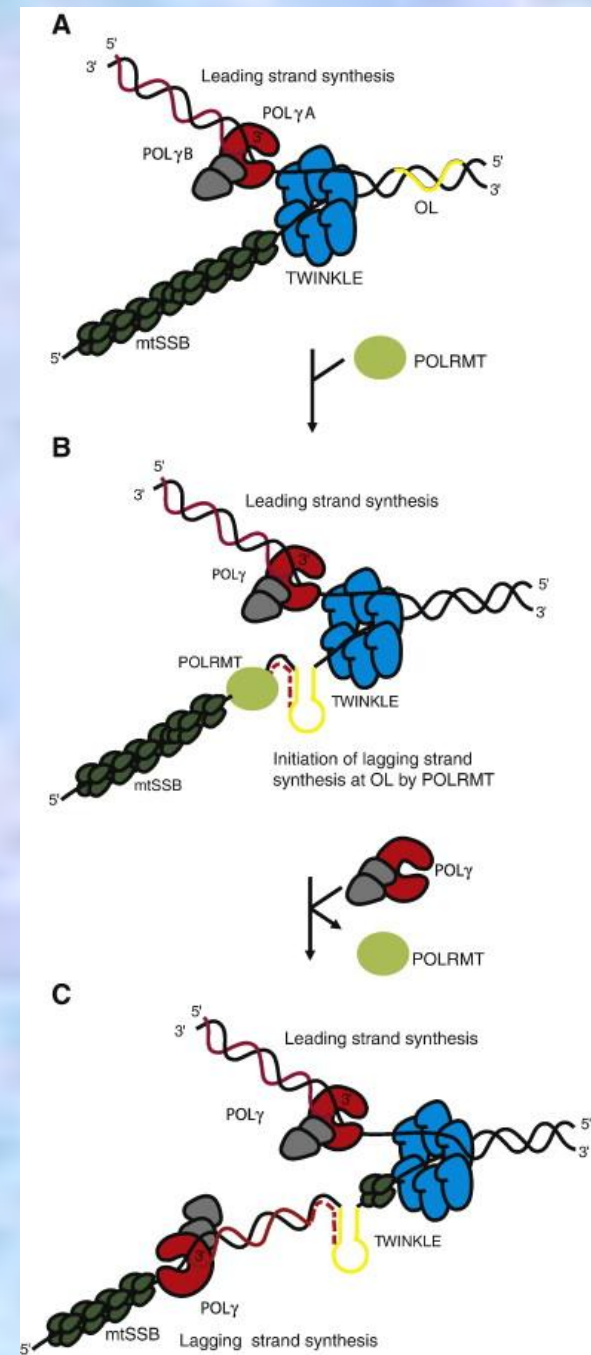


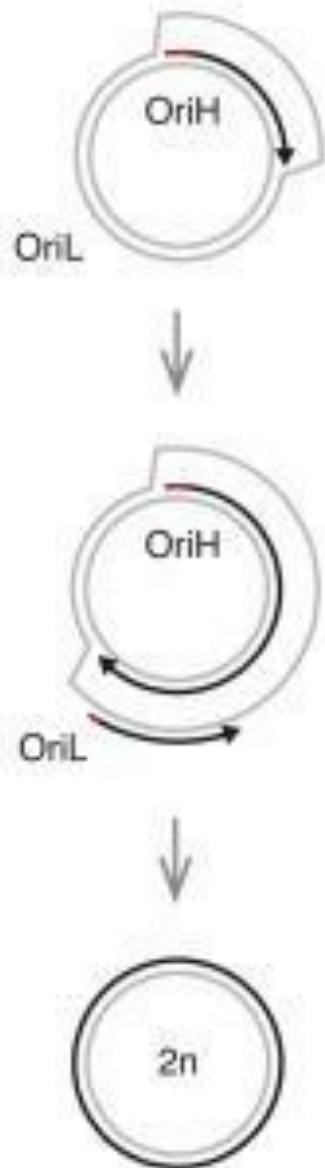


- на ORI L: POLRMT синтезирует праймер длиной около 25 нуклеотидов

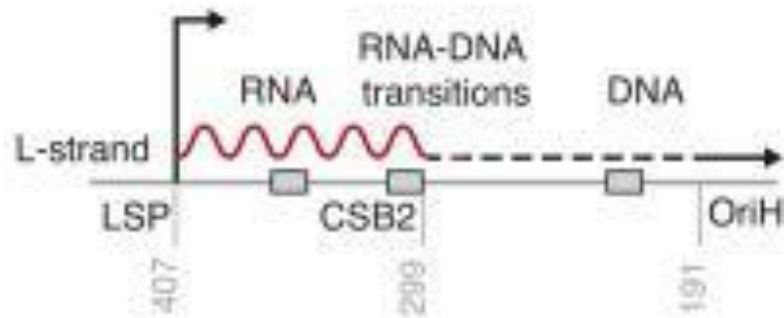


PMID: 20417176

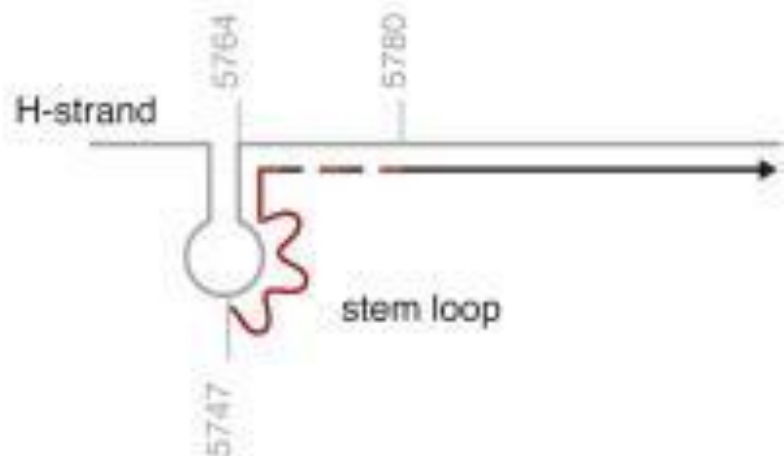


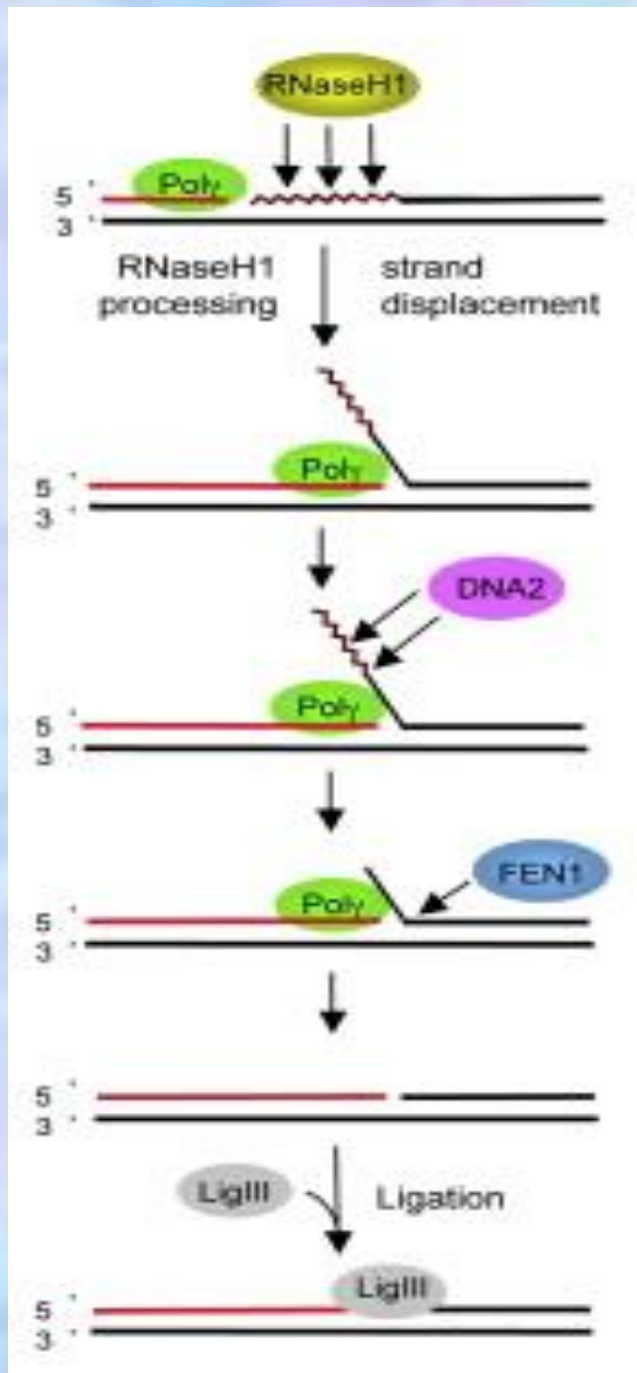
**A****B**

OriH priming:



OriL priming:





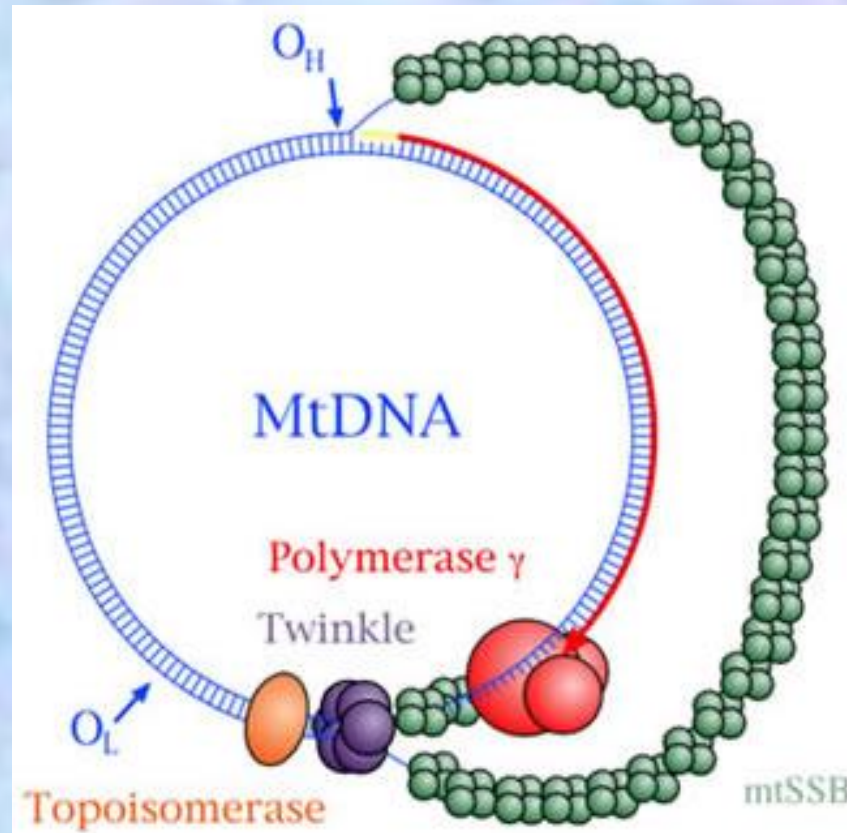
- В удалении РНК-затравок участвует РНКаза Н1.

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

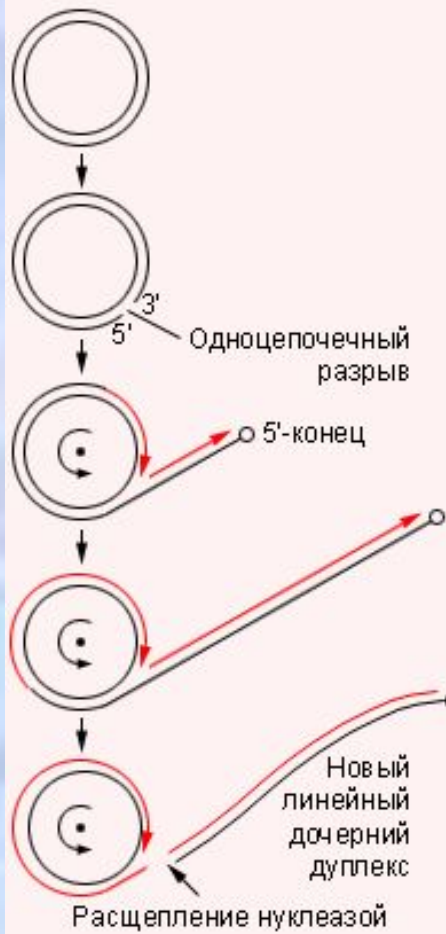
1. При репликации РНК-праймеры для ДНК-полимеразы  $\gamma$  синтезирует РНК-полимераза POLRMT.
2. На *ori* H синтез РНК-праймера начинается с LSP и терминируется в CSB II за счет образования G-квадруплекса.
3. Образованию квадруплекса препятствует белок TEFM – он является ключевым фактором в переключении с репликации на транскрипцию.
4. РНК-праймеры удаляются РНКазой H1 или, возможно, с участием хеликазы DNA2 и эндонуклеазы FEN1.

# Модели репликации мтДНК

Какую же модель репликации использует мтДНК?



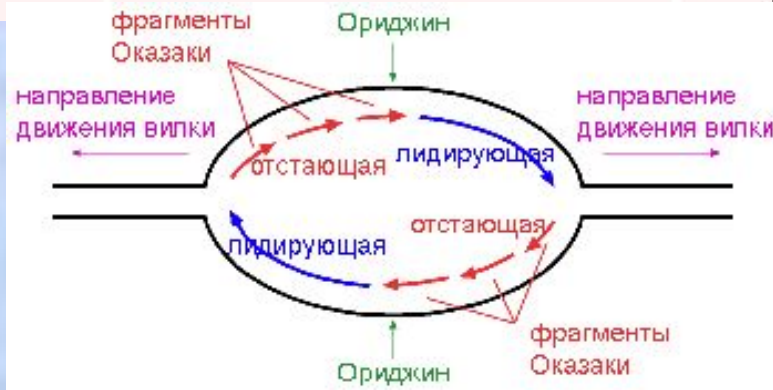
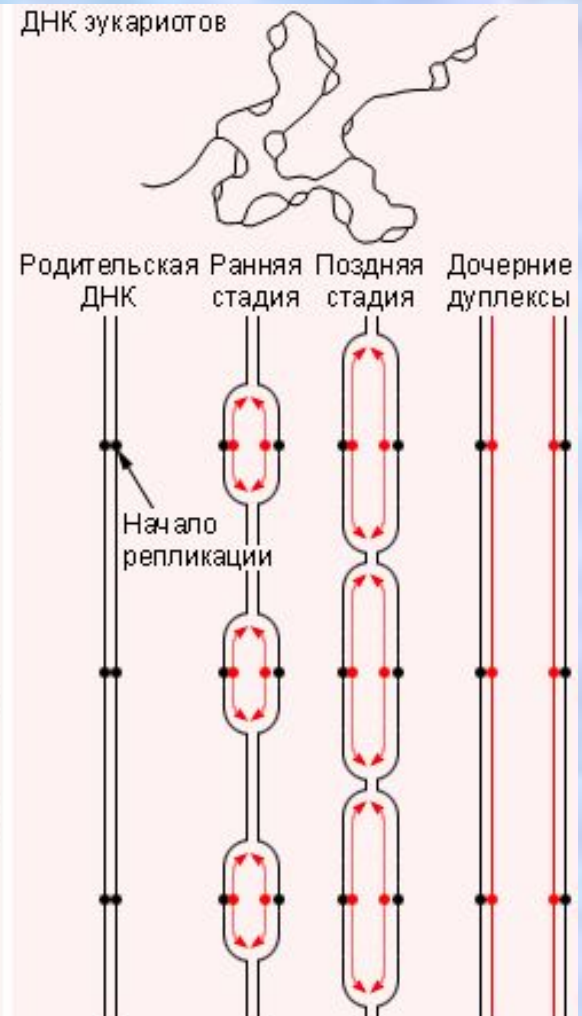
Кольцевая вирусная ДНК

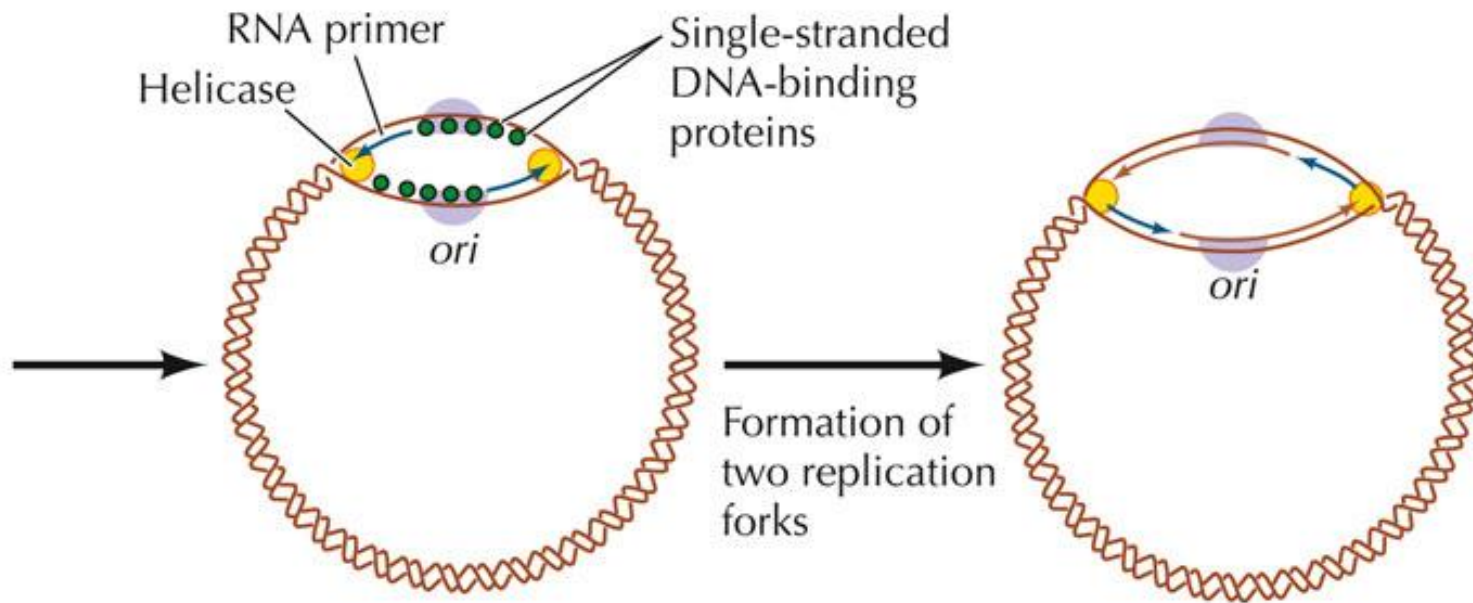
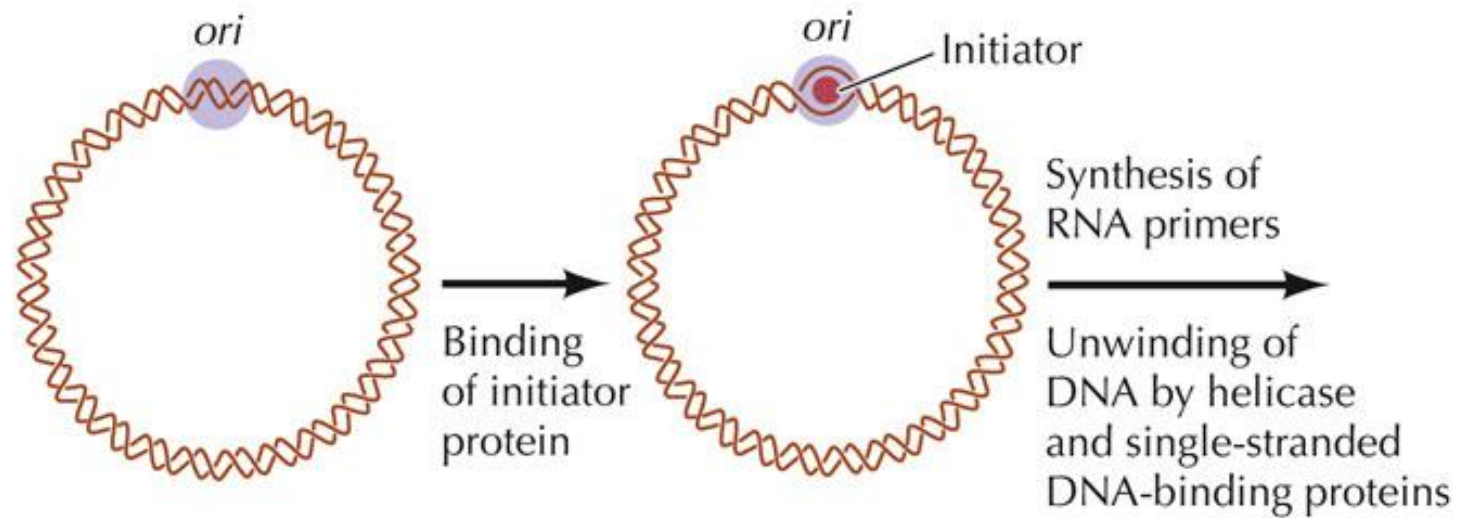


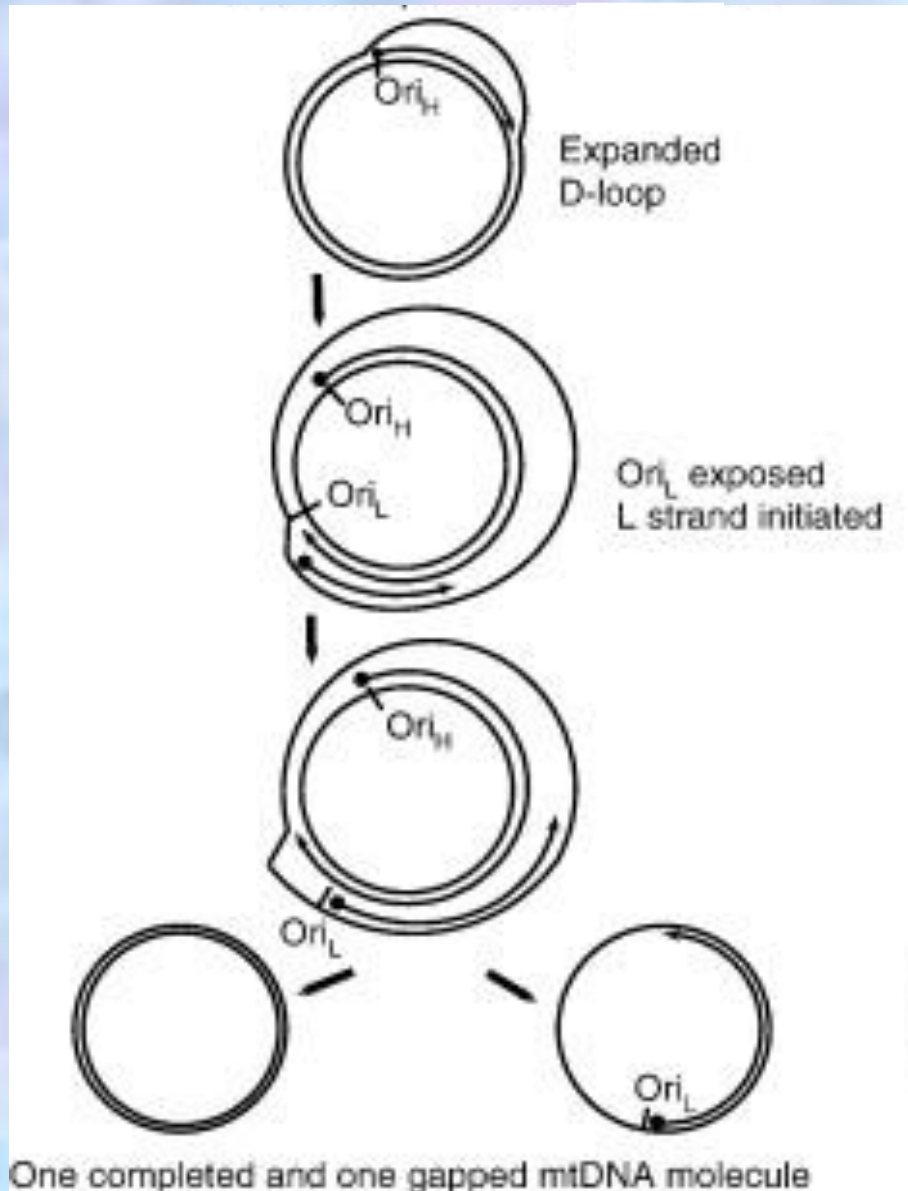
Кольцевая бактериальная ДНК



ДНК эукариотов



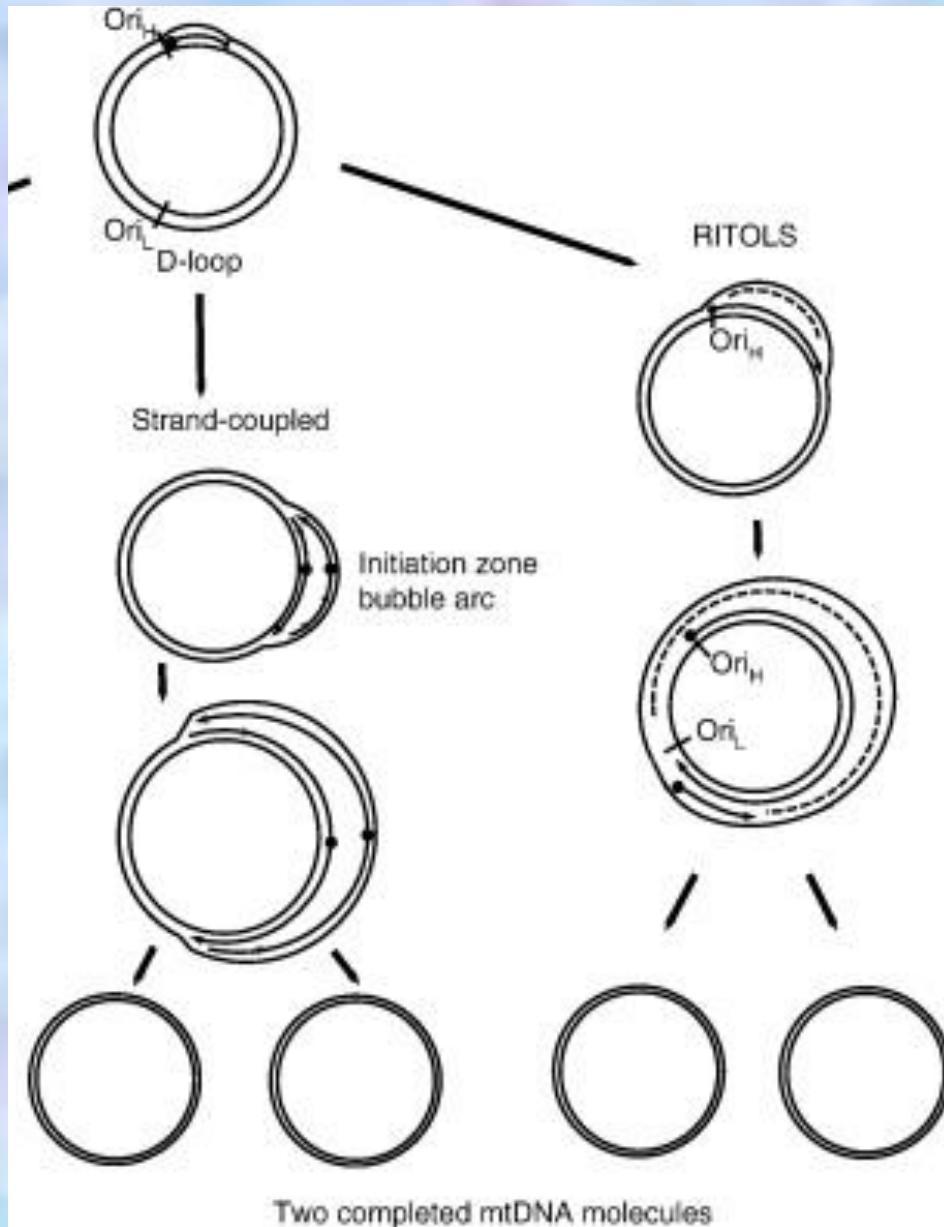




Первая модель репликации мт ДНК - Strand displacement model предложена в 1982 г. (Clayton D.A., 1982).

В ЭМ наблюдали структуры с протяженными оц участками, показана чувствительность продуктов репликации к нуклеазам, расщепляющим только оцДНК. Репликация начинается в  $Ori_H$  и  $Ori_L$ .





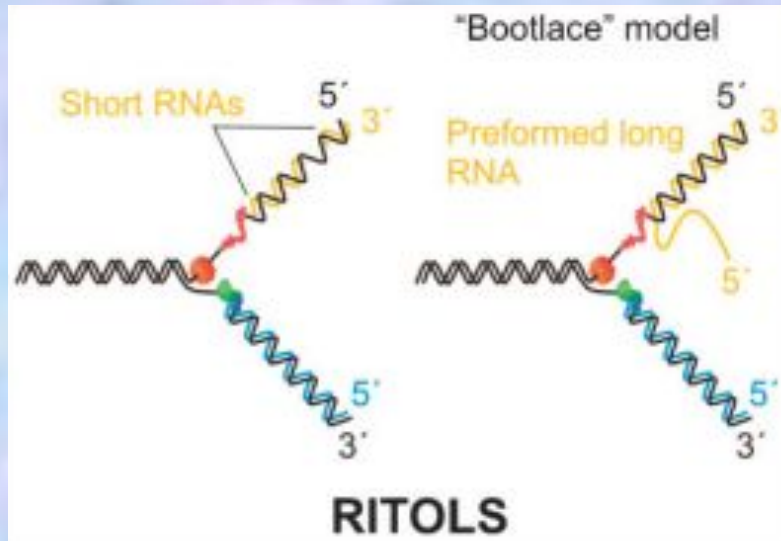
С развитием методов микроскопии и молекулярной биологии (двумерный электрофорез с разделением по размеру и конфигурации) было обнаружено, что среди промежуточных продуктов репликации есть тета-структуры. Найдены дополнительные ориджины репликации. Предложена модель Strand-coupled model (Yasukawa et al., 2005).

Показана чувствительность продуктов репликации к РНКазам и выделены ДНК-РНК гибриды.

Предложена модель RITOLS. (Yasukawa et al., 2006).

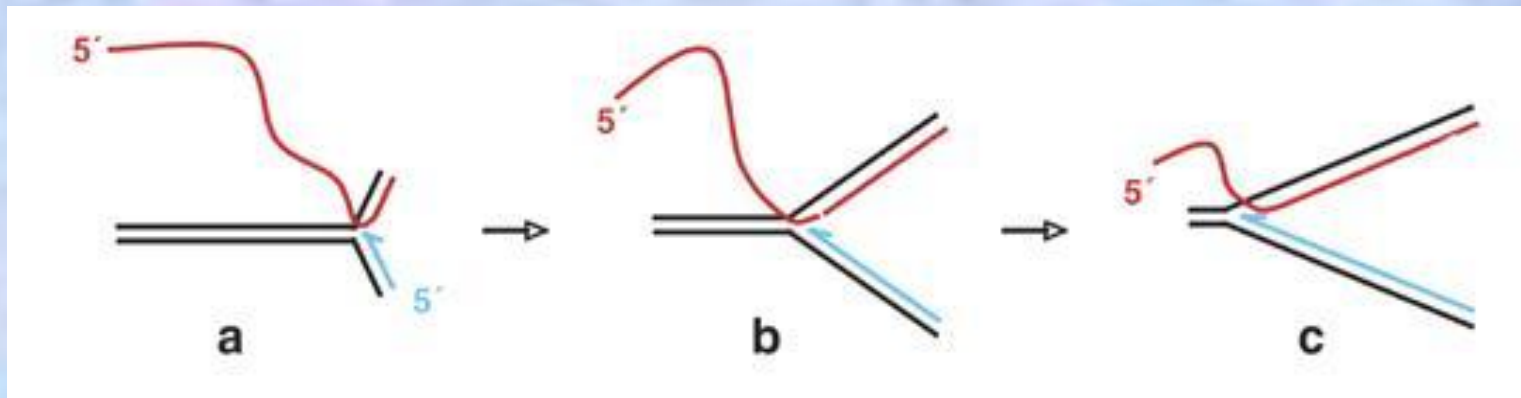


# RITOLS (RNA Incorporated Through Out Lagging Strand)



Как образуется РНК?

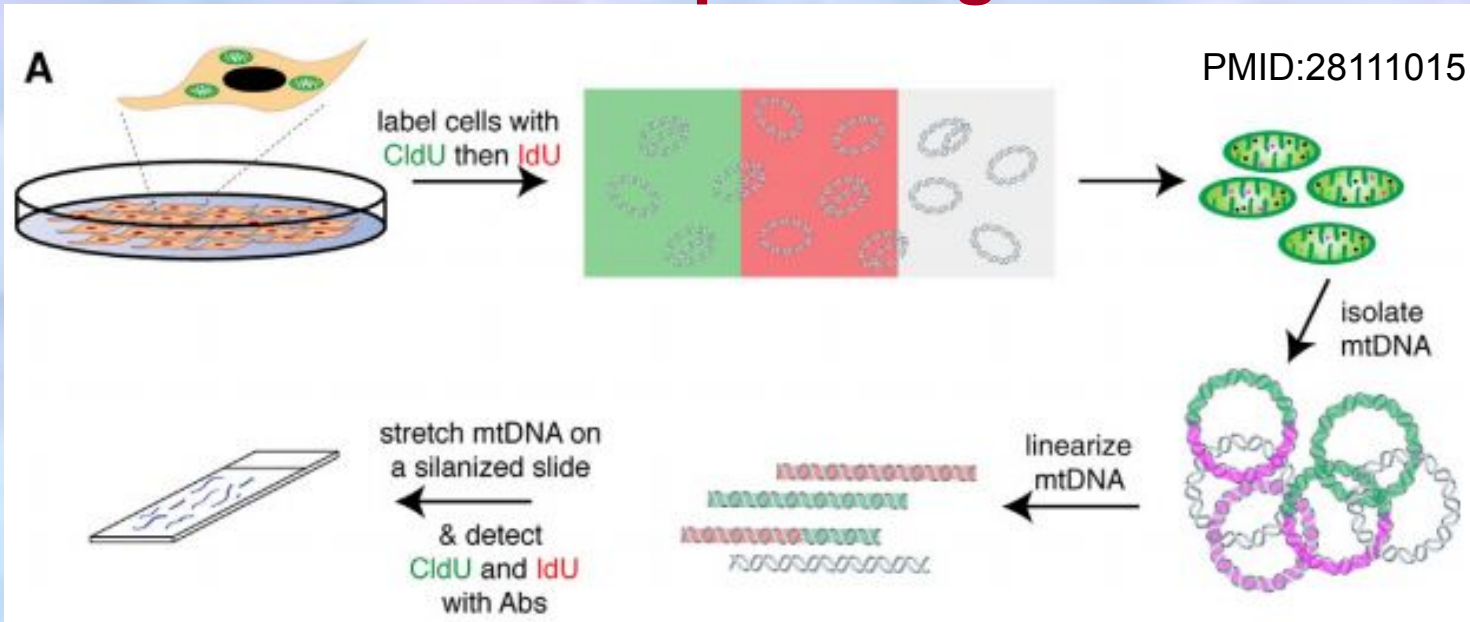
- Синтезируется как РНК-праймер
- Ранее образованная РНК продевается через репликативный комплекс, гибридизуясь с материнской цепью ДНК



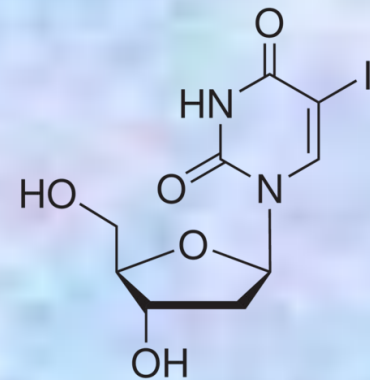
## 1. Существует 3 модели репликации мтДНК:

- Strand displacement model – однонаправленный ассиметричный синтез с Ori<sub>H</sub>, затем синтез второй цепи с Ori<sub>L</sub>. Вероятно, происходит редко.
- Strand-coupled model - двунаправленный синтез с образованием  $\theta$ -структур.
- RITOLS – отстающая цепь синтезируется в виде РНК, которая затем заменяется на ДНК.

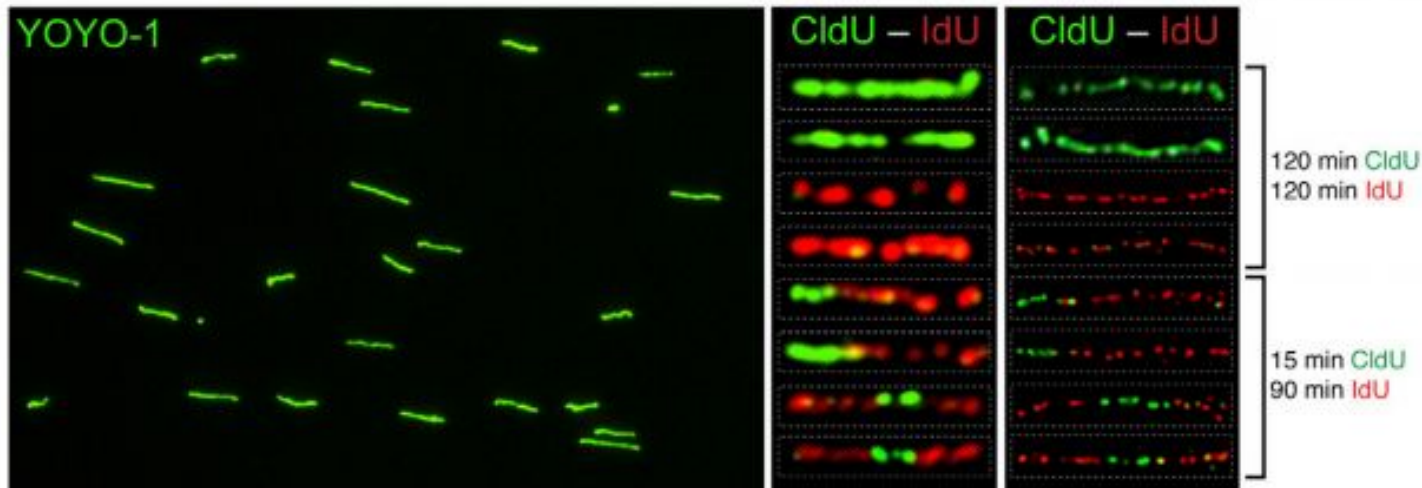
# Mito-SMARD: Single-Molecule Analysis of Replicating mtDNA



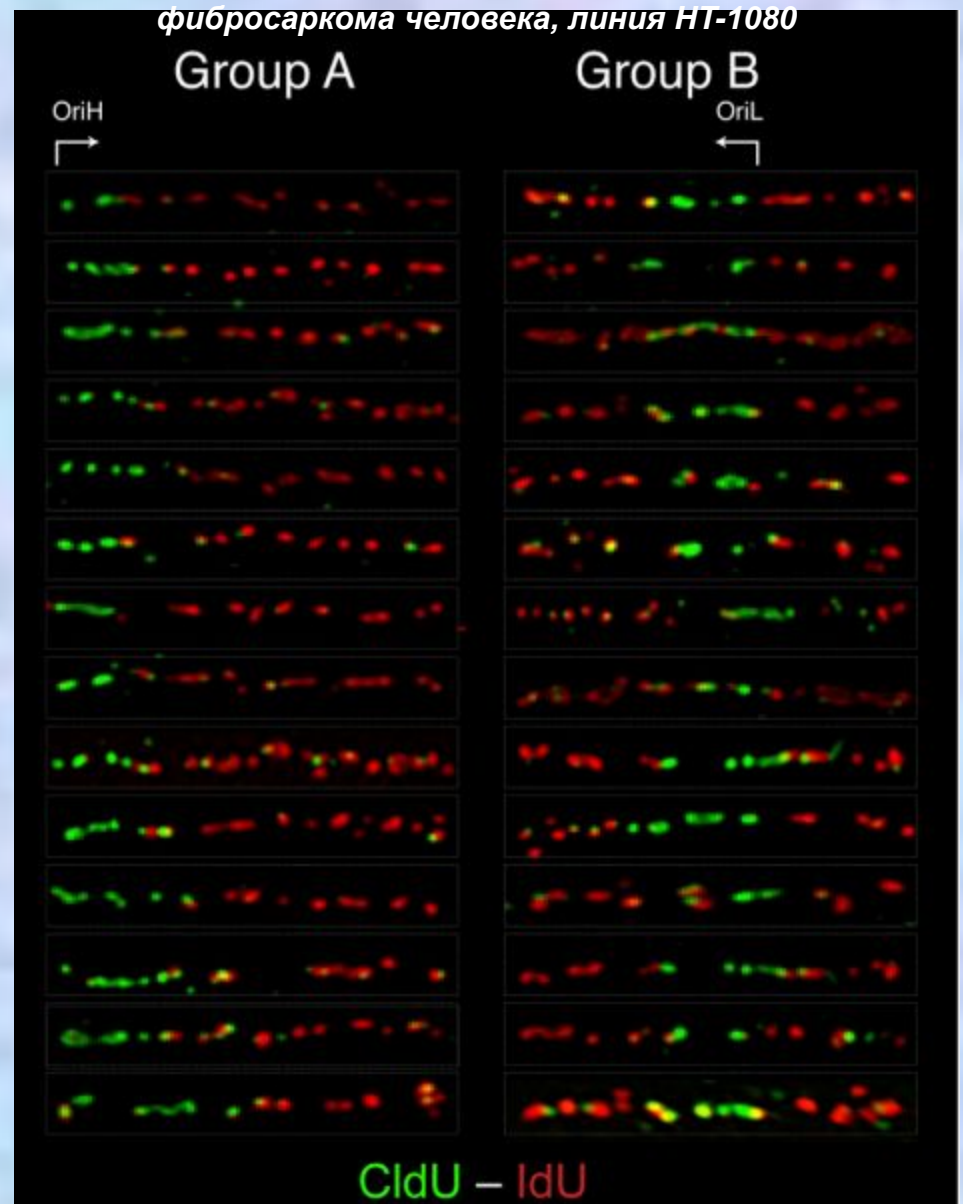
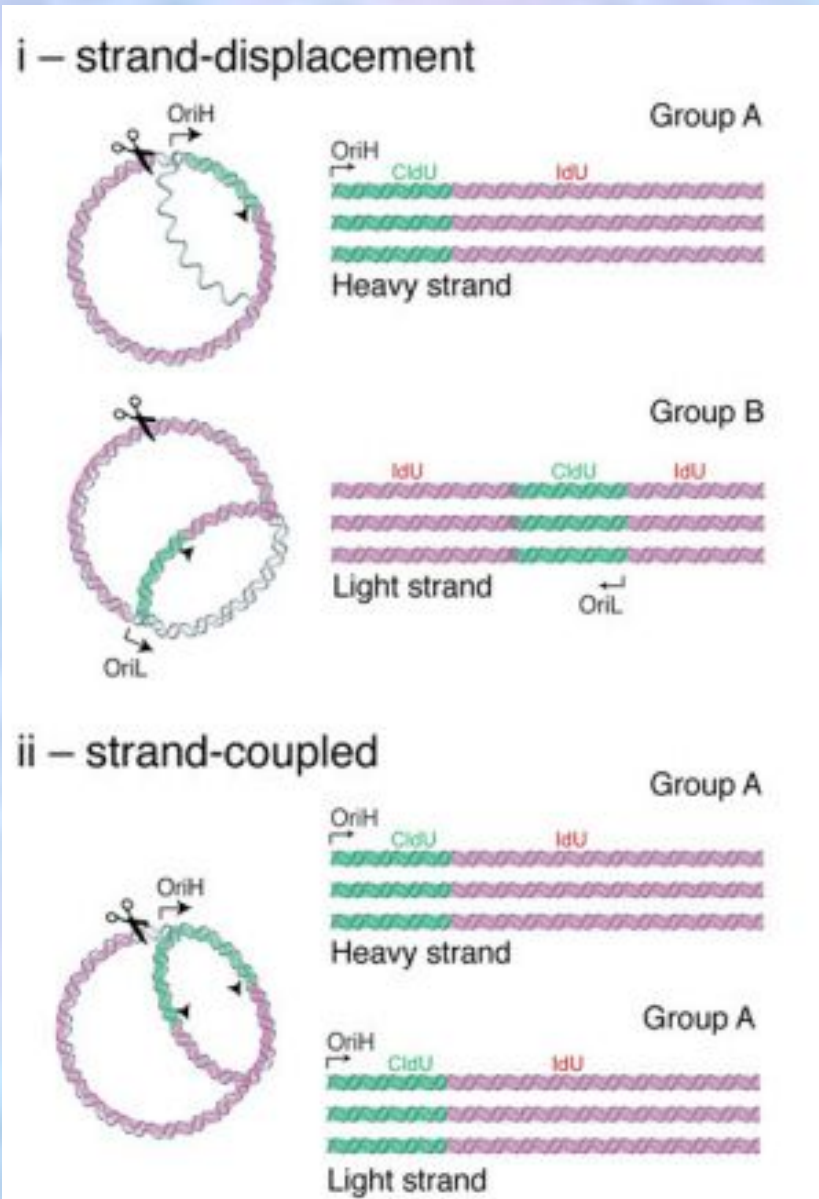
[IdU] - 5-Iodo-2'-deoxyuridine



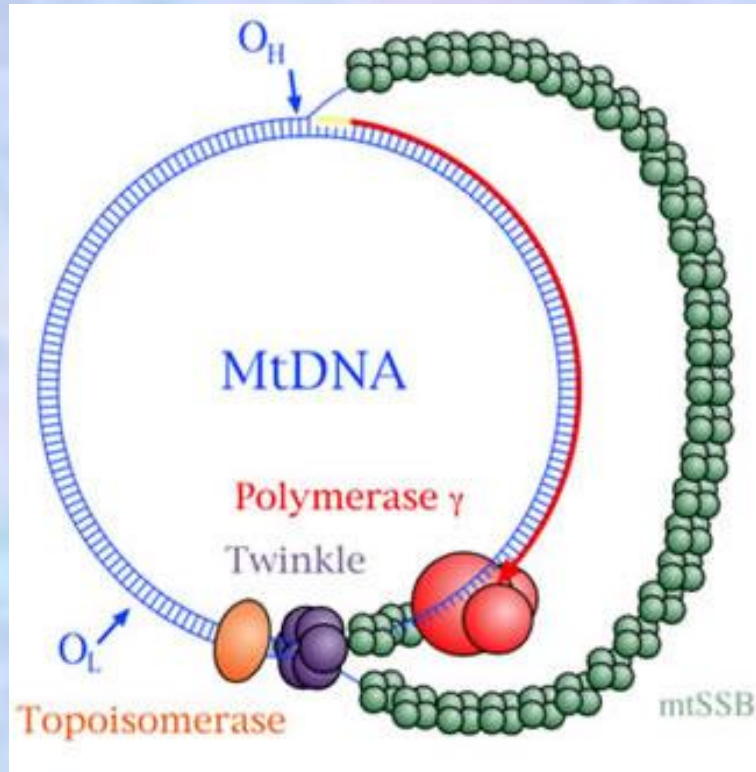
[CldU]- 5-Chloro-2'-deoxyuridine



# Mito-SMARD указывает на модель репликации Strand Displacement

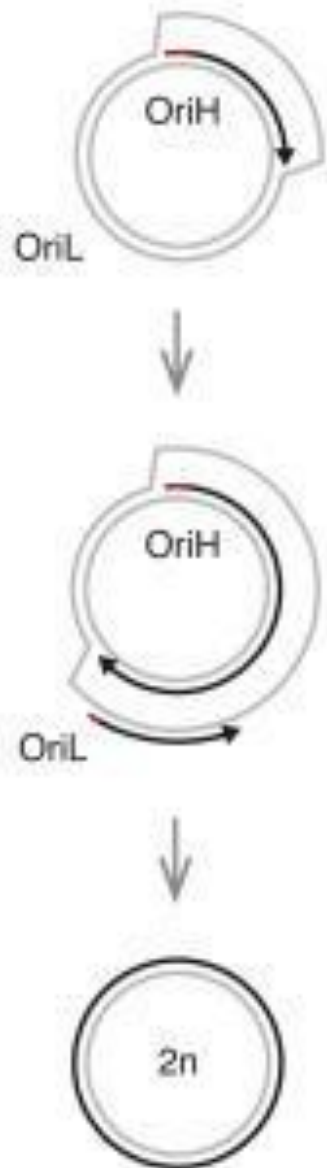


# Ферменты репликации мтДНК

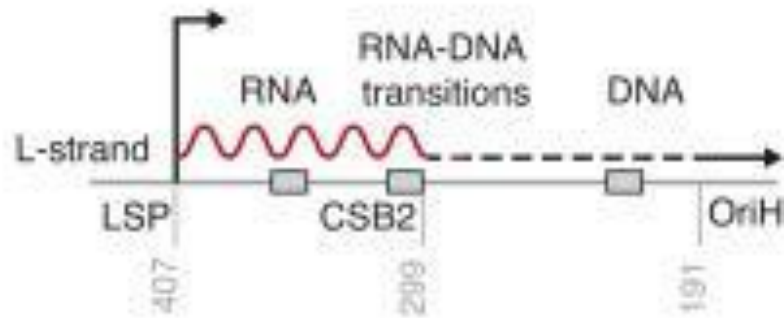


<http://www.niehs.nih.gov/research/atniehs/abs/lmg/mdnar/index.cfm>

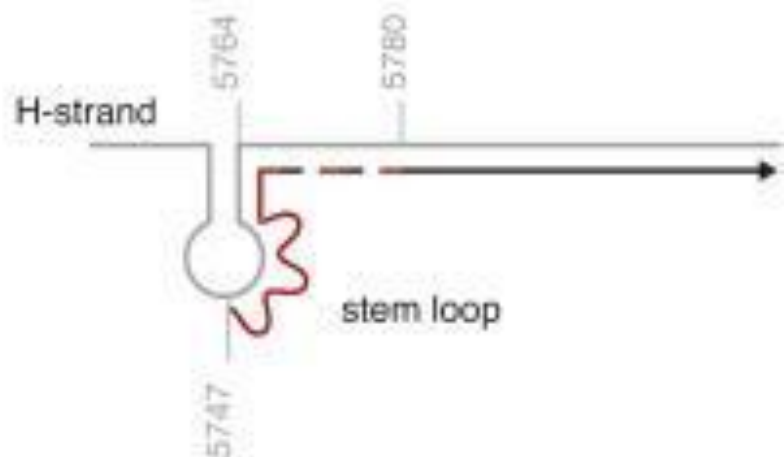
- DNA pol  $\gamma$
- Mt SSB – single strand DNA binding protein
- Mt DNA helicase TWINKLE
- Topoisomerases
- RNase H1
- Ligase III

**A****B**

OriH priming:



OriL priming:





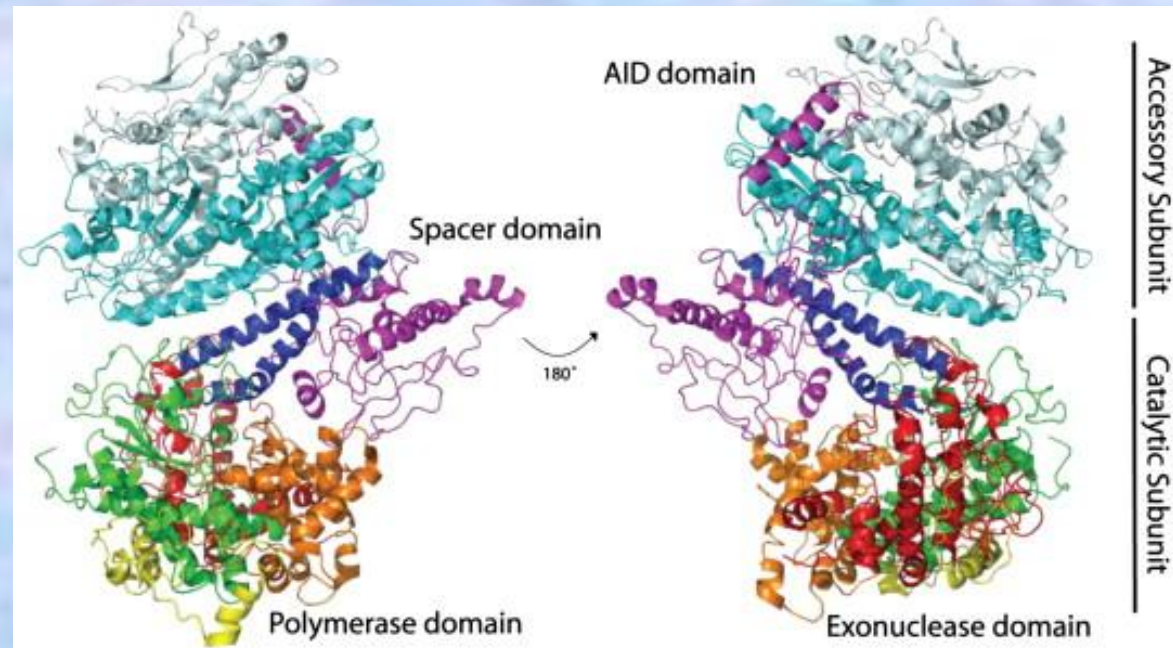
# ДНК полимераза $\gamma$ .

Каталитическая субъединица - 140 кДа (ген POLG):

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

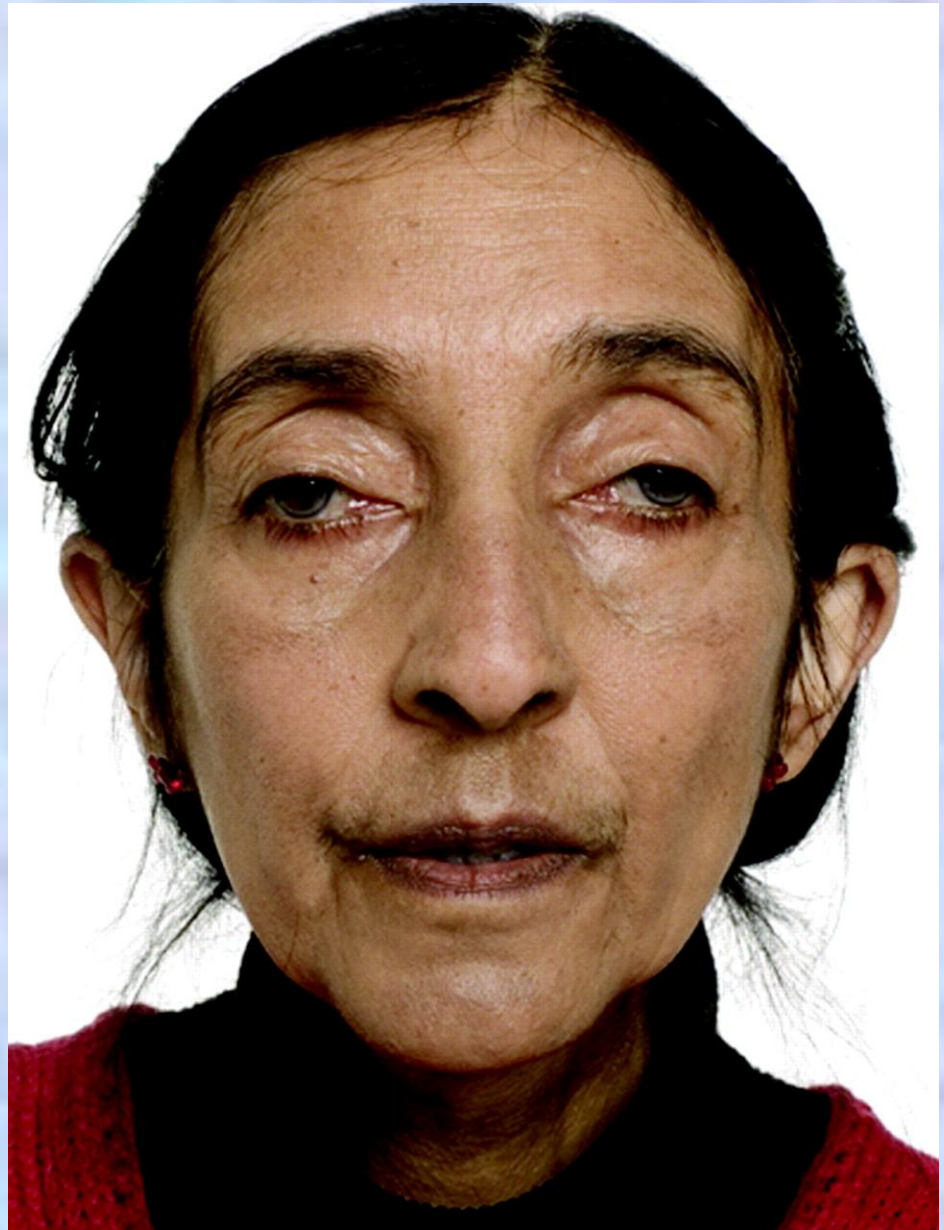
## Дополнительные субъединицы -

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



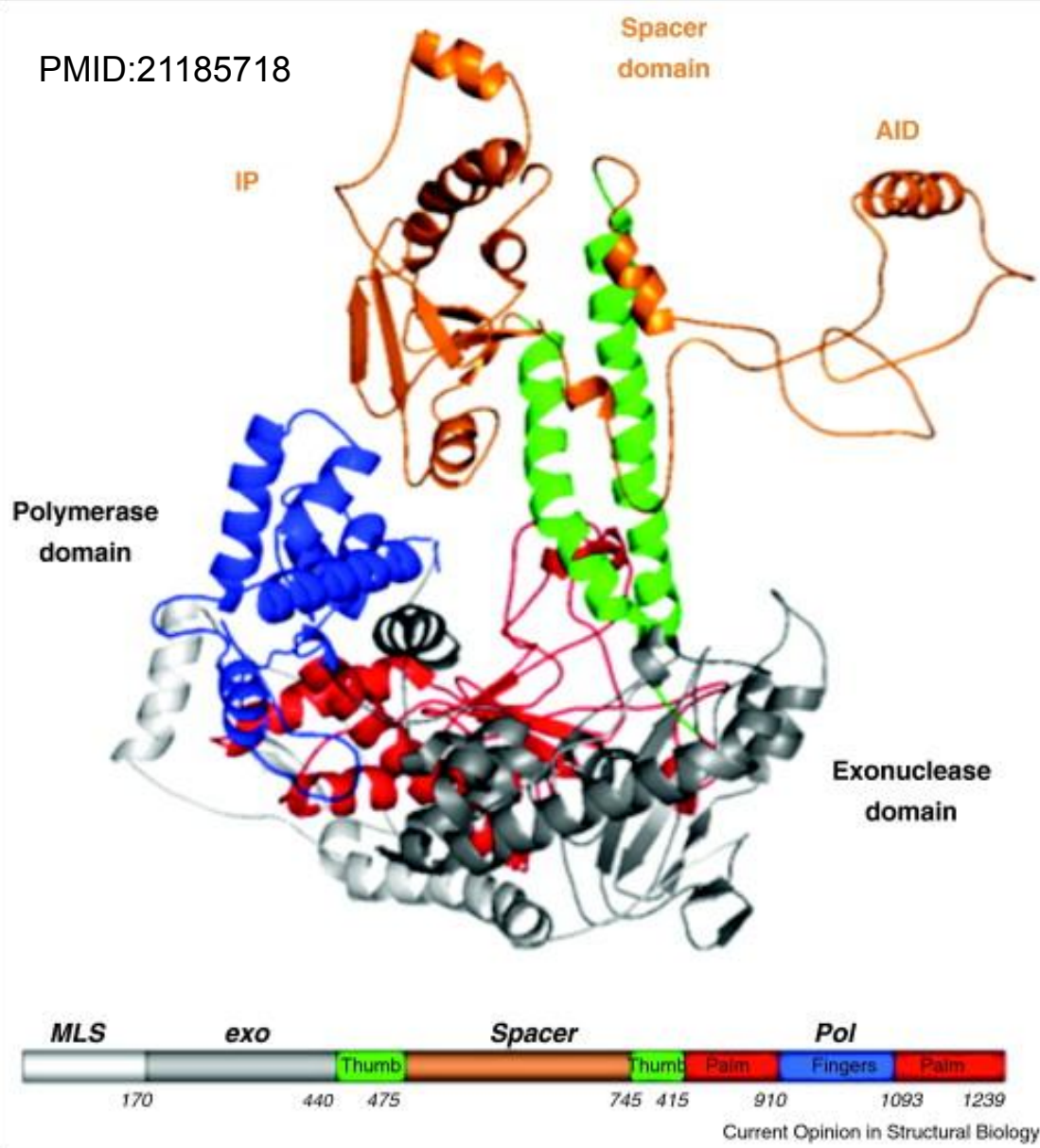
Хроническая  
прогрессирующая  
офтальмоплегия  
(СРЕО) –

результат мутаций  
в генах POLG и  
POLG2.



# Каталитическая субъединица

PMID:21185718



• N-концевой экзонуклеазный домен

• C-концевой полимеразный домен

• Спейсер:

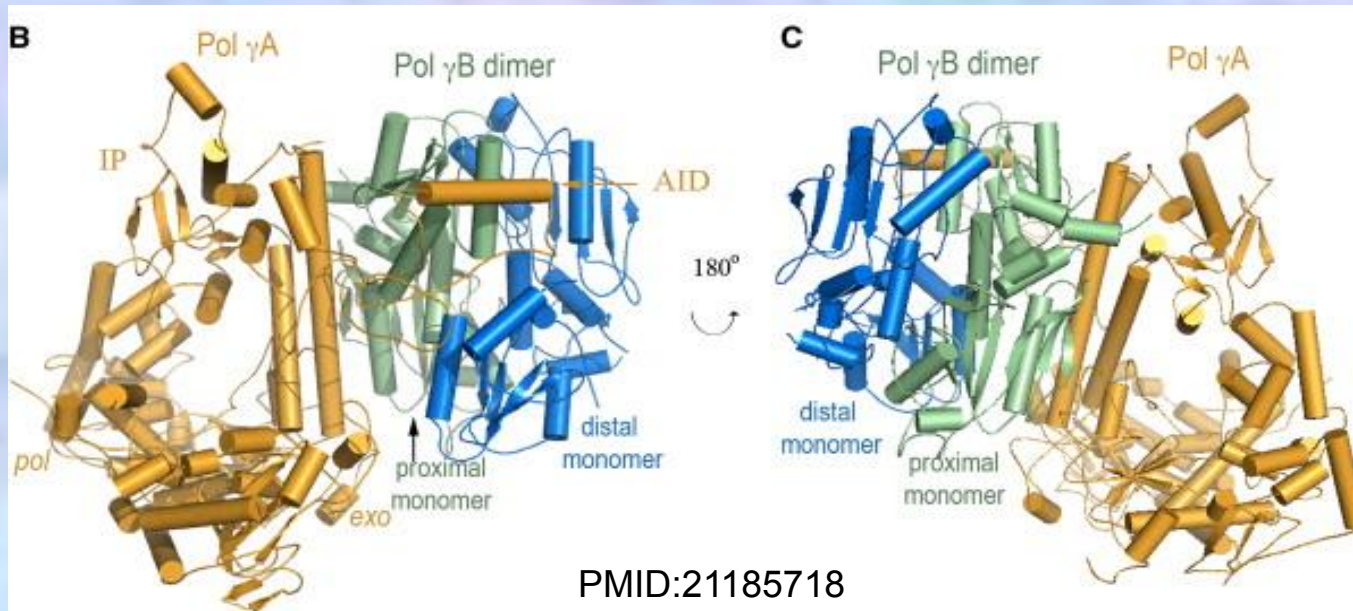
2 субдомена –

1. IP (intrinsic processivity)

2. AID (accessory-interacting determinant)

Организмы, у которых его нет, лишены и дополнительных субъединиц.

# Дополнительные субъединицы



Мономеры р55 имеют разные функции:

1) Проксимальная - ↑ аффинность связывания с ДНК

2) Дистальная – увеличивает скорость полимеразной реакции. Связан с р140 двумя остатками

Glu394 → Arg 232 p140

Arg122 → Gln540 p140

# 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.

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.

DNA pol γ способна проходить рибонуклеотиды при репликации, т.к. она обладает активностью обратной транскриптазы.

Но на этих нуклеотидах происходит задержка фермента.

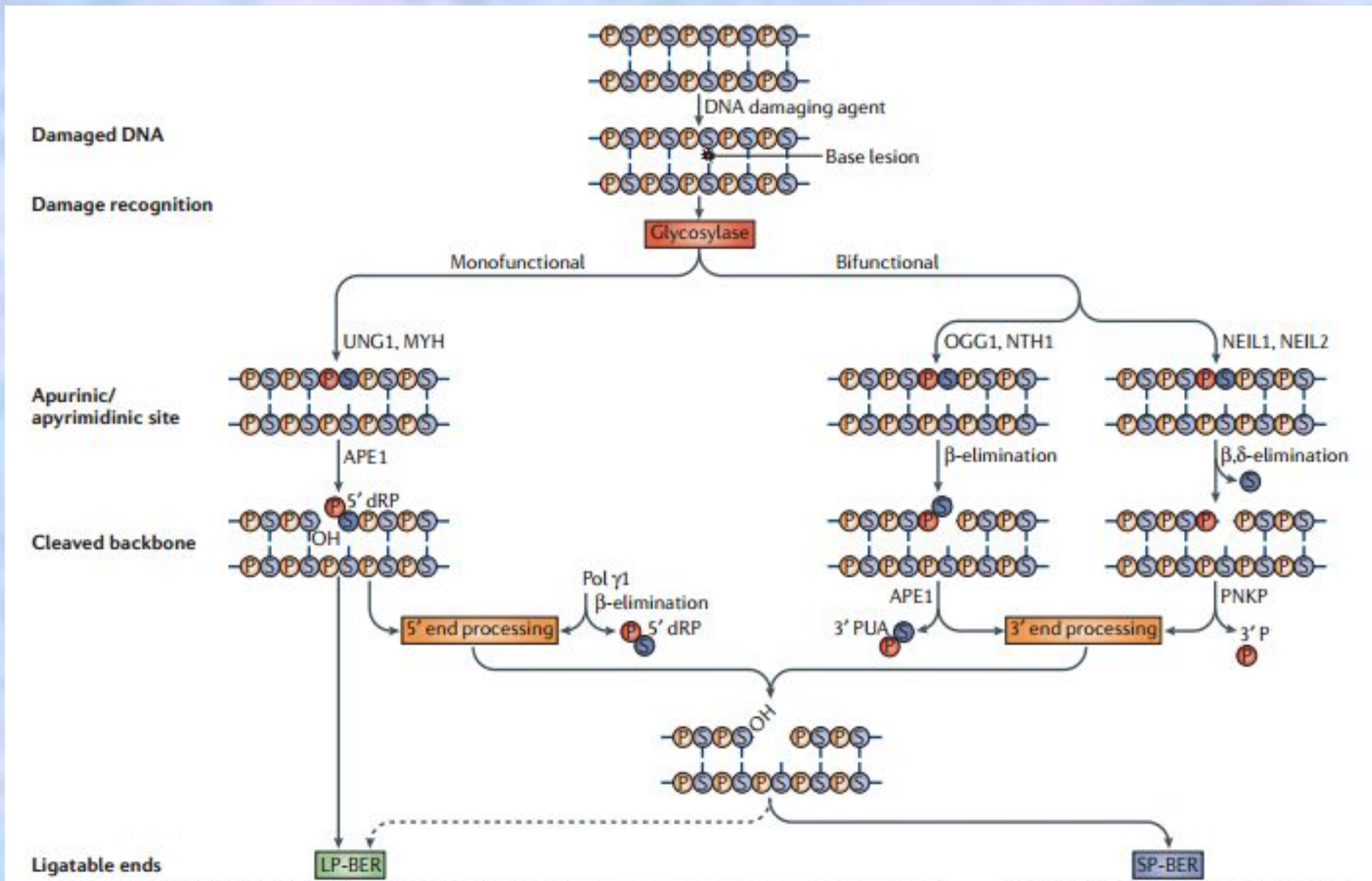
Эффективность прохождения единичных рибонуклеотидов на матрице ДНК 51% в сравнении со 100% на матрице ДНК без вставок.

Матрице с протяженными вставками рибонуклеотидов проходятся еще менее эффективно:

4 рибонуклеотида – 29%

8 рибонуклеотидов – 14%

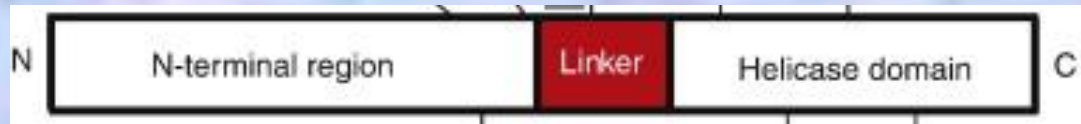
# 5' → 3' дезоксирибофосфат лиазная активность ДНК полимеразы $\gamma$



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

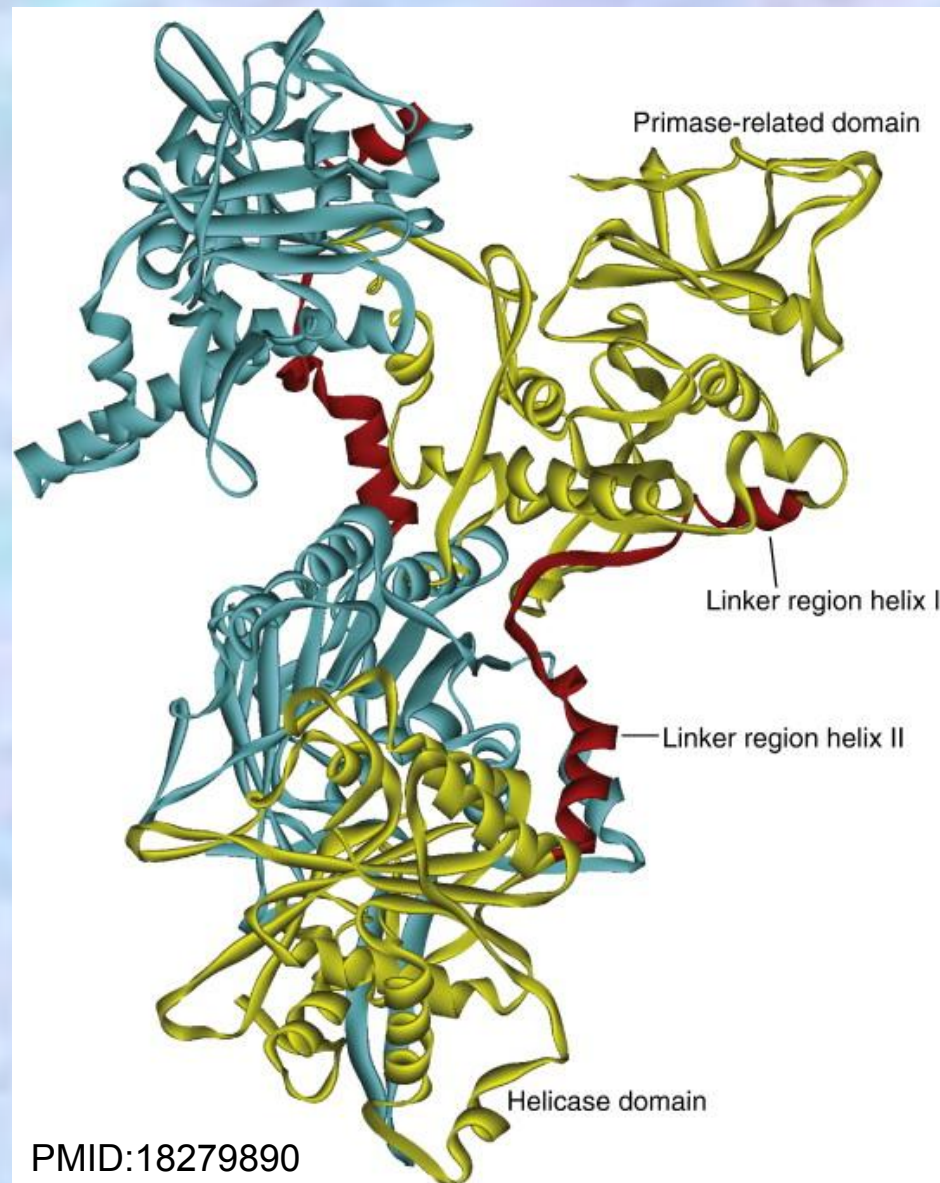


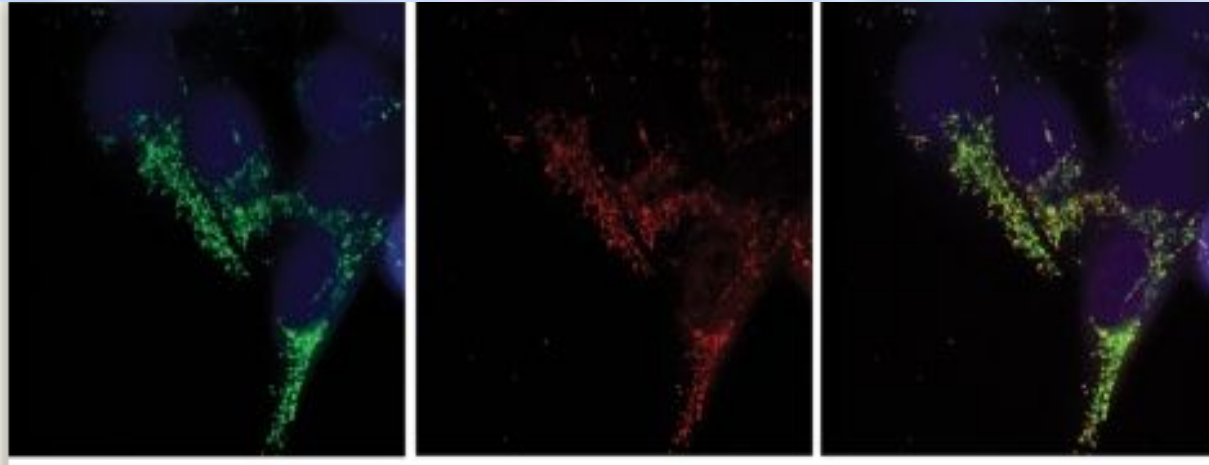
PMID: 20417176

- 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.

Модель димера TWINKLE: один мономер выделен желтым, другой – голубым. Линкер каждого мономера выделен красным.





## TWINKLE

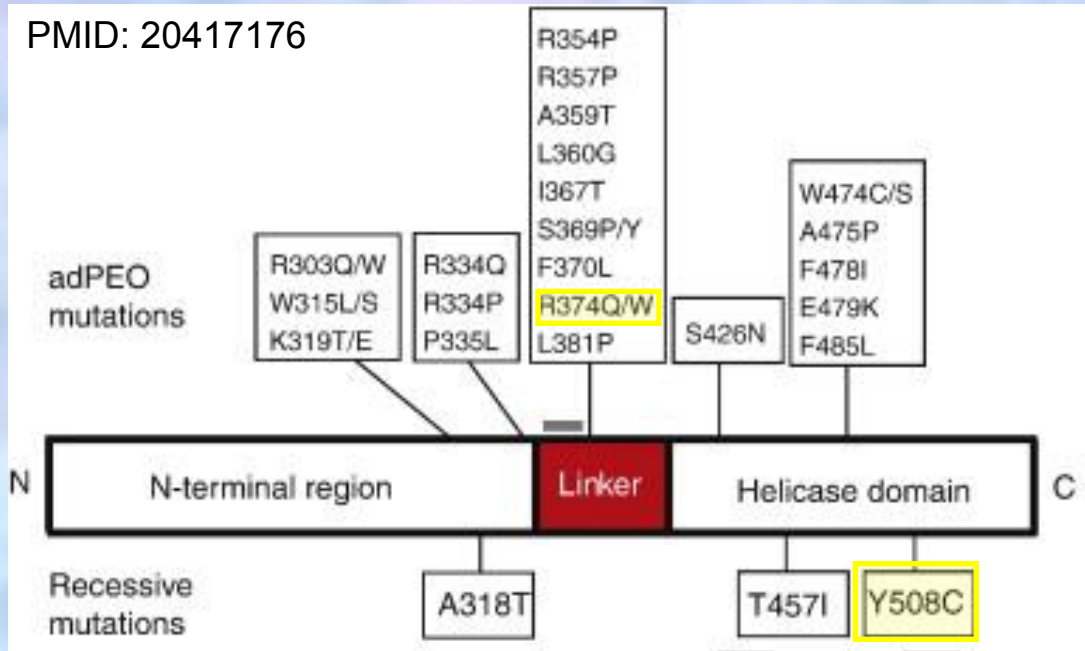
колоколизована с мтДНК в нуклеоидах: при иммунофлуоресцентном анализе окрашиваются пятна, напоминающие мерцающие звезды.

PMID:18971204

- 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.

PMID: 20417176

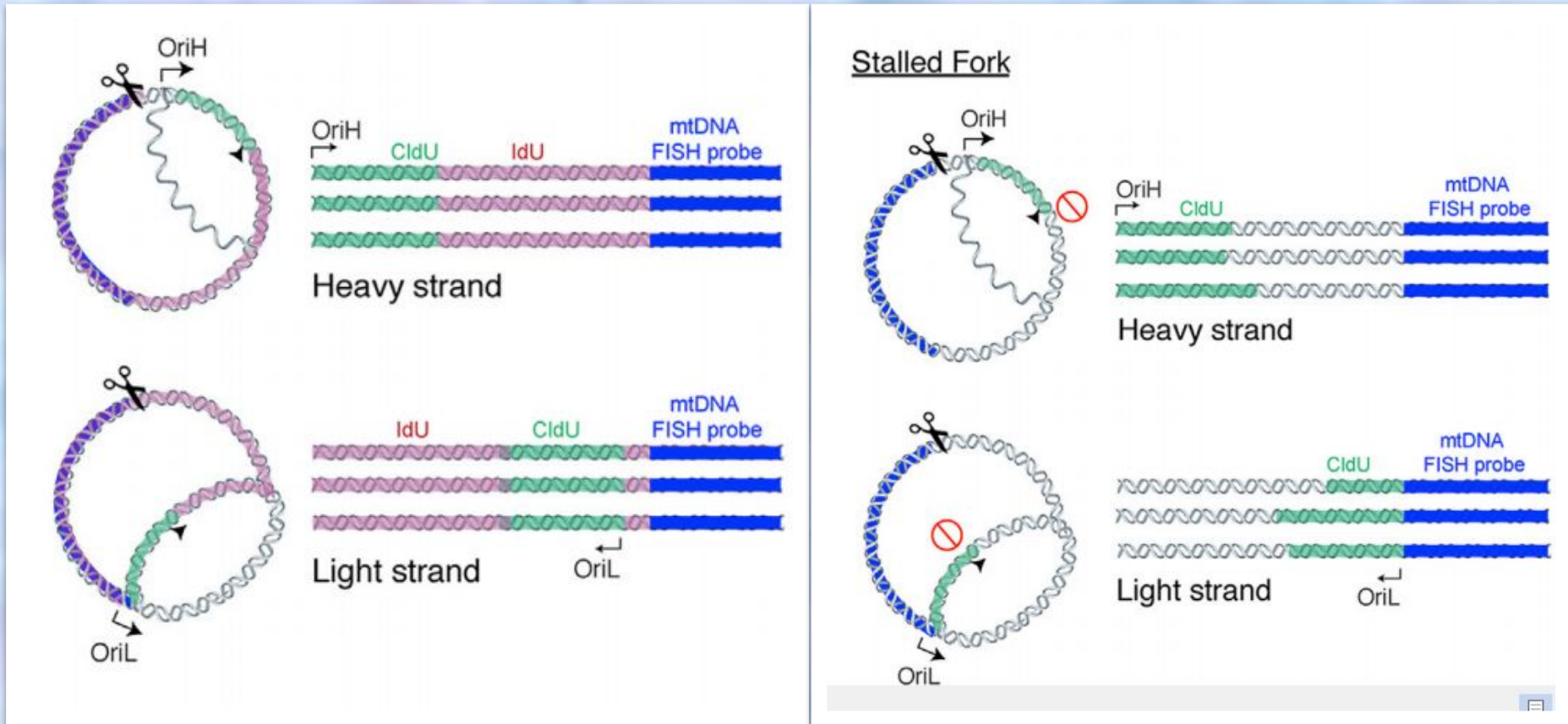


Хеликазная активность стимулируется mtSSB, без него может расплетать только короткие субстраты.

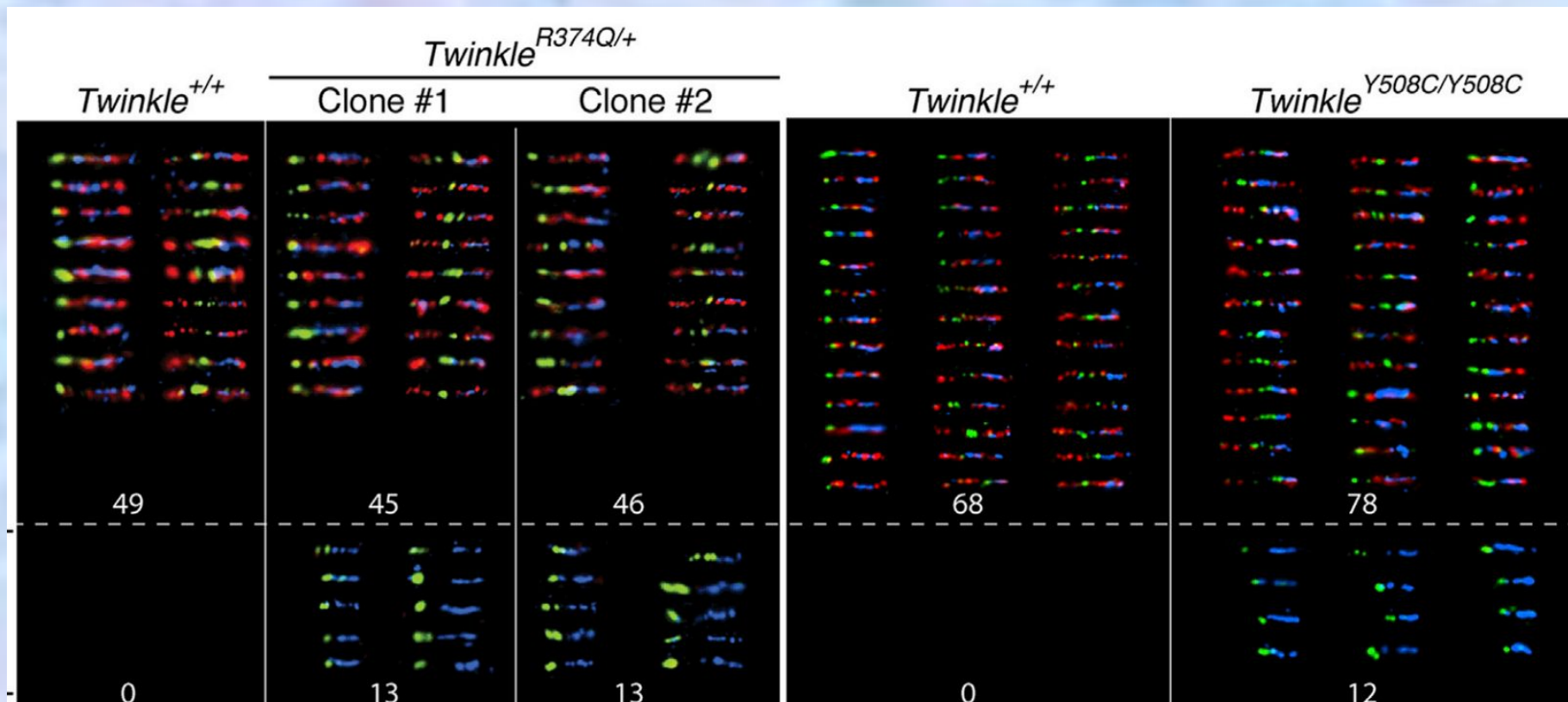
В присутствии mtSSB расплетает дцДНК в вилке репликации.

Некоторые мутации в TWINKLE выявлены при хронической офтальмоплегии.

# Выявление задержки репликативной вилки при помощи метода Mito-SMARD



# Мутации в TWINKLE приводят к задержке вилки репликации



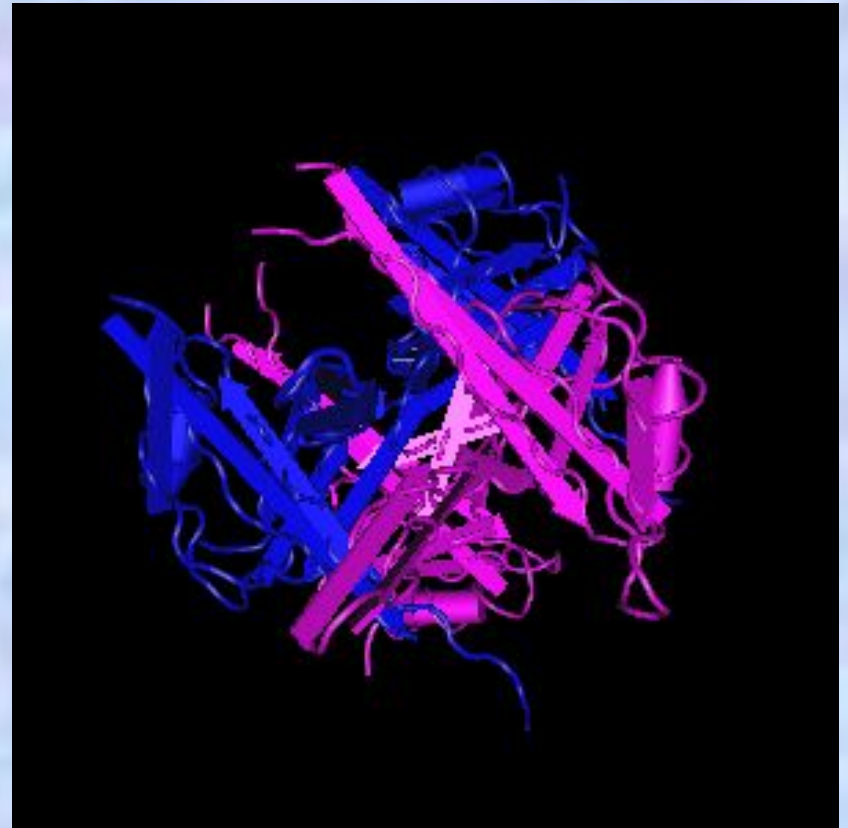
# Другие митохондриальные хеликазы

- 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 нокадауне 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.





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-loop. 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:

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

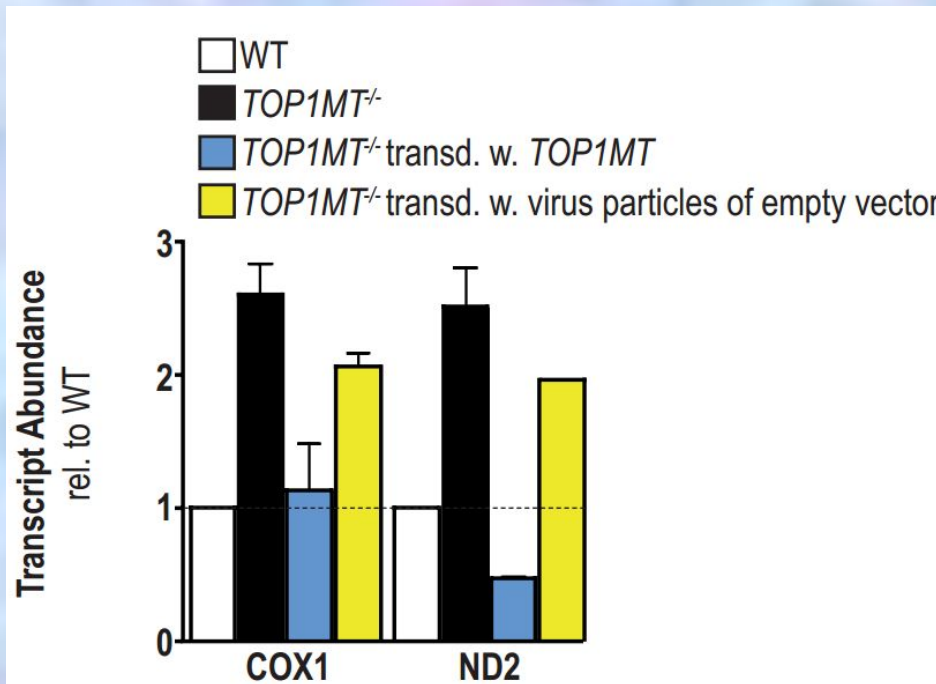
## В митохондриях обнаружены:

- 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 (PMID: 14519130)
- TOP3Amt. Она образуется при альтернативной инициации трансляции общего с ядерной формой транскрипта.

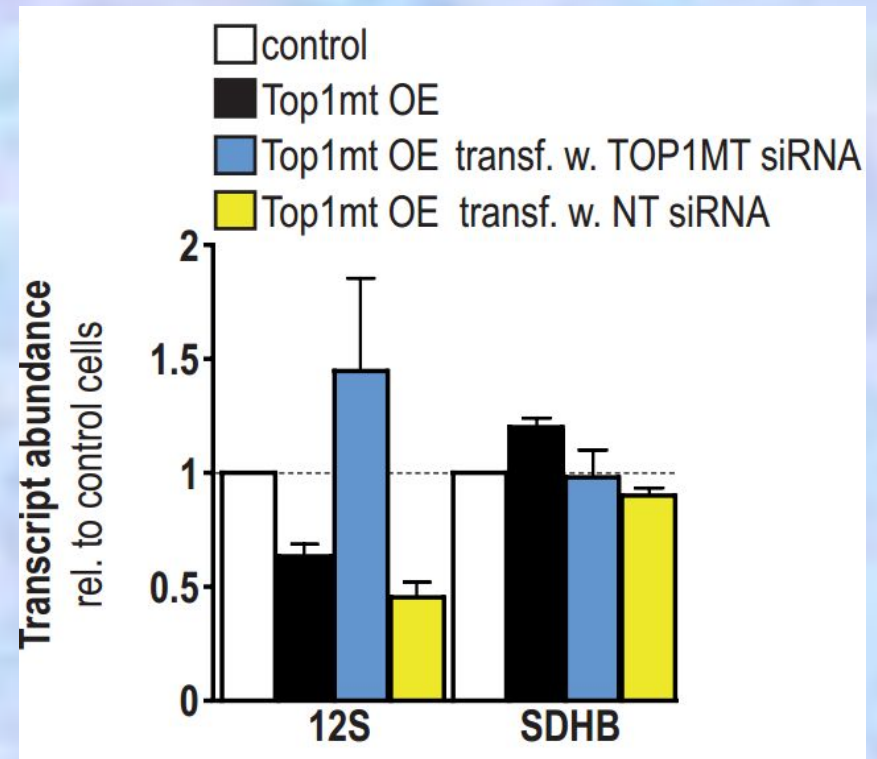
# Top1mt

- 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-/Top1mt- нормально экспрессируются митохондриальные белки.
- Но в мышечных эмбриональных фибробластах Top1mt-/Top1mt- возникают митохондриальные нарушения => Top1mt играет важную роль в эмбриогенезе.

# Top1mt – негативный регулятор транскрипции митохондриальных генов

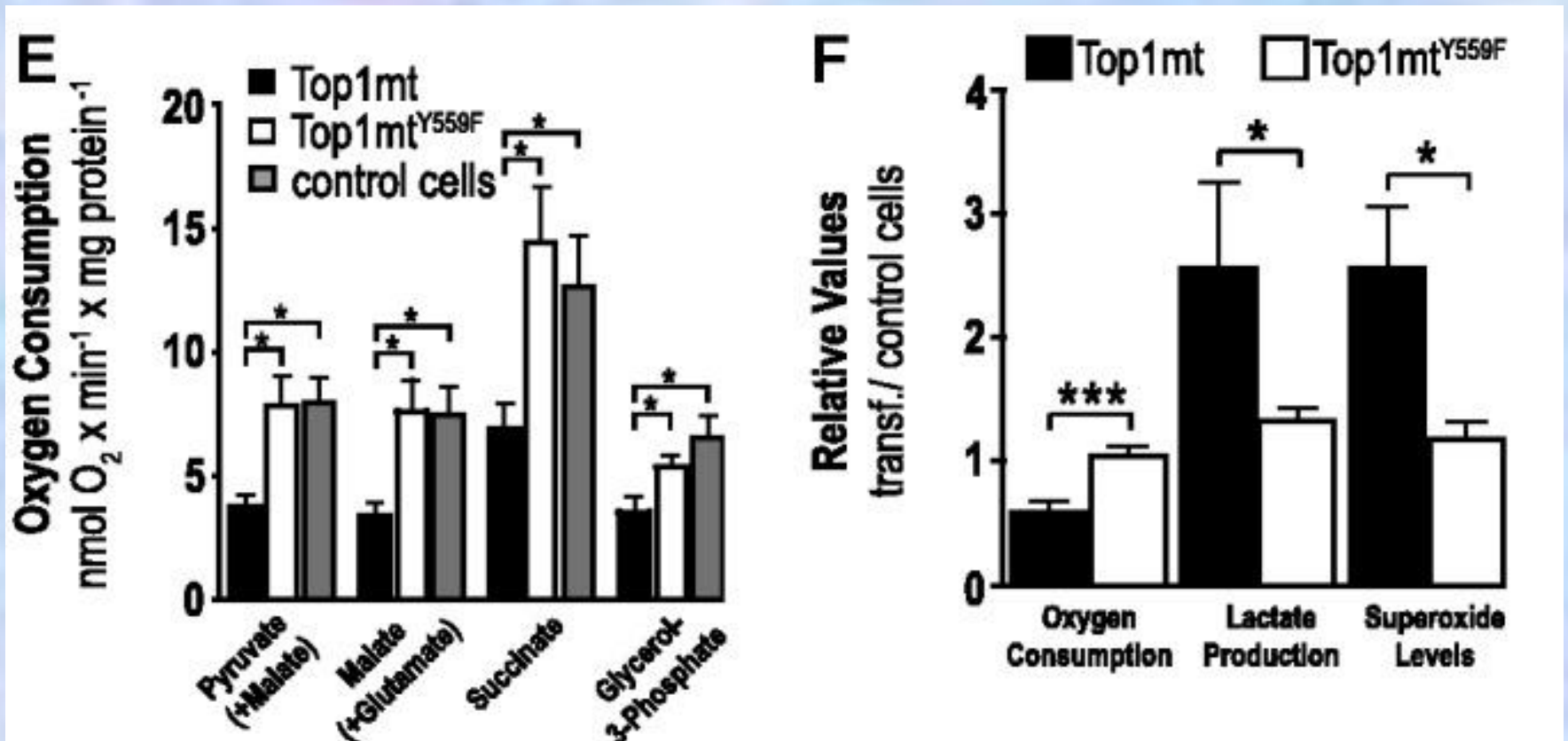


При отсутствии Top1mt повышается уровень транскрипции митохондриальных генов

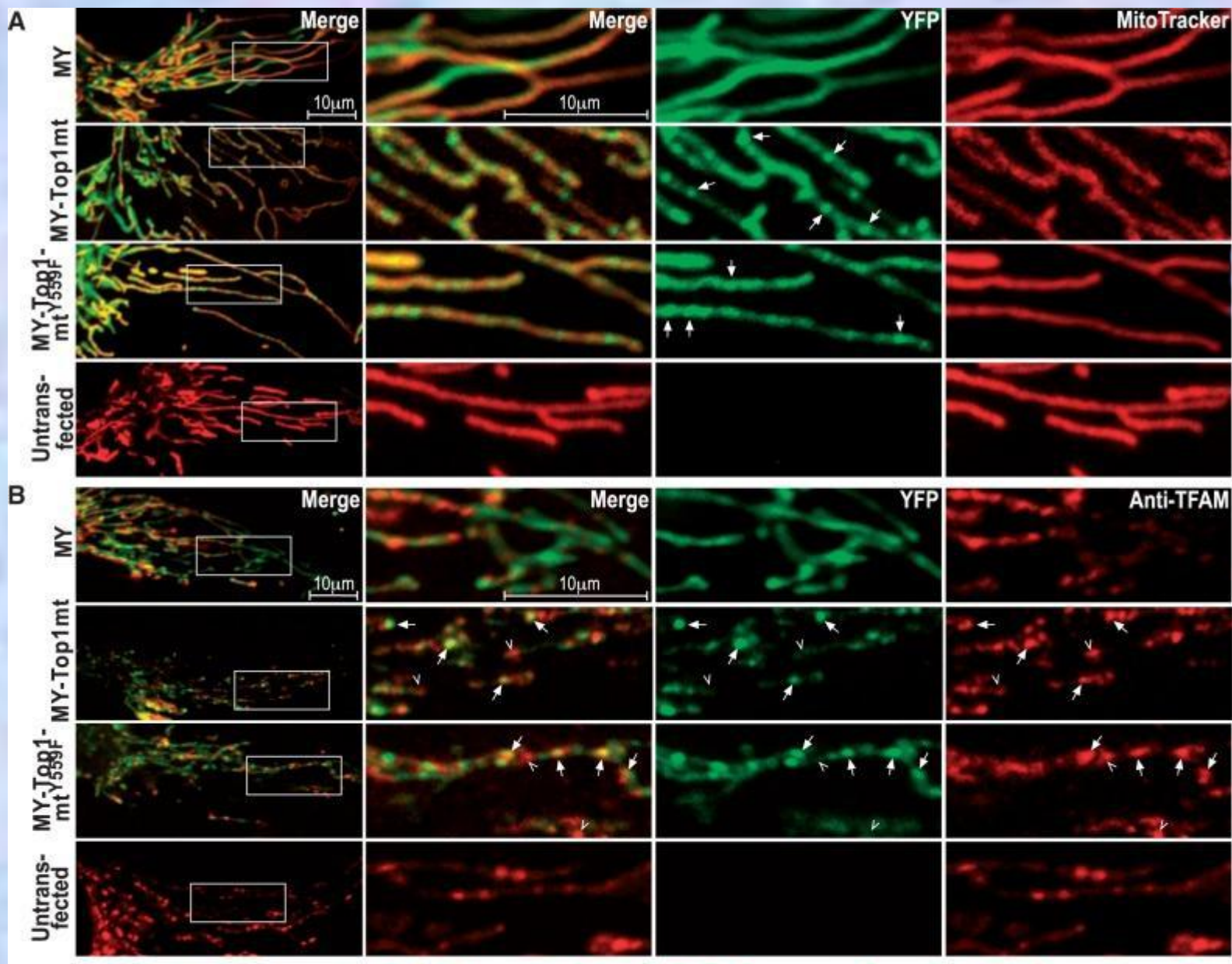


Гиперэкспрессия Top1mt снижает уровень транскрипции митохондриальных генов

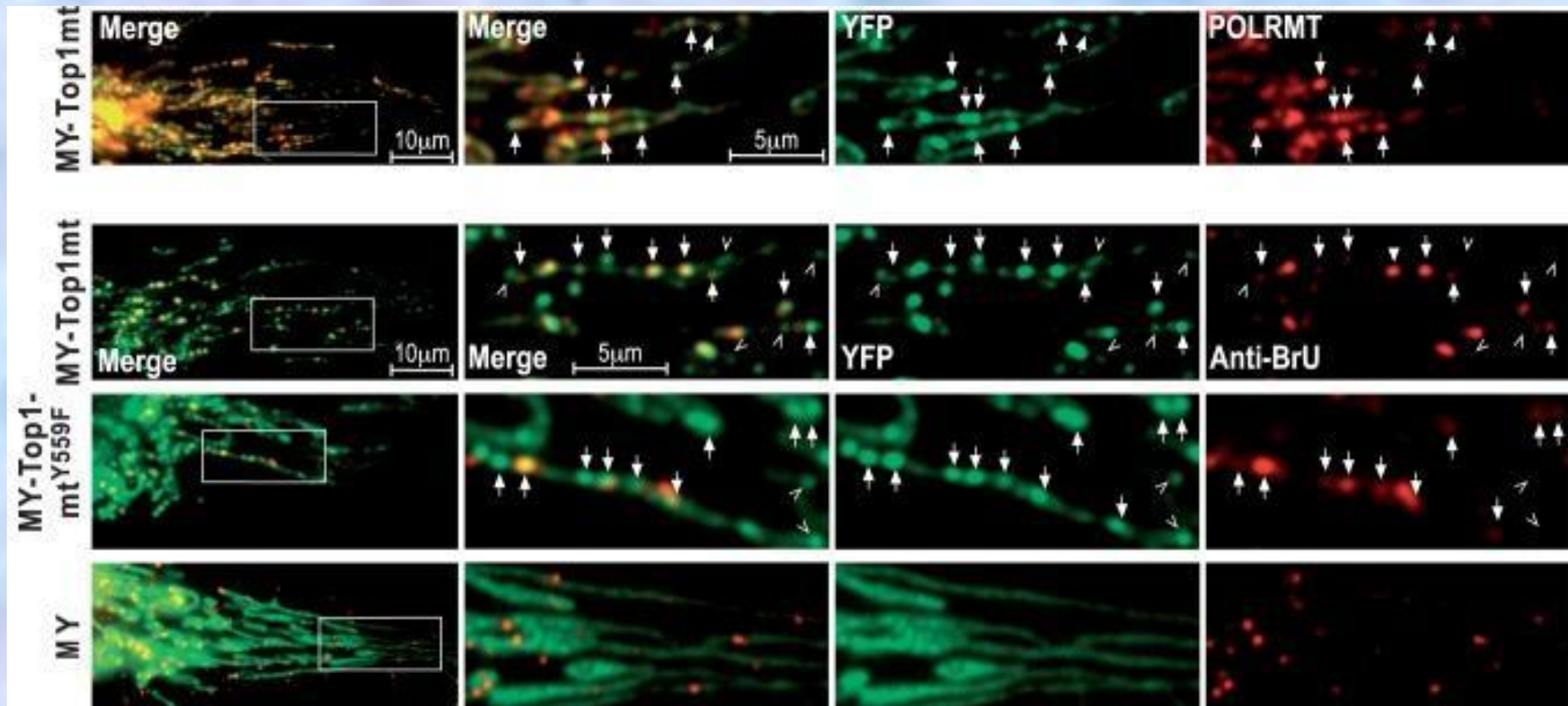
# Гиперэкспрессия Top1mt нарушает работу дыхательной цепи



# Top1mt локализована в нуклеоидах



# Top1mt связана с транскрипционно активными нуклеоидами и с POLRMT

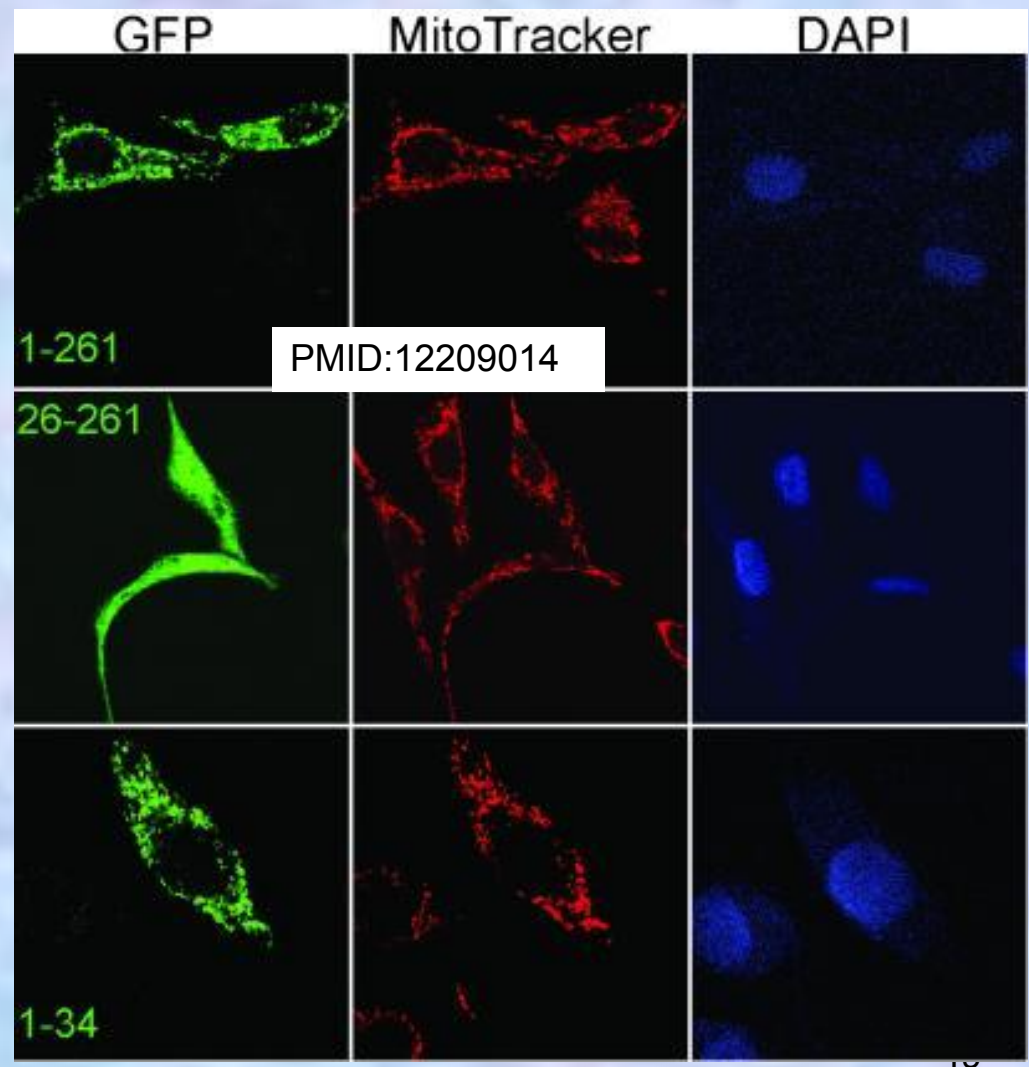




MIFPVAR<sup>+</sup>YALR<sup>+</sup>WLRR<sup>++</sup>PE<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>AF<sup>▼</sup>SR<sup>+</sup>AAMEMALRGV<sup>+</sup>RK<sup>++</sup>  
 1 26 35

# DNA topoisomerase III $\alpha$

Top3 $\alpha$  – в ядре  
 участвует в  
 рекомбинации.  
 Предполагается её  
 участие в окончании  
 репликации и/или в  
 митохондриальной  
 транскрипции



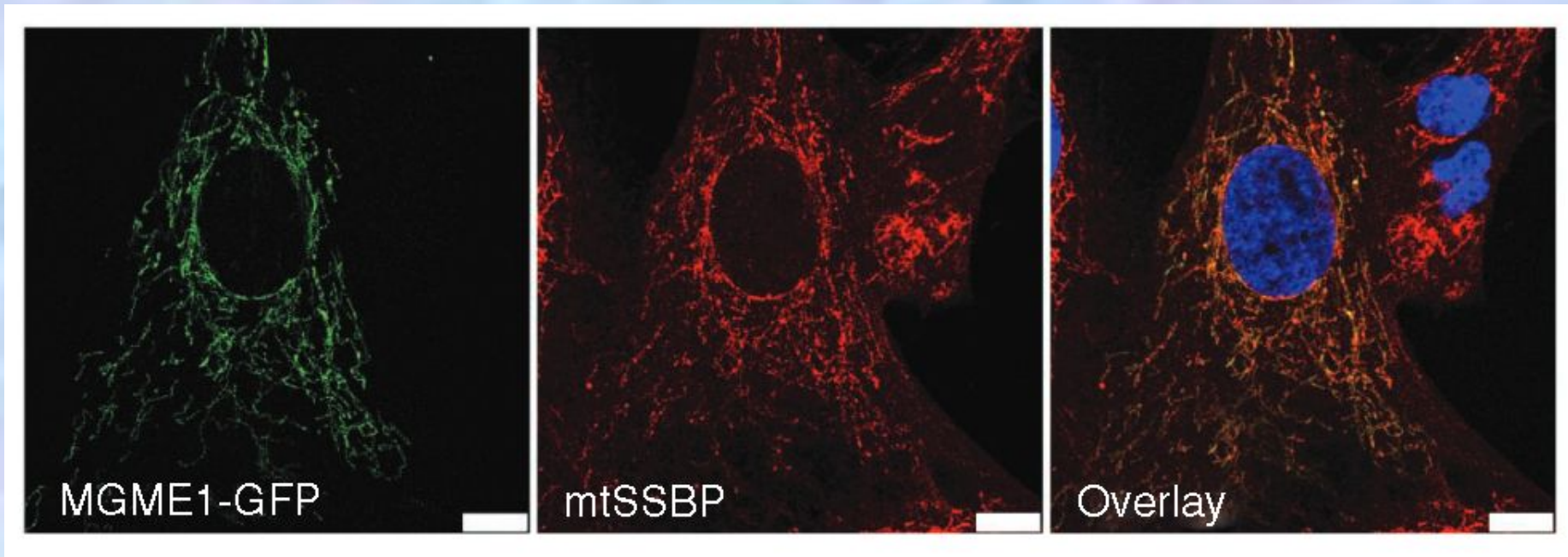
- Top2B в ядре активирует транскрипцию.
- В митохондриях она может расплетать сплетенные в ходе репликации молекулы ДНК.
- В мышечных эмбриональных фибробластах Top2B-/Top2B- уровень транскрипции и количество сплетенных ДНК не отличается от нормы.
- А в МЭФ Top1MT-/Top1MT- Top2B может увеличивать уровень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

# РНказы Н

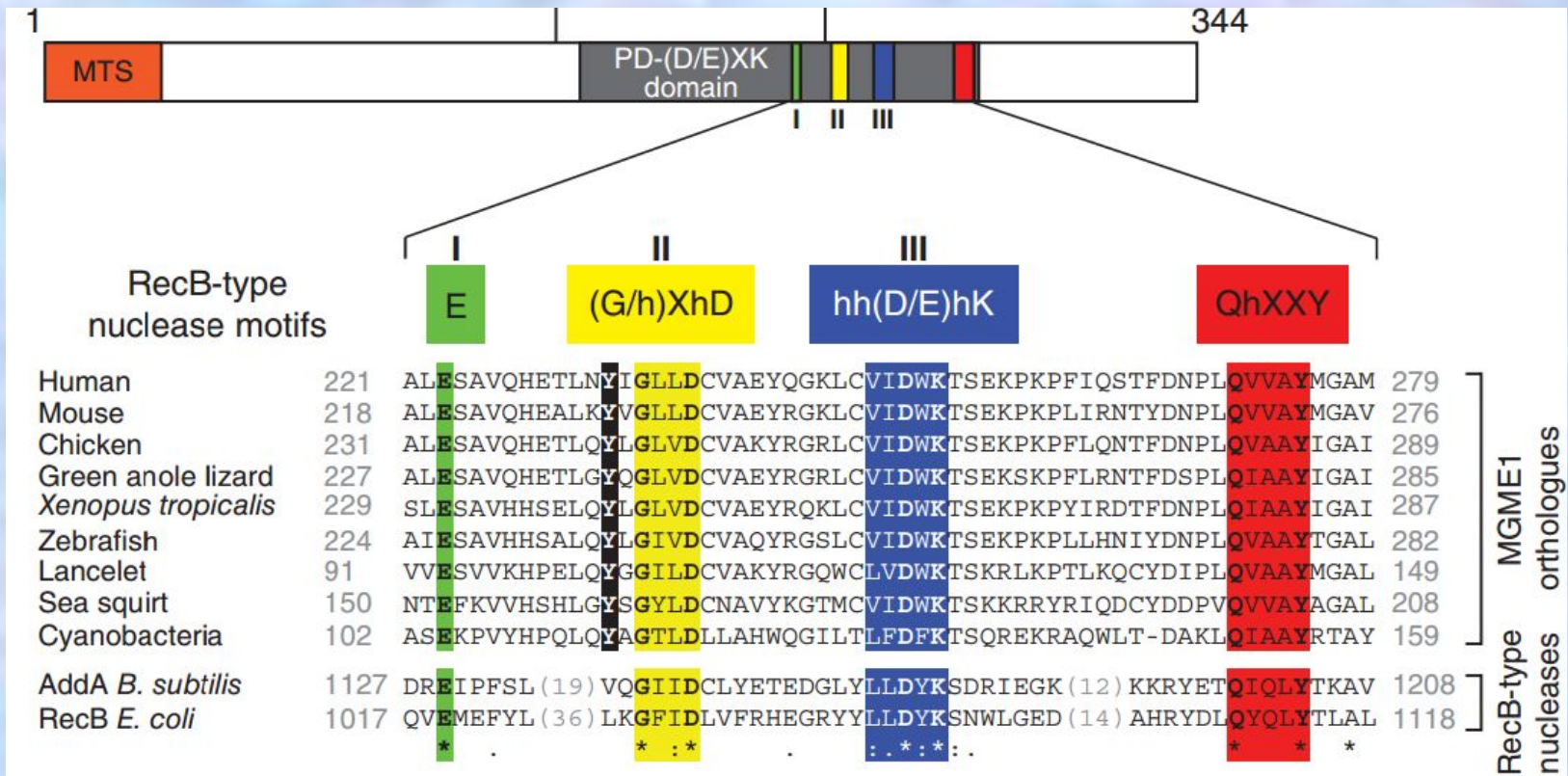
- RNase H I – уничтожение РНК в РНК-ДНК гибридах
- RNase H II – удаляет отдельные rNMP, встречающиеся в ДНК
- **В митохондриях найдена только РНказа Н I.** Это тот же фермент, что работает в ядре, но с «митохондриальным адресом».
- Повышенный или пониженный уровень экспрессии РНказы Н I в митохондриях приводит к смерти клетки.
- Возможная функция: удаление РНК праймеров на ориджинах  $ORI_H$  и  $ORI_L$  и при синтезе фрагментов Оказаки.

# MGME1 (mitochondrial genome maintenance exonuclease 1):

- локализована в МИТОХОНДРИЯХ
- ssDNA 5'→3' exonuclease



- 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



## Основные ферменты репликации:

1. ДНК полимераза  $\gamma$  – 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 (Тор1mt и Торо3 $\alpha$ ) и Торо II- вносят в ДНК разрыв, снимая супернапряжение, внесенное за счет закрученности, во время репликации и транскрипции
5. RNase H I – удаляют РНК праймеры