Н.Г.Даниленко
О.Г.Давыденко

МИРЫ *геномов органелл*

Н.Г.Данилюк
О.Г.Данильченко

МОЗАИКИ геномов организмов

ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

Н.Г.Даниленко
О.Г.Давыденко

МИРЫ *геномов органелл*

Минск
«Тэхналогія»
2003

УДК 575

Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл / Н.Г. Даниленко, О.Г. Давыденко. — Мн.: Тэхналогія, 2003. — 494 с. — ISBN 985-458-077-6.

Книга посвящена проблемам молекулярной генетики пластид и митохондрий, особенностям функционирования их геномов в клетке, взаимодействию генетических систем ядра и цитоплазмы. В монографии отражен целый мир новых концепций и представлений внеядерной генетики, бурно развивающейся в последние 20 лет.

Адресуется ученым, работающим в различных отраслях генетики и молекулярной биологии клетки, аспирантам и студентам соответствующего профиля. Может быть полезна специалистам в области биотехнологии, медицины и селекции.

Табл. 43. Ил. 126. Библиогр.: 1409 назв.

ISBN 985-458-077-6

© Даниленко Н.Г.,
Давыденко О.Г., 2003
© «Тэхналогія», 2003

Содержание

Предисловие 11

Глава 1. **Особенности наследования клеточных органелл. Гены органелл не подчиняются законам Менделя** 13

Множественность органельных геномов и случайное распределение органелл в клетке создает предпосылки для соматической сегрегации генов органелл 14
Передача органелл и органельных генов в половом процессе 16
Материнское наследование органелл 17
Двуродительское наследование органелл 18
Отцовское наследование 18
Определение характера наследования органелл 19
Клеточные механизмы контроля передачи органелл 22
Цитологические механизмы передачи пластид через половые клетки 23
Дегенерация пластид 25
Исключение органелл из мужских половых клеток 25
Цитологические механизмы передачи пластид материнского растения в зиготу . 27
Генетика наследования органелл 28
Литература 31

Глава 2. **Генетическая система пластид** 35

Краткая история обнаружения ДНК в пластидах 36
Методы световой микроскопии 36
Электронная микроскопия 38
Авторадиографические исследования 38
Исследование изолированных пластид 39
Особенности пластидной ДНК 40
Нуклеотидный состав 40
Конфигурация 40
Размер и плоидность генома 42
Нуклеоид — пластидное "ядро" 43
Первичная структура пластидной ДНК растений 45
Хлоропластные гены — идентификация и локализация 50
Пластидные гены — "генетические" и фотосинтетические 55
Гены, контролирующие формирование генетического аппарата пластид 55
"Фотосинтетические" гены пластид 59
Гены NADH-дегидрогеназы 63
Литература 65

Глава 3. **Регуляция экспрессии генома пластид** 69

Деление пластид и репликация пластидной ДНК 70
Транскрипция пластидных генов 72

Хлоропластные промоторы ... 73
Белковые факторы контролируют активность промоторов ... 75
РНК-полимеразы пластид ... 76
Ядерная РНК-полимераза пластид ... 80
Регуляция транскрипции ... 82
Промоторы, регуляторные белки, конформация ДНК ... 82
Метилирование ДНК и транскрипция ... 83
Между транскрипцией и трансляцией ... 85
Накопление пластидной мРНК контролируется онтогенетическими программами и факторами среды ... 85
Процессинг и стабильность РНК молекул ... 87
Интроны пластидных генов ... 92
Сплайсинг ... 97
Экспрессия пластидных генов — трансляционный и посттрансляционный контроль ... 102
Регуляция трансляции ... 102
Транс-факторы инициации трансляции кодируются ядром ... 105
Свет активирует трансляцию фотосинтетических белков пластид ... 110
Посттрансляционный контроль экспрессии пластидных генов ... 110
Литература ... 114

Глава 4. Митохондриальный геном растений — организация и экспрессия ... 121

Организация молекул митохондриальной ДНК растений ... 122
Митохондриальные плазмиды ... 129
Репликация митохондриального генома растений ... 131
Гены митохондрий ... 132
Интроны митохондриальных генов ... 138
Экспрессия митохондриальных генов ... 143
Транскрипция митохондриальных генов растений и ее регуляция ... 143
Промоторы ... 144
РНК-полимераза ... 147
ДНК-связывающиеся регуляторные белки в митохондриях растений ... 148
Регуляция транскрипции ... 150
Посттранскрипционная регуляция экспрессии генома митохондрий растений ... 151
Сплайсинг митохондриальных интронов растений ... 151
3'-процессинг транскриптов ... 154
Полиаденилирование мРНК митохондрий, деградация митохондриальных РНК