

УДК 577.21

РЕПЛИКАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА

Обзор

© 2019 Л.А. Зиновкина

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия;
электронная почта: luzinovkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.03.2019

После доработки 26.03.2019

Принята к публикации 16.04.2019

Репликацию в митохондриях человека исследуют уже несколько десятилетий, однако ее механизм не понятен до сих пор. В последние 15 лет появилось много новых экспериментальных данных о митохондриальной репликации, но они крайне противоречивы. Предложено три модели репликации: две асинхронных – *Strand displacement* и RITOLS и одна синхронная – *Strand-coupled*. В асинхронных моделях ориджин Н-цепи начинает работать раньше, поэтому репликация цепей завершается не одновременно. Синхронная модель более традиционна – в одном ориджине иницируются две вилки репликации с лидирующей и отстающей цепями. Для каждой из трех моделей есть как подтверждающие, так и противоречащие ей экспериментальные факты. Вероятно, единой модели митохондриальной репликации не существует. Можно предположить, что уникальная репликативная машина митохондрий, возникшая в результате эндосимбиоза, успешно обслуживает митохондриальный геном, проявляя неожиданное разнообразие стратегий. Необычное сочетание ферментов, имеющих разное происхождение (фаговое, бактериальное, эукариотическое), а также уникальные особенности самого генома (разделение на тяжелую и легкую цепи, вставки рибонуклеотидов, разнообразие ориджинов), вероятно, дает возможность для репликации разными способами. В человеческих митохондриях, по-видимому, преобладает асинхронная репликация, но в определенных условиях репликация может идти и синхронно. В сердце человека кольцевой митохондриальный геном перестраивается в сеть из быстро воспроизводящихся линейных геномов, что говорит об очень широком спектре возможных репликативных механизмов в митохондриях. В обзоре описаны основные стадии митохондриальной репликации и ее основные ферменты, а также обсуждаются перспективы исследований в этой области.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мтДНК, нуклеоид, D-петля, репликация, *strand displacement model*, RITOLS, *strand-coupled model*.

DOI: 10.1134/S0320972519080049

Митохондриальная ДНК (мтДНК) присутствует во всех описанных митохондриях. В процессе эволюции у эукариотических организмов происходили значительные изменения предкового для всех митохондрий α -протеобактериального генома. В связи с этим современные митохондриальные геномы весьма разнообразны и отличаются как по своей структуре, так и по размеру. Чаще всего митохондриальный геном представляет собой одну кольцевую молекулу ДНК.

Но встречаются линейные (у некоторых кишечнорастворимых, водорослей, грибов и одноклеточных эукариот) митохондриальные ДНК [1] и митохондриальные геномы, состоящие из нескольких хромосом (у высших растений и трипаносоматид) [2].

Самые крупные современные митохондриальные геномы характерны для высших растений, в среднем, 200–300 т.п.н. [3], рекорд составляет *Silene conica* – 11 млн п.н. [4]. У грибов размеры митогенома почти на порядок меньше, хотя и варьируют в широких пределах: 30–90 т.п.н. [5]. У позвоночных животных геномы гораздо меньше, например, у млекопитающих – 16–18 т.п.н. [6].

МтДНК млекопитающих – кольцевая двуцепочечная молекула, которая может, как показали электронно-микроскопические исследования, находиться в митохондриях в четырех разных формах: релаксированное кольцо (*open cir-*

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК; Н-цепь – тяжелая цепь, L-цепь – легкая цепь; POLRMT – РНК-полимераза; TFAM – транскрипционный фактор А митохондрий; SSB – *single-strand binding protein*; O_H – ориджин репликации тяжелой цепи; O_L – ориджин репликации легкой цепи; *ori b* и *ori z* – ориджины *b* и *z*; NCR – *non-coding region*; CSB – *conserved sequence blocks*; TAS – *termination-associated sequence*; TEFM – *mitochondrial transcription elongation factor*; MGME1 – *mitochondrial genome maintenance exonuclease 1*; RITOLS – *RNA incorporated through out the lagging strand*.

cle), суперскрученное кольцо (*supercoiled circle*), кольцевые мультимеры (в основном, димеры — *head-to-tail circular dimer*) и катенаны — кольца, замкнутые друг на друга [7]. Первые две формы составляют большинство среди всех наблюдаемых. Кольцевые мультимеры в значительных количествах обнаружены в некоторых линиях культивируемых клеток, а также в лейкоцитах человека при лейкемиях. Катенаноподобные структуры в мтДНК млекопитающих составляют 10–30% от всех форм ДНК и были описаны неоднократно. В человеческих клеточных линиях встречаются катенаны из 8-ми молекул ДНК, и количество катенанов коррелирует с числом копий мтДНК [7].

Удивительно, что в противоположность четырем перечисленным выше формам кольцевых молекул, наблюдаемым в миокарде младенцев или других видов млекопитающих (крыса, мышь, кролик), в сердечной мышце взрослого человека мтДНК образует многомерную сеть, содержащую десятки линейных геномов [8]. Похожим образом организована мтДНК у некоторых растений, малярийного плазмодия и грибов. В таких «переплетенных» геномах можно наблюдать классические структуры Холлидея, образующиеся при гомологичной рекомбинации. В других тканях человека, за исключением мозга (сеть в нем гораздо менее густая, но переплетения также встречаются), такие структуры мтДНК идентифицированы не были, что может объясняться необходимостью интенсивной репликации, а, возможно, и рекомбинации, в тканях с наиболее функционально активными митохондриями [9].

СТРОЕНИЕ НУКЛЕОИДА

МтДНК всегда находится в митохондриях в форме комплексов с белками, эти комплексы принято называть «нуклеоидами» [10, 11]. Несмотря на то что исследования состава и структуры нуклеоидов важны для понимания всех процессов, происходящих в митохондриях, и ведутся не одно десятилетие, организация нуклеоида и его точный белковый состав описаны далеко не полностью [10].

Митохондриальный нуклеоид млекопитающих представляет собой структуру размером ~100 нм в диаметре [12, 13] с многоуровневой организацией [14, 15]. Белки, физически взаимодействующие с мтДНК, образуют коровую часть нуклеоида и участвуют в процессах митохондриальной репликации, репарации и транскрипции. На внешнем уровне нуклеоида располагаются в основном белки, осуществляющие

процессинг РНК и трансляцию. Кроме того, в нуклеоиде должны содержаться белки, прикрепляющие его к внутренней митохондриальной мембране. В настоящее время эту функцию приписывают белку ATAD3 [16], но, возможно, у него есть партнеры.

Идентификация компонентов нуклеоида оказалась технически непростой задачей, в связи с чем разные научные коллективы получают противоречивые данные [17]. Ниже приведен список белков коровой части нуклеоида, которые участвуют в репликации:

1) РНК-полимераза POLRMT (выполняет функции праймазы в инициации репликации и осуществляет транскрипцию [18]);

2) транскрипционные факторы TFAM [19], TFB1M/TFB2M, TEFM [20] (необходимы для работы РНК-полимеразы POLRMT [21]);

3) ДНК-полимераза γ (POLG) (осуществляет собственно репликацию мтДНК).

POLG состоит из одной каталитической (продукт гена *polg* размером 140 кДа) и двух дополнительных (продукты гена *polg2* размером по 55 кДа) субъединиц [22].

Каталитическая субъединица имеет гомологию с ДНК-полимеразой фага T7 и, помимо полимеразной, обладает тремя дополнительными ферментативными активностями: 3'→5'-экзонуклеазная активность позволяет полимеразе γ репарировать неправильно вставленные нуклеотиды; за счет активности обратной транскриптазы POLG может проходить часто встречающиеся в мтДНК рибонуклеотидные вставки [23]; и, наконец, 5'→3'-дезоксирибофосфатазная активность необходима ДНК-полимеразе γ для участия в репарации BER [9, 24]. Каталитическая субъединица состоит из N-концевого экзонуклеазного и C-концевого полимеразного домена с характерной пространственной структурой, напоминающей ладонь, части этого домена соответственно названы ладонью (*palm*), большим пальцем (*thumb*) и остальными пальцами (*fingers*) [22]. Экзонуклеазный и полимеразный домены соединены спейсером, через который к каталитической субъединице присоединяются дополнительные. Дополнительные субъединицы необходимы для дополнительного связывания с ДНК и увеличения процессивности фермента. Мутации в генах *polg* и *polg2* имеют сходное фенотипическое проявление, они приводят к развитию хронической прогрессирующей офтальмоплегии (СРЕО) [22];

4) ДНК-хеликаза Twinkle;

5) топоизомеразы I снимают супервитки, образованные при движении репликативной вилки и разъединяют катенаны (о них будет подробнее написано ниже);

6) mtSSB – митохондриальный ортолог бактериального белка SSB, связывающийся с одноцепочечными участками ДНК, образующимися в ходе репликации [25];

7) РНКазы H1 удаляет РНК-затравки, образованные POLRMT;

8) ДНК-лигаза 3 осуществляет сшивание вновь синтезированной мтДНК в кольца, сшивает фрагменты Оказаки, участвует в репарации.

До сих пор нет единого мнения о числе копий мтДНК в нуклеоиде. Ранние работы указывали на наличие в каждом нуклеоиде 1–2 молекул ДНК [26], затем появилась серия публикаций, демонстрирующих наличие в одном нуклеоиде, в среднем, 5–6 копий мтДНК [27–29]. Самая современная работа с применением сложных микроскопических методов подтвердила первоначальную точку зрения. [13]. Поэтому сейчас принято считать, что в большинстве нуклеоидов присутствует единичная молекула митохондриальной ДНК. Вместе с тем высказываются предположения, что содержание ДНК в нуклеоиде может быть разным в митохондриях разных тканей организма и/или зависеть от каких-либо условий. Например, показано, что количество молекул ДНК на один нуклеоид в соматических клетках выше, чем в половых [30].

Кроме того, на состояние и количество мтДНК в нуклеоиде большое влияние оказывает белок TFAM. Он был описан как транскрипционный фактор: инициация транскрипции в митохондриях начинается с присоединения к промоторной области TFAM, который изгибает ДНК, только после этого к ДНК может присоединиться РНК-полимераза [21]. Помимо этой, основной своей функции, TFAM способен связываться с мтДНК неспецифически по всей длине, изгибая и запетливая ее, что приводит к компактизации и, в конечном итоге, недоступности ДНК для ферментов. В экспериментах *in vitro* показано, что при увеличении концентрации TFAM резко возрастает число суперкомпактизированных молекул ДНК [31, 32]. Поэтому TFAM рассматривают как основной регулятор состояния ДНК в нуклеоидах: от его количества зависит количество молекул ДНК, способных к экспрессии и/или репликации и репарации.

С помощью микроскопии с высоким разрешением [33] показано, что существуют разные виды нуклеоидов. Можно предположить, что в компактных нуклеоидах мтДНК неактивна, в то время как в более крупных нуклеоидах мтДНК вовлечена в транскрипцию/репликацию, а регулятором состояния ДНК в нуклеоиде служит как раз TFAM [34]. Недавно показано, что нуклеоиды с активной репликацией мтДНК обычно расположены в местах контакта митохонд-

рии и ЭПР. Вероятно, это необходимо для координации между делением митохондрий и репликацией их ДНК, необходимой для распределения новообразованных нуклеоидов по митохондриальной сети [35].

Клетка обычно содержит несколько митохондрий, а каждая митохондрия может содержать десятки–сотни нуклеоидов [36], поэтому в одной клетке обычно содержится множество молекул мтДНК, для млекопитающих это, в среднем, 1000–10 000 копий на клетку [32].

Мутации редко затрагивают все клеточные копии митохондриального генома. Поэтому большинство мутаций в мтДНК находятся в гетероплазмическом состоянии, и фенотипическое проявление таких мутаций зависит от уровня гетероплазмии [9, 37]. Не исследован до конца вопрос о возможности обмена ДНК между нуклеоидами. Это явление, сопровождавшееся рекомбинацией, было показано в единичной работе в 2004 г. [38]. Вероятно, такой обмен молекулами мтДНК может использоваться клеткой для отбора нормальных митогеномов в том случае, когда в ней присутствуют как обычные, так и мутантные копии. В более поздних работах переход молекул мтДНК из одного нуклеоида в другой не подтвердился [13, 29].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ УЧАСТКИ МТДНК И D-ПЕТЛЯ

МтДНК млекопитающих – кольцевая двуцепочечная молекула. Ее цепи называются L (*light*) и H (*heavy*) из-за заметной разницы в плавучей плотности в градиенте хлористого цезия. H-цепь богата G, в L-цепи G значительно меньше, этому факту есть изящное объяснение: при асинхронной репликации (см. ниже) материнская H-цепь долгое время остается в одноцепочечном состоянии, и в ней происходит спонтанное дезаминирование цитозина с образованием тимина и аденина с образованием гуанина, что постепенно «обогащает» H-цепь гуанином [39]. Нужно отметить, что генетический код в митохондриях имеет некоторые отличия от универсального: триплеты AGA и AGG служат стоп-кодонами (в универсальном коде они кодируют Arg); AUA кодирует Met (Ile в универсальном коде); UGA кодирует Trp (стоп-кодон в универсальном коде).

У человека и других млекопитающих в митогеноме отсутствуют интроны и совсем мало некодирующих участков. Наиболее протяженный некодирующий фрагмент (NCR, *non-coding region*) имеет длину ~ 700 п.н. и расположен между генами tRNA^{Pro} и tRNA^{Phe}. NCR содержит

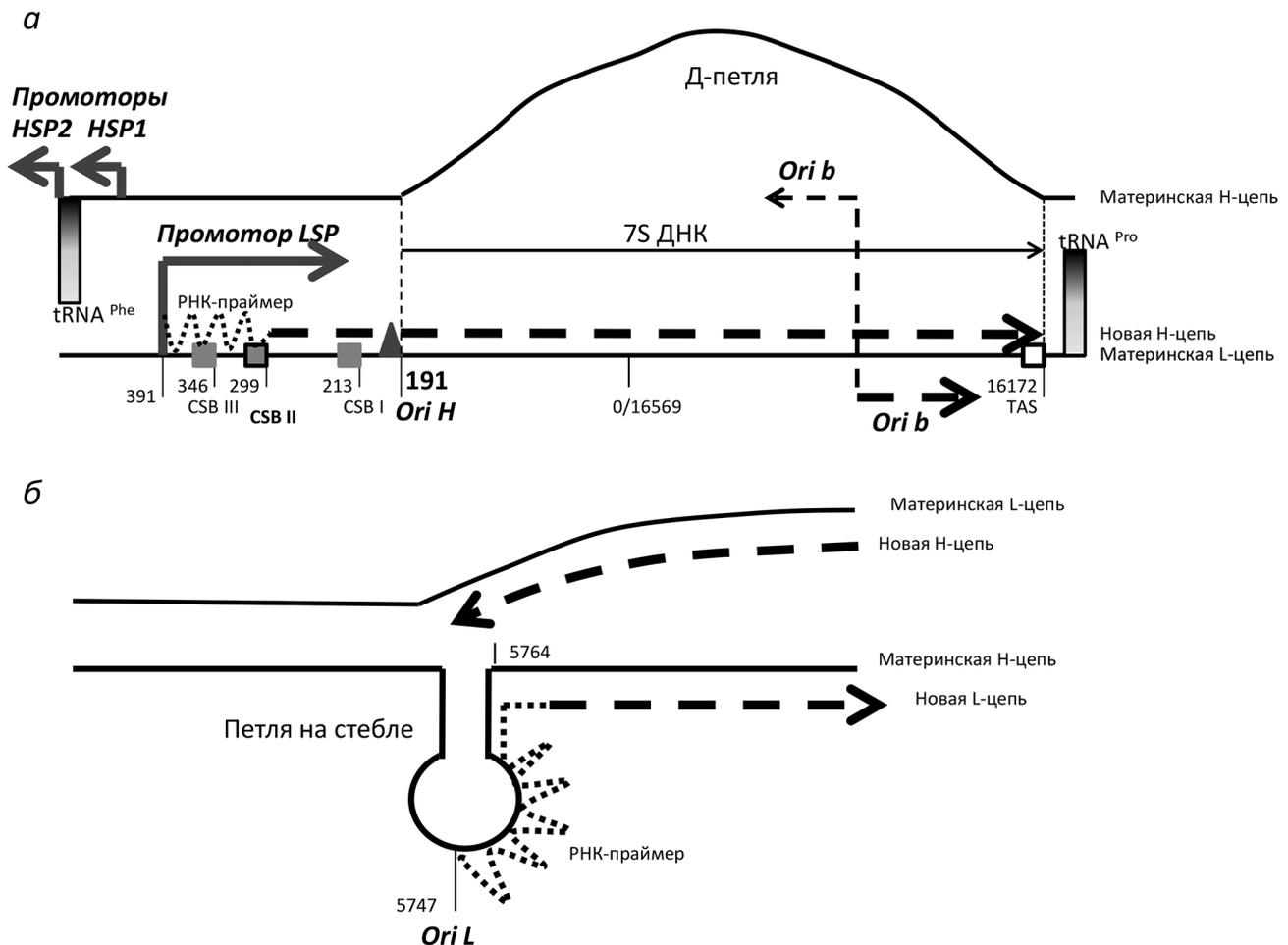


Рис. 1. Основные регуляторные элементы митохондриального генома человека. Числа обозначают положение элемента в митогеноме. *a* – NCR, ограниченный генами tRN^{Phe} и tRNA^{Pro}, содержит O_H , двунаправленный *ori b*, промоторы HSP1 и LSP. В участке CSBII предположительно происходит переключение с синтеза РНК-праймера на синтез ДНК. При терминеции репликации в TAS образуется 7S ДНК, а материнская Н-цепь образует D-петлю. Если терминеции в TAS не происходит, происходит синтез полноразмерной Н-цепи; *b* – инициация репликации в O_L . Когда синтез новой Н-цепи доходит до O_L , материнская Н-цепь образует петлю на стебле, которая имеет одноцепочечный участок, где синтезируется РНК-праймер для образования новой L-цепи

почти все регуляторные элементы митогенома, подробное описание которых будет дано в настоящем обзоре [40] (рис. 1, *a*): 1) ориджин репликации O_H и многочисленные дополнительные ориджины (с них предположительно может начинаться репликация согласно модели **strand-coupled model** (см. ниже), O_L расположен в другом коротком некодирующем участке; 2) промоторы для обеих цепей LSP и HSP1 (третий промотор, HSP2, расположен совсем рядом – внутри гена tRNA^{Phe}, но формально этот ген уже не входит в NCR); 3) участки регуляции репликации CSB (*conserved sequence blocks*) – три консервативных блока нуклеотидов, на CSB II при репликации происходит переключение с синтеза РНК-праймера на синтез ДНК (см. ниже); 4) участок терминеции репликации TAS (*termi-*

nation-associated sequence) – здесь происходит терминеция репликации при образовании 7S ДНК, образующей D-петлю (см. ниже).

Таким образом, большая часть регуляторных участков, в том числе и ответственных за репликацию (за исключением O_L), компактно расположена в NCR. Рассмотрим происходящие в нем процессы более подробно.

Итак, митохондриальная репликация начинается в O_H (или согласно некоторым моделям вблизи него, см. ниже). У существенной части молекул (в разных работах и разных клетках процент молекул мтДНК с D-петлями разный [40]) репликация заканчивается на расстоянии 650 п.н. в участке TAS (рис. 1, *a*). В этом случае полноразмерная Н-цепь не синтезируется, образуется только 7S ДНК. Это приводит к образо-

ванию в NCR трицепочечной структуры, получившей название D-петля (от *displacement loop*): старая H-цепь выпетливается, что хорошо заметно на электронных микрофотографиях [41]. Несмотря на то что D-петля описана более 40 лет назад, ее функции абсолютно неизвестны до сих пор [40]. Совершенно непонятно, каков механизм терминации репликации в TAS: почему в некоторых случаях терминация происходит, а в некоторых нет — и тогда образуется полноразмерная H-цепь. Очевидно, что терминация должна регулироваться. Пока есть данные только об участии в этой регуляции хеликазы Twinkle. Показано, что в нормальных условиях ДНК-полимераза γ останавливается на 3'-конце D-петли, и Twinkle на ДНК в этот момент мало. Когда же самой мтДНК мало (т.е. есть потреб-

ность в ее полноразмерных копиях), количество Twinkle на ДНК резко возрастает, и уровень 7S ДНК падает [42]. Таким образом, Twinkle каким-то образом контролирует число копий мтДНК. Молекулярный механизм такой регуляции только предстоит выяснить.

D-петля фланкирована двумя похожими между собой палиндромами длиной 15 п.н. (ATGN₉CAT). Один расположен на 5'-конце 7S ДНК и входит в CSBI, а второй находится внутри терминатора TAS, чуть ниже 3'-конца 7S ДНК. Есть предположение, что эти палиндромы могут участвовать в регуляции синтеза 7S ДНК [34]. Были предприняты попытки найти белки, узнающие этот палиндром, но пока специфически связывающиеся с этими последовательностями белки не идентифицированы.

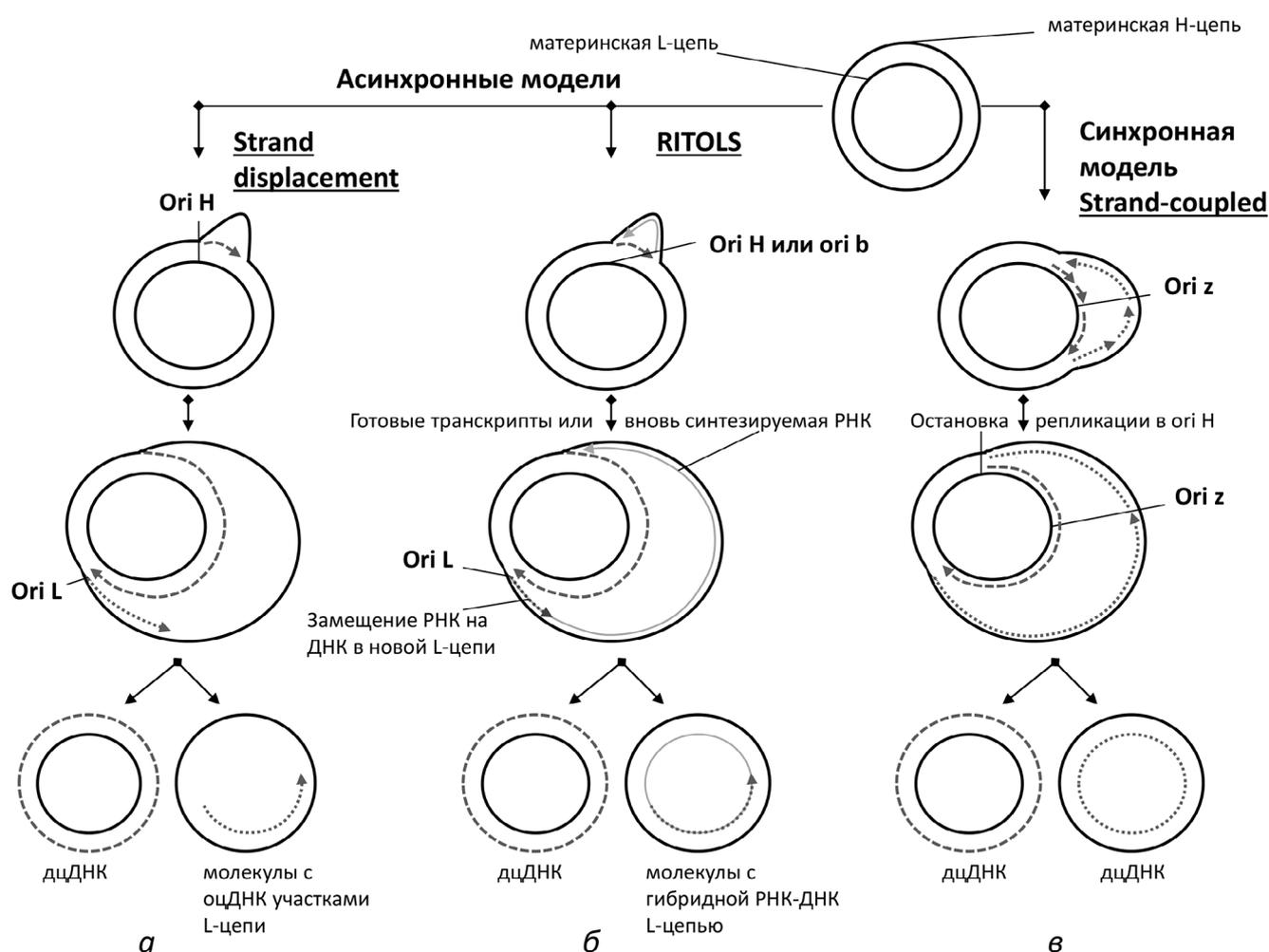


Рис. 2. Три основных модели репликации мтДНК млекопитающих. *a* и *б* – Асинхронные модели Strand displacement и RITOLS соответственно; *в* – синхронная модель Strand-coupled. Детальное описание моделей дано в тексте. Материнские цепи мтДНК показаны черной сплошной линией, темно-серым пунктиром с длинным штрихом показана новая H-цепь, темно-серым пунктиром с коротким штрихом показана новая L-цепь, светло-серой сплошной линией показана РНК в составе L-цепи

МОДЕЛИ РЕПЛИКАЦИИ мтДНК

В настоящее время рассматриваются три основных модели репликации двуцепочечного кольцевого митогенома. Для каждой из трех есть как подтверждающие, так и противоречащие наблюдения.

Исторически первой была предложена модель «вытеснения цепи» (**Strand displacement model**) [43] (рис. 2, *a*). Она была предложена на основе данных электронной микроскопии (на снимках наблюдали структуры с протяженными одноцепочечными участками), а также обнаружили чувствительность продуктов репликации к нуклеазам, расщепляющим только оцДНК. Согласно этой модели, репликация начинается в O_H . Материнская Н-цепь покрывается белком SSB, происходит синтез только новой Н-цепи. Когда вилка репликации проходит примерно две трети генома, она достигает O_L . Как только ДНК в области O_L становится одноцепочечной, она образует структуру *stem-loop*, что предотвращает связывание SSB в этой области. РНК-полимераза POLRMT, не способная связываться с двуцепочечной матрицей, синтезирует праймер длиной ~25 п.н. на одноцепочечном участке петли [44] (рис. 1, *b*). Далее синтез продолжает ДНК-полимераза γ . С этого момента обе цепи синтезируются одновременно. Синтез Н-цепи заканчивается раньше, поэтому при реализации этой модели есть стадия, когда вторая молекула ДНК (с недостроенной L-цепью) имеет протяженный одноцепочечный участок, что хорошо объясняет экспериментальные данные (рис. 2, *a*). Таким образом, в соответствии с данной моделью, митохондриальная репликация является однонаправленной, асимметричной и асинхронной. Помимо этого, данная модель характеризуется отсутствием фрагментов Оказаки (обязательных участников других систем репликации). Много лет эта модель была общепринятой.

В 1990-е гг. для исследования механизмов репликации ДНК в митохондриях группа Holt разработала метод двумерного электрофореза молекул ДНК с разделением по размеру и конфигурации с последующим анализом продуктов с помощью электронной микроскопии. Кроме того, промежуточные продукты репликации обрабатывали нуклеазами разной специфичности [45]. С помощью такого подхода были получены новые экспериментальные данные, на основе которых практически одновременно возникли две новых модели репликации мтДНК.

В своих экспериментах Holt et al. наряду с наблюдаемыми и ранее одноцепочечными фрагментами ДНК, характерными для асинхронной репликации, обнаружили характерные

для двунаправленной синхронной репликации структуры [46]. Кроме того, в митогеноме между O_H и последовательностью TAS были картированы многочисленные дополнительные ориджины репликации [47]. На основе этих фактов была предложена **Strand-coupled model** [46, 48], предполагающая двунаправленную репликацию из этих ориджинов с последующим синхронным движением двух вилок по мтДНК [47] (рис. 2, *в*). В каждой вилке есть лидирующая и отстающая цепи, последняя синтезируется в форме фрагментов Оказаки. Вилка, двигающаяся в направлении NCR, быстро останавливается (в районе O_H), и далее синтез ДНК происходит однонаправленно. Таким образом, согласно второй модели, репликация мтДНК происходит сначала двунаправленно, а затем однонаправленно, и синхронно, что очень похоже на репликацию бактериальных кольцевых геномов.

В 2002 г. Holt et al. опубликовали данные о наличии среди промежуточных продуктов репликации молекул РНК, комплементарно связанных с ДНК, причем рибонуклеотиды включались только в L-цепь [49]. Это открытие стало сенсационным. Модель репликации с участием фрагментов РНК назвали **RITOLS** (*RNA incorporated through out the lagging strand*, ассоциация РНК с отстающей цепью) [50] (рис. 2, *б*). Наличие таких РНК–ДНК-гибридов можно легко объяснить наблюдаемые многими исследователями протяженные одноцепочечные молекулы ДНК, которые ранее связывали с асинхронной репликацией по типу «вытеснения цепи»: РНК в гибридах при выделении митохондрий и различных манипуляциях с препаратами легко деградирует, поэтому легкая цепь остается одноцепочечной. В таком случае можно было считать, что репликация в митохондриях идет асинхронно, и при этом отстающая цепь сначала синтезируется в форме РНК, которая затем заменяется на ДНК [49]. На этом этапе часть исследователей стали считать традиционную модель «вытеснения цепи» устаревшей и/или редкой, поскольку она никак не объясняет существование ДНК–РНК-гибридов [7].

В 2006 г. с помощью комбинации описанного выше двумерного электрофоретического анализа и картирования 5'-концов ДНК в группе Holt показали, что инициация репликации RITOLS у птиц и млекопитающих происходит в NCR – вблизи O_H в *ori b*, который первоначально был описан как ориджин для двунаправленной репликации [51], и в самом O_H (рис. 1, *a* и рис. 2, *б*) репликация RITOLS тем не менее идет асинхронно и однонаправленно: Н-цепь синтезируется в виде ДНК, а отстающая L-цепь сначала представляет собой РНК. Остается нерешенным

шенным вопрос — в каком месте/местах генома и в какое время начинает происходить замещение РНК на ДНК в L-цепи. По-видимому, этот процесс может идти по-разному: в некоторых случаях вся отстающая цепь целиком синтезируется на РНК (печень цыпленка), в других молекулах замещение РНК на ДНК начинается с нескольких определенных локусов (печень цыпленка), во многих случаях замещение начинается с O_L (печень мыши) [50].

Теоретически молекулы РНК, входящие в ДНК–РНК-гибриды, образующиеся при репликации, могут иметь разное происхождение: 1) либо для гибридизации с Н-цепью используются заранее синтезированные транскрипты, 2) либо эти транскрипты образуются одновременно с синтезом ДНК, т.е. РНК синтезируется непосредственно в репликативной вилке. В 2013 г. в группе Holt с помощью радиоактивного мечения РНК и ДНК и введения в митохондрии ингибитора транскрипции было показано, что ингибирование синтеза РНК ожидаемо блокирует включение метки в образующиеся свободные транскрипты, а также ингибирует включение метки РНК в промежуточные репликативные комплексы. При этом структура этих комплексов не изменялась, никаких изменений в репликации не происходило. Включение метки ДНК в репликативные комплексы при ингибировании транскрипции не снижалось, в то время как ингибитор синтеза ДНК напротив быстро блокировал включение в нее метки. Эти данные свидетельствовали о том, что длинные участки РНК, входящие в промежуточные репликативные комплексы мтДНК, не являются продуктами транскрипции, сопряженной с репликацией. Отсутствие эффекта ингибитора синтеза РНК на репликацию мтДНК исключает возможность того, что некая праймаза отвечает за синтез РНК в отстающей цепи. Если бы такая праймаза была чувствительна к ингибитору транскрипции, репликация была бы задержана или сильно менялась бы структура промежуточных репликативных комплексов. Напротив, праймаза, не чувствительная к ингибитору транскрипции, включала бы метку РНК в промежуточные комплексы, чего не наблюдалось в экспериментах. Таким образом, РНК, обнаруженные в промежуточных продуктах репликации RITOLS, должны быть синтезированы до начала репликации ДНК. Источником таких РНК могут быть зрелые митохондриальные транскрипты. Действительно, в составе промежуточных репликативных комплексов, выделенных из гелей, были разные РНК, но самые длинные и часто пред-

ставленные соответствовали зрелым транскриптам из разных участков мт-генома [52].

Модель репликации RITOLS с использованием ранее синтезированных молекул РНК для синтеза отстающей цепи назвали моделью «шнурка» (**Bootlace model**, *bootlace-SA replication* (*bootlace strand-asynchronous replication*)) [52]. Согласно этой модели, предварительно сформированные транскрипты РНК на отстающей цепи последовательно включаются в промежуточные продукты репликации по мере продвижения вилки репликации мтДНК посредством 3'–5'-гибридизации с вытесненной материнской Н-цепью, затем эти транскрипты заменяются на отстающую цепь ДНК.

Открытие в митохондриях промежуточных репликативных комплексов в форме ДНК–РНК-гибридов с самого начала вызвало острые дискуссии среди ученых, занимающихся репликацией [53–55]. До сих пор часть исследователей с недоверием относится к модели RITOLS [34]. С одной стороны, наличие РНК в репликативных комплексах доказано разными методами: эти комплексы выделены, они иммунопреципитируются моноклональными антителами, специфичными к РНК–ДНК-гибридам [56], они образуют структуры с определенными, отличными от других репликативных структур, характеристиками при двумерном электрофорезе [45]. С другой стороны, противники модели репликации RITOLS высказывают два основных обоснованных аргумента: 1) белок SSB по последним данным, полученным в экспериментах *in vivo*, плотно покрывает материнскую Н-цепь во время репликации [57]. Такая картина скорее соответствует модели «вытеснения цепи»; 2) в митохондриях показано наличие РНКазы H1, которая эффективно работает именно с РНК–ДНК-гибридами. При этом никакой системы регуляции активности РНКазы H1, которая могла бы защитить от нее РНК в промежуточных репликативных комплексах, в митохондриях пока не описано [34].

Поскольку, как видно из вышеописанного, за последние годы накопилось множество достаточно сенсационных и противоречивых данных о репликации в митохондриях, три описанные выше схемы репликации (рис. 2) стали требовать уточнений. Основываясь на конфигурациях, наблюдаемых промежуточных репликативных комплексов, а также учитывая тип ориджина, с которого начинается репликация, Yasukawa и Kang в своем последнем обзоре [45] предложили выделять две, а не три возможных модели репликации:

1) асинхронная модель шнурка *Bootlace* объединяет модель вытеснения цепи и модель

RITOLS. Такое объединение стало возможным из-за того, как уже отмечалось выше, репликативные промежуточные комплексы для этих двух моделей действительно могут выглядеть одинаково, если предположить, что в ряде случаев, особенно в ранних работах, РНК в гибридных молекулах деградировала (рис. 2, *a* и *b*). Репликация начинается с синтеза Н-цепи в O_H или *ori b*. Синтез лидирующей цепи ДНК идет однонаправленно с одновременным включением РНК в отстающую цепь: митохондриальные транскрипты по мере прохождения вилки последовательно гибридизуются с родительской Н-цепью. Синтез отстающей цепи ДНК может инициироваться в нескольких местах, не обязательно в O_L . Молекулы РНК затем постепенно удаляются.

Стоит отметить, что такую асинхронную модель подтверждают данные, полученные методом Mito-SMARD, позволяющим наблюдать промежуточные продукты репликации с помощью флуоресцентных меток [58].

2) Strand-coupled DNA replication (SCD replication) фактически с небольшими уточнениями повторяет Strand-coupled model (рис. 2, *в*). Репликация в рамках этого механизма начинается с широкой зоны в несколько килобаз, названной *ori z*. Репликация здесь инициируется двунаправленно, и O_H , по-видимому, функционирует как барьер для репликативной вилки. Синтез лидирующей и отстающих цепей происходит синхронно, обе они состоят из ДНК. Механизм синтеза отстающей цепи пока непонятен до конца, видимо, она синтезируется отдельными фрагментами, напоминающими ядерные фрагменты Оказаки. Какой фермент выполняет роль праймазы, тоже не известно. Принято считать, что РНК-праймеры синтезирует POLRMT, но строго *in vivo* это не показано.

Обобщая данные о митохондриальных репликативных моделях, можно заключить, что пока полной ясности, по какому именно механизму идет репликация в митохондриях, нет. Более того, кажется все более вероятным, что единого механизма не существует, а в зависимости от условий репликация в митохондриях может идти немного по-разному – синхронно или асинхронно, с использованием РНК или без него.

ОСНОВНЫЕ СТАДИИ РЕПЛИКАЦИИ

Инициация репликации мтДНК. В мтДНК существуют два основных ориджина: O_H (для синтеза Н-цепи), расположенный в NCR, и O_L (для синтеза Л-цепи), расположенный в коротком некодирующем участке мтДНК внутри кластера генов пяти тРНК (*WANCY*). Оба ориджина слу-

жат для репликации только одной цепи, т.е. однонаправленны.

Инициация на O_H . Принято считать, что асинхронная репликация мтДНК (модели Bootlace-SA, Strand displacement model и RITOLS) начинается с O_H или иногда с *ori b*, который будет рассмотрен ниже. Синтез РНК-праймера для репликации начинается с промотора LSP, вероятно, функции праймазы выполняет РНК-полимераза POLRMT, по крайней мере, никакой другой специализированной праймазы в митохондриях пока не обнаружили. РНК-праймер имеет длину несколько десятков нуклеотидов, затем синтез ДНК продолжает ДНК-полимераза γ (рис. 1, *a*). В 2015 г. [59] в клетках мыши было показано присутствие ковалентных РНК–ДНК-гибридов, у которых 5'-конец РНК начинался в области LSP, а точка перехода между РНК и ДНК была либо в O_H , либо в *ori b*. Не до конца понятно, как происходит переключение с синтеза РНК на синтез ДНК, т.е. почему в некоторых случаях с LSP идет транскрипция с образованием полноразмерных молекул РНК, а в некоторых случаях образуется короткий РНК-праймер, и синтез продолжает ДНК-полимераза. В 2015 г. [20] на роль «переключателя» с транскрипции на репликацию был предложен TEFM. В опытах *in vitro* присутствие TEFM препятствовало образованию G-квадруплекса при транскрипции в участке CSBII, в результате происходила транскрипция с образованием полноразмерной РНК. Если же TEFM не было в системе, в участке CSBII РНК образовывала G-квадруплекс, транскрипция останавливалась, и образовывался короткий праймер для репликации. К сожалению, переключение с синтеза РНК на синтез ДНК в CSBII не объясняет существования ковалентных РНК–ДНК-гибридов, у которых точка перехода между РНК и ДНК находится либо в O_H , либо в *ori b*, которые находятся на расстоянии от CSBII ~ 100 и 500 нуклеотидов соответственно. Это противоречие должно быть разрешено в будущем, когда станут понятными механизмы регуляции транскрипции и репликации в митохондриях.

Инициация на O_L . Согласно моделям асинхронной репликации, синтез Л-цепи начинается в O_L . Когда репликация Н-цепи доходит до участка WANCY, в котором расположен O_L , материнская Н-цепь переходит в одноцепочечное состояние и на ней образуется петля на стебле (рис. 1, *б*). Двухцепочечный стебель защищает одноцепочечную петлю от взаимодействия с SSB, и с одноцепочечным участком взаимодействует РНК-полимераза POLRMT, синтезирующая РНК-праймер длиной ~ 25 нуклеотидов. Далее синтез продолжает ДНК-полимераза γ . Иссле-

дования O_L *in vivo* и *in vitro* показали, что функционировать как ориджин может структура с двуцепочечным стеблем, богатым пиримидинами, и одноцепочечной петлей длиной как минимум 10 нуклеотидов [60]. В связи с этим высказывается предположение [61], что возможность образования дополнительных петель на стебле на участке Н-цепи между O_L и O_H может снизить количество делеций, которые образуются при репликации из-за «залипания» прямых повторов в мтДНК друг на друга. Чем ближе находятся O_L и O_H друг к другу, тем меньше пар прямых повторов могут провзаимодействовать между собой, пока Н-цепь находится в одноцепочечном состоянии.

Делеции в мтДНК вносят существенный вклад в продолжительность жизни. В работе [61] проведено любопытное теоретическое сравнение количества возможных ориджиноподобных структур на участке между O_L и O_H у трех видов млекопитающих — мыши, человека и голого землекопа. У долгоживущего землекопа насчитывается четыре дополнительные петли, теоретически способных служить ориджином, по сравнению с мышью, имеющей короткую продолжительность жизни. У человека есть возможность образования одной дополнительной ориджиноподобной структуры. К сожалению, эта гипотеза пока не имеет экспериментальных подтверждений.

Дополнительные ориджины в мтДНК. Описано также несколько дополнительных ориджинов. *Ori b* расположен вблизи гена $tRNA^{Pro}$ [51] и впервые описан как ориджин для двунаправленной репликации (рис. 1, а). Однако по анализу промежуточных репликативных структур, согласно [50], с *ori b* начинается асинхронный однонаправленный синтез Н-цепи (рис. 2, б). Таким образом, непонятно как именно работает этот ориджин — как однонаправленный или как двунаправленный? Yasukawa и Kang [45] предлагают два возможных объяснения этому противоречию (рис. 2): 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 при анализе промежуточные структуры выглядят идентично тем, что образуются при репликации по механизму **Strand-coupled model**. В этом случае *ori b* работает только однонаправленно, и, хотя промежуточные продукты репликации выглядят как образованные при синхронной репликации

[50], они могли образоваться и при асинхронном однонаправленном синтезе.

Таким образом, детали механизма работы *ori b* при инициации репликации еще предстоит выяснить.

Двунаправленная инициация синтеза мтДНК возможна в широкой области длиной в несколько килобаз, получившей название *ori z*. Начало репликации в *ori z* показано в тканях человека, крысы и цыпленка на фрагментах мтДНК, вообще не содержащих NCR [47].

Это доказывает возможность инициации репликации вне NCR. Видимо, с *ori z* начинается синхронная репликация, описываемая моделью **Strand-coupled model**, поскольку промежуточные репликативные комплексы, образующиеся при такой инициации, устойчивы к обработке РНКазой Н, что свидетельствует об отсутствии в них РНК [45] (рис. 2, в).

ЭЛОНГАЦИЯ И ТЕРМИНАЦИЯ

ДНК-полимераза γ осуществляет репликацию, пока не пройдет полный круг. Лигирование концов ДНК для образования кольцевой молекулы в митохондриях осуществляет ДНК-лигаза 3 [63, 64]. Для правильного лигирования 5'- и 3'-концы ДНК должны точно совпасть, поэтому перед лигированием необходимо удаление РНК-праймеров РНКазой Н1 и процессинг концов молекулы ДНК. Нокаутные мыши без РНКазы Н1 не жизнеспособны, у них происходит потеря мтДНК, а в мышинных эмбриональных фибробластах, лишенных РНКазы Н1, в области ориджина сохраняются РНК-праймеры [60, 65].

Процессинг концов мтДНК для лигирования пока не исследован детально. Пройдя полный круг, ДНК-полимераза γ встречает 5'-конец только что синтезированной ею молекулы ДНК. В этом месте ДНК-полимераза γ начинает работать «вхолостую»: она осуществляет циклы полимеризации-деградации, благодаря своей 3'-5'-экзонуклеазной активности. Такая «пробуксовка» необходима для нормального лигирования: ДНК-полимераза γ без экзонуклеазной активности не «буксует», а продолжает синтез с образованием дцДНК, которая не может быть субстратом для лигирования [65]. Вероятно, именно из-за этого у мышей с дефектной ДНК-полимеразой γ без экзонуклеазной активности показано наличие одноцепочечных разрывов в области O_H [65, 66].

Вопрос точного картирования 5'-конца мтДНК перед лигированием не решен до конца. Принято считать, что в большинстве молекул

ДНК 5'-конец расположен в положении 191, это часть O_H , но каким именно образом образуется этот конец не совсем ясно [34]. Как уже отмечалось выше, место перехода РНК-праймера в ДНК картируют в разных местах: или в участке CSB II, или в O_H (положение 191 или поблизости), или даже в *ori b* (еще дальше от CSB II) (рис. 1, а). Понятно, что, если точка перехода РНК/ДНК совпадает с местом лигирования, после удаления РНК-праймера концы ДНК будут совпадать, и никакого дополнительного процессинга не требуется. В случае же несовпадения сайтов лигирования и перехода РНК-праймера в ДНК, необходимо удалить не только РНК-праймер, но и 5'-концевой участок ДНК между точкой перехода РНК/ДНК и точкой лигирования: ~100 нуклеотидов в случае РНК/ДНК переключения в O_H и ~500 нуклеотидов в случае РНК/ДНК перехода в *ori b*. В последнем случае лигирование, вероятно, должно происходить не в положении 191, а в районе локализации *ori b* (рис. 1, а).

В митохондриях охарактеризован фермент, который может удалять ДНК с 5'-конца — это 5'-3'-экзонуклеаза MGME1 [67,68]. Вероятно, активность MGME1 необходима для нормального лигирования мтДНК: в человеческих клетках с дефектной MGME1 нормального лигирования не происходило, образовывались линейные молекулы с делециями [67].

Таким образом, пока известно, что в процессировании концов мтДНК для лигирования ДНК-лигазой 3 принимает участие экзонуклеаза MGME1 и РНКаза H1. Скорее всего, в терминции репликации и лигировании участвуют и другие дополнительные ферменты, которые будут описаны в будущем.

Необходимо отметить участие топоизомераз в митохондриальной репликации. Митохондриальная изоформа топоизомеразы 1 TOP1MT работает в митохондриях совместно с реплисомой, снимая суперспирализацию ДНК [69]. Нокаутные мыши без гена *Top1mt* жизнеспособны, но у них увеличена суперспирализация мтДНК [70, 71]. Кроме того, топоизомеразная активность необходима в митохондриях для разъединения катенанов, которые образуются при репликации кольцевых геномов. Эту функцию, по-видимому, выполняет митохондриальная изоформа Top3 α . Показано, что потеря Top3 α приводит к уменьшению количества мтДНК и формированию сети из катенанов вместо единичных кольцевых молекул. У пациентов с мутациями в Top3 α проявляются те же симптомы, что и при мутациях в других ферментах митохондриальной репликации — делеции в мтДНК в мышцах и хроническая офтальмоплегия [72]. Конкрет-

ный механизм работы Top3 α в митохондриях еще предстоит описать, но уже сейчас можно предполагать, что этот фермент работает в комплексе с несколькими другими белками, как это показано для него в ядре. Но поскольку в митохондриях не показана локализация ни одного из известных ядерных партнеров Top3 α , скорее всего, механизм работы этой топоизомеразы в митохондриях немного отличается от описанного в ядре [72].

Итак, в последние годы достигнут существенный прогресс в исследованиях митохондриальной репликации. Некоторые исследователи рассматривают три модели репликации, некоторые — две модели: синхронную и асинхронную. Но ни одна из моделей не описывает все имеющиеся экспериментальные данные. Поэтому единой модели репликации человеческого митохондриального генома, видимо, просто не существует.

Можно предполагать, что митохондрия, будучи потомком α -протеобактерий, попавших в уникальные условия симбиоза с эукариотической клеткой, способна реплицировать свой геном по-разному в зависимости от своих внутренних потребностей и потребностей клетки в целом. С одной стороны, репликация в митохондриях происходит автономно (независимо от клеточного цикла), большинство ферментов репликации отличаются от ядерных. С другой стороны, митохондриальная репликация контролируется ядром клетки: все репликативные ферменты закодированы в ядерном геноме, экспрессия их генов контролируется клеткой на разных уровнях. Видимо, эндосимбиотическое происхождение и, как его следствие, — полуавтономность и позволяют митохондриям реализовывать разные схемы репликации.

Митохондриальную репликацию обеспечивает уникальный набор ферментов. ДНК-полимераза γ , хеликаза TWINKLE и РНК-полимераза POLRMT имеют высокую степень гомологии с соответствующими ферментами фага T7 [73] и работают в человеческих клетках только в митохондриях; транскрипционный фактор TFBM2, необходимый для инициации транскрипции, в том числе и для инициации синтеза РНК-праймеров для репликации, произошел от рРНК-метилтрансферазы α -протеобактерий [74]. Такое необычное сочетание ферментов, имеющих разное происхождение и часто обладающими дополнительными ферментативными активностями, помимо основной, вероятно, может дать возможность для репликации разными способами.

Кроме того, сам митохондриальный геном тоже имеет уникальные черты. В одной из цепей

мтДНК значительно больше гуанина, что повышает ее плавучую плотность, и отразилось в названии — «тяжелая цепь». В составе обеих цепей мтДНК встречаются рибонуклеотидные вставки [23], что необычно для двуцепочечных кольцевых ДНК-геномов. В человеческом митогеноме большое количество ориджиннов, среди которых встречаются однонаправленные и двунаправленные. Не известно, являются ли эти особенности следствием как раз уникальности ферментативного аппарата, или же, наоборот, столь необычное сочетание ферментов потребовалось для воспроизведения не совсем обычного генома. Тем не менее, репликативная машина митохондрий, возникшая в результате симбиоза, успешно обслуживает митохондриальный геном, проявляя неожиданное разнообразие стратегий.

По работам последних лет складывается впечатление, что в митохондриях преобладает асинхронная репликация. Это подтверждается большим количеством как прямых экспериментальных исследований (см., например, [58]), так и косвенными данными. Высокое содержание гуанина в тяжелой цепи легко объяснить асинхронной репликацией: материнская Н-цепь долгое время остается в одноцепочечном состоянии, и в ней происходит спонтанное дезаминирование цитозина с образованием тимина и аденина с образованием гуанина, что постепенно «обогащает» Н-цепь гуанином [39]. Большинство детектируемых делеций, фланкированных прямыми повторами, в мтДНК человека происходит в «Major arc» — между O_H и O_L , несмотря на то что число прямых повторов почти в два раза больше в «Minor arc» — участке между O_L и

O_H . Этот факт также может быть объяснен асинхронной репликацией — именно в одноцепочечном участке материнской Н-цепи между O_H и O_L может происходить залипание прямых повторов друг на друга, что и приводит к делециям [61].

Тем не менее, экспериментальных данных, указывающих на синхронную репликацию, подробно описанных в данном обзоре, также много. Можно предположить, что синхронная репликация необходима в каких-то специфических условиях, например, когда нужно быстро получить большое число геномов. Вероятно, существует некая регуляция, позволяющая митохондриям выбирать репликативный механизм. Более того, в сердце человека кольцевой митохондриальный геном перестраивается в сеть из линейных геномов [8] и тоже каким-то образом реплицируется, что говорит об очень широком спектре возможных репликативных механизмов в митохондриях. Детали этих механизмов, а также способы их регуляции, которые являются очень интересными и необычными, предстоит исследовать в будущем.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-04-01110).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burger, G., Gray, M.W., and Lang, B.F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes, *Trends Genet.*, **19**, 709–716, doi: 10.1016/j.tig.2003.10.012.
- Kolesnikov, A.A., and Gerasimov, E.S. (2012) Diversity of mitochondrial genome organization, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1424–1435, doi: 10.1134/S0006297912130020.
- Gualberto, J.M., Milesina, D., Wället, C., Niazi, A.K., Weber-Lotfi, F., and Dietrich, A. (2014) The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance, *Biochimie*, **100**, 107–120, doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.016.
- Sloan, D.B., Alverson, A.J., Chuckalovcak, J.P., Wu, M., McCauley, D.E., Palmer, J.D., and Taylor, D.R. (2012) Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates, *PLoS Biol.*, **10**, e1001241, doi: 10.1371/journal.pbio.1001241.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **440**, 325–331, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01467-7.
- 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*, **290**, 457–465, doi: 10.1038/290457a0.
- Pohjoismäki, J.L.O., and Goffart, S. (2011) Of circles, forks and humanity: topological organisation and replication of mammalian mitochondrial DNA, *Bioessays*, **33**, 290–299, doi: 10.1002/bies.201000137.
- Pohjoismäki, J.L.O., 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.*, **284**, 21446–21457, doi: 10.1074/jbc.M109.016600.
- Zinovkina, L.A. (2018) Mechanisms of mitochondrial DNA repair in mammals, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 233–249, doi: 10.1134/S0006297918030045.

10. Spelbrink, J.N. (2010) Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges, *IUBMB Life*, **62**, 19–32, doi: 10.1002/iub.282.
11. Bogenhagen, D.F. (2012) Mitochondrial DNA nucleoid structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 914–920, doi: 10.1016/j.bbagr.2011.11.005.
12. Brown, T.A., Tkachuk, A.N., Shtengel, G., Kopeck, B.G., Bogenhagen, D.F., Hess, H.F., and Clayton, D.A. (2011) Superresolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4994–5010, doi: 10.1128/MCB.05694-11.
13. Kukat, C., Wurm, C.A., Spähr, 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*, **108**, 13534–12539, doi: 10.1073/pnas.1109263108.
14. Lee, S.R., and Han, J. (2017) Mitochondrial nucleoid: shield and switch of the mitochondrial genome, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 8060949, doi: 10.1155/2017/8060949.
15. Bogenhagen, D.F., Rousseau, D., and Burke, S. (2008) The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids, *J. Biol. Chem.*, **283**, 3665–3675, doi: 10.1074/jbc.M708444200.
16. 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*, **7**, 311–321, doi: 10.1016/j.mito.2007.06.004.
17. 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, doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.017.
18. Arnold, J.J., Smidansky, E.D., Moustafa, I.M., and Cameron, C.E. (2012) Human mitochondrial RNA polymerase: structure–function, mechanism and inhibition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 948–960, doi: 10.1016/j.bbagr.2012.04.002.
19. 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.*, **18**, 1290–1296, doi: 10.1038/nsmb.2159.
20. Agaronyan, K., Morozov, Y.I., Anikin, M., and Temiakov, D. (2015) Mitochondrial biology. Replication–transcription switch in human mitochondria, *Science*, **347**, 548–551, doi: 10.1126/science.aaa0986
21. Morozov, Y.I., Parshin, A. V, Agaronyan, K., Cheung, A.C.M., Anikin, M., Cramer, P., and Temiakov, D. (2015) A model for transcription initiation in human mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 3726–3735, doi: 10.1093/nar/gkv235.
22. Yin, Y.W. (2011) Structural insight on processivity, human disease and antiviral drug toxicity, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 83–91, doi: 10.1016/j.sbi.2010.12.001.
23. Berglund, A.-K., Navarrete, C., Engqvist, M.K.M., Hoberg, E., Szilagyi, Z., Taylor, R.W., Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., and Clausen, A.R. (2017) Nucleotide pools dictate the identity and frequency of ribonucleotide incorporation in mitochondrial DNA, *PLoS Genet.*, **13**, e1006628, doi: 10.1371/journal.pgen.1006628.
24. Kazak, L., Reyes, A., and Holt, I.J. (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 726–726, doi: 10.1038/nrm3439.
25. McKinney, E.A., and Oliveira, M.T. (2013) Replicating animal mitochondrial DNA, *Genet. Mol. Biol.*, **36**, 308–315, doi: 10.1590/S1415-47572013000300002.
26. Satoh, M., and Kuroiwa, T. (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell, *Exp. Cell Res.*, **196**, 137–140, doi: 10.1016/0014-4827(91)90467-9.
27. Iborra, F.J., Kimura, H., and Cook, P.R. (2004) The functional organization of mitochondrial genomes in human cells, *BMC Biol.*, **2**, 9, doi: 10.1186/1741-7007-2-9.
28. Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A., and Rojo, M. (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA, *J. Cell Sci.*, **117**, 2653–2662, doi: 10.1242/jcs.01134.
29. 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.*, **181**, 1117–1128, doi: 10.1083/jcb.200712101.
30. Van Blerkom, J. (2011) Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence, *Mitochondrion*, **11**, 797–813, doi: 10.1016/j.mito.2010.09.012.
31. 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*, **18**, 3225–3236, doi: 10.1091/mbc.e07-05-0404.
32. Farge, G., Mehmedovic, M., Baclayon, M., van den Wildenberg, S.M.J.L., Roos, W.H., Gustafsson, C.M., Wuite, G.J.L., and Falkenberg, M. (2014) *In vitro*-reconstituted nucleoids can block mitochondrial DNA replication and transcription, *Cell Rep.*, **8**, 66–74, doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.046.
33. Kukat, C., Davies, K.M., Wurm, C.A., Spähr, H., Bonekamp, N.A., Köhl, I., Joos, F., Polosa, P.L., Park, C.B., Posse, V., Falkenberg, M., Jakobs, S., Köhlbrandt, W., and Larsson, N.-G. (2015) Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 11288–11293, doi: 10.1073/pnas.1512131112.
34. Falkenberg, M. (2018) Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway, *Essays Biochem.*, **62**, 287–296, doi: 10.1042/EBC20170100.
35. Lewis, S.C., Uchiyama, L.F., and Nunnari, J. (2016) ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells, *Science*, **353**, 5549, doi: 10.1126/science.aaf5549.
36. Malka, F., Lombès, A., and Rojo, M. (2006) Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: focus on vertebrate nucleoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 463–472, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.04.001.
37. Wang, J., Schmitt, E.S., Landsverk, M.L., Zhang, V.W., Li, F.-Y., Graham, B.H., Craigen, W.J., and Wong, L.-J.C. (2012) An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience, *Genet. Med.*, **14**, 620–626, doi: 10.1038/gim.2012.4.
38. 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.*, **13**, 3171–3179, doi: 10.1093/hmg/ddh326.
39. Kennedy, S.R., Salk, J.J., Schmitt, M.W., and Loeb, L.A. (2013) Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage, *PLoS Genet.*, **9**, e1003794, doi: 10.1371/journal.pgen.1003794.

40. Nicholls, T.J., and Minczuk, M. (2014) In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA, *Exp. Gerontol.*, **56**, 175–181, doi: 10.1016/j.exger.2014.03.027.
41. Arnberg, A., van Bruggen, E.F., and Borst, P. (1971) The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, **246**, 353–357, doi: 10.1016/0005-2787(71)90147-X.
42. Jemt, E., Persson, Ö., Shi, Y., Mehmedovic, M., Uhler, J.P., Dávila López, M., Freyer, C., Gustafsson, C.M., Samuelsson, T., and Falkenberg, M. (2015) Regulation of DNA replication at the end of the mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE and a conserved sequence element, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 9262–9275, doi: 10.1093/nar/gkv804.
43. Robberson, D.L., Kasamatsu, H., and Vinograd, J. (1972) Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 737–741.
44. Fusté, 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*, **37**, 67–78, doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.021.
45. Yasukawa, T., and Kang, D. (2018) An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms., *J. Biochem.*, **164**, 183–193, doi: 10.1093/jb/mvy058.
46. Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA, *Cell*, **100**, 515–524, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80688-1.
47. 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.*, **278**, 50961–50969, doi: 10.1074/jbc.M308028200.
48. Holt, I.J., and Jacobs, H.T. (2014) Unique features of DNA replication in mitochondria: a functional and evolutionary perspective, *Bioessays*, **36**, 1024–1031, doi: 10.1002/bies.201400052.
49. 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*, **111**, 495–505, doi: 10.1016/S0092-8674(02)01075-9.
50. 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.*, **25**, 5358–5371, doi: 10.1038/sj.emboj.7601392.
51. Yasukawa, T., Yang, M.-Y., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2005) A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA, *Mol. Cell*, **18**, 651–662, doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.002.
52. 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.*, **41**, 5837–5850, doi: 10.1093/nar/gkt196.
53. Bogenhagen, D.F., and Clayton, D.A. (2003) The mitochondrial DNA replication bubble has not burst, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 357–360, doi: 10.1016/S0968-0004(03)00132-4.
54. Bogenhagen, D.F., and Clayton, D.A. (2003) Concluding remarks: the mitochondrial DNA replication bubble has not burst, *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 404–405, doi: 10.1016/S0968-0004(03)00165-8.
55. Holt, I.J., and Jacobs, H.T. (2003) Response: the mitochondrial DNA replication bubble has not burst., *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 355–6, doi: 10.1016/S0968-0004(03)00133-6.
56. Pohjoismäki, J.L.O., 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.*, **397**, 1144–1155, doi: 10.1016/j.jmb.2010.02.029.
57. Miralles Fusté, J., Shi, Y., Wanrooij, S., Zhu, X., Jemt, E., Persson, Ö., Sabouri, N., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2014) *In vivo* occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication, *PLoS Genet.*, **10**, e1004832, doi: 10.1371/journal.pgen.1004832.
58. Phillips, A.F., Millet, A.R., Tigano, M., Dubois, S.M., Crimmins, H., Babin, L., Charpentier, M., Piganeau, M., Brunet, E., and Sfeir, A. (2017) Single-molecule analysis of mtDNA replication uncovers the basis of the common deletion, *Mol. Cell*, **65**, 527–538, doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.014.
59. Holmes, J.B., Akman, G., Wood, S.R., Sakhujia, K., Cerritelli, S.M., Moss, C., Bowmaker, M.R., Jacobs, H.T., Crouch, R.J., and Holt, I.J. (2015) Primer retention owing to the absence of RNase H1 is catastrophic for mitochondrial DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 9334–9339, doi: 10.1073/pnas.1503653112.
60. Wanrooij, S., Miralles Fusté, J., Stewart, J.B., Wanrooij, P.H., Samuelsson, T., Larsson, N.-G., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2012) *In vivo* mutagenesis reveals that OriL is essential for mitochondrial DNA replication, *EMBO Rep.*, **13**, 1130–1137, doi: 10.1038/embor.2012.161.
61. Khaidakov, M. (2016) Species-specific lifespans: can it be a lottery based on the mode of mitochondrial DNA replication? *Mech. Ageing Dev.*, **155**, 1–6, doi: 10.1016/j.mad.2016.02.012.
62. Lakshmiopathy, U., and Campbell, C. (1999) The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3869–3876.
63. Puebla-Osorio, N., Lacey, D.B., Alt, F.W., and Zhu, C. (2006) Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3935–3941, doi: 10.1128/MCB.26.10.3935-3941.2006.
64. Cerritelli, S.M., Frolova, E.G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P.E., and Crouch, R.J. (2003) Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice, *Mol. Cell*, **11**, 807–815, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00088-1.
65. Macao, B., Uhler, J.P., Siibak, T., Zhu, X., Shi, Y., Sheng, W., Olsson, M., Stewart, J.B., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2015) The exonuclease activity of DNA polymerase γ is required for ligation during mitochondrial DNA replication, *Nat. Commun.*, **6**, 7303, doi: 10.1038/ncomms8303.
66. Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H.T., and Larsson, N.-G. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase, *Nature*, **429**, 417–423, doi: 10.1038/nature02517.
67. Nicholls, T.J., Zsurka, G., Peeva, V., Schöler, S., Szczesny, R.J., Cysewski, D., Reyes, A., Kornblum, C., Sciacco, M., Moggio, M., Dziembowski, A., Kunz, W.S., and Minczuk, M. (2014) Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of

- MGME1 exonuclease, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 6147–6162, doi: 10.1093/hmg/ddu336.
68. Kornblum, C., Nicholls, T.J., Haack, T.B., Schöler, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., Zsurka, G., Rorbach, J., Iuso, A., Wieland, T., Sciacco, M., Ronchi, D., Comi, G.P., Moggio, M., Quinzii, C.M., DiMauro, S., Calvo, S.E., Mootha, V.K. et al. (2013) Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease, *Nat. Genet.*, **45**, 214–219, doi: 10.1038/ng.2501.
 69. Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G., and Champoux, J.J. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I, *Science*, **279**, 1534–1541, doi: 10.1126/science.279.5356.1534.
 70. Douarrure, C., Sobier, C., Dalla Rosa, I., Brata Das, B., Redon, C.E., Zhang, H., Neckers, L., and Pommier, Y. (2012) Mitochondrial topoisomerase I is critical for mitochondrial integrity and cellular energy metabolism, *PLoS One*, **7**, e41094, doi: 10.1371/journal.pone.0041094.
 71. Zhang, H., Zhang, Y.-W., Yasukawa, T., Dalla Rosa, I., Khiati, S., and Pommier, Y. (2014) Increased negative supercoiling of mtDNA in TOP1mt knockout mice and presence of topoisomerases II α and II β in vertebrate mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7259–7267, doi: 10.1093/nar/gku384.
 72. Nicholls, T.J., Nadalutti, C.A., Motori, E., Sommerville, E.W., Gorman, G.S., Basu, S., Hoberg, E., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F., Larsson, N.-G., Larsson, E., Falkenberg, M., Taylor, R.W., Griffith, J.D., and Gustafsson, C.M. (2018) Topoisomerase 3 α is required for decatenation and segregation of human mtDNA, *Mol. Cell*, **69**, 9–23, doi: 10.1016/j.molcel.2017.11.033.
 73. Huynen, M.A., Duarte, I., and Szklarczyk, R. (2013) Loss, replacement and gain of proteins at the origin of the mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 224–231, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.08.001.
 74. Shutt, T.E., and Gray, M.W. (2006) Homologs of mitochondrial transcription factor B, sparsely distributed within the eukaryotic radiation, are likely derived from the dimethyladenosine methyltransferase of the mitochondrial endosymbiont, *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 1169–1179, doi: 10.1093/molbev/msk001.

DNA REPLICATION IN HUMAN MITOCHONDRIA

L. A. Zinovkina

*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
119234 Moscow, Russia; E-mail: luzinovkina@yandex.ru*

Received March 26, 2019

Revised April 16, 2019

Accepted April 16, 2019

DNA replication in human mitochondria has been studied for several decades; however, its mechanism still remains unclear. During the last 15 years, many new experimental data on the mitochondrial replication have appeared, although extremely contradictory. Two asynchronous (strand displacement and RITOLS) and one synchronous (strand-coupled) replication models have been proposed. In the asynchronous models, replication from the origin in the H-chain starts earlier, so that the replication of the two chains ends at different times. The synchronous model is more traditional and implies two replication forks with leading and lagging strands initiated at the same origin. For each of the three models, both confirming and contradicting experimental data exist. Most likely, there is no single model of mitochondrial replication. It is possible that the unique mitochondrial replication machinery that has originated as a result of endosymbiosis has an unexpected variety of replication strategies to maintain the mitochondrial genome. An unusual combination of enzymes of different origin (phage, bacterial, eukaryotic) and unique features of the mitochondrial genome (existence of heavy and light chains, insertions of ribonucleotides, a variety of origins) can allow replication through different mechanisms. In human mitochondria, asynchronous replication seems to dominate; however, synchronous replication is also possible under certain conditions. In the human heart mitochondria, circular mitochondrial DNA (mtDNA) molecules can rearrange in a network of rapidly replicating linear genomes, thereby suggesting possible existence of a wide range of replication mechanisms in the mitochondria. The review describes the main stages of mtDNA replication and enzymes involved in this process, as well as discusses the prospects of mitochondrial replication studies.

Keywords: mtDNA, nucleoid, D-loop, replication, strand displacement model, RITOLS, strand-coupled model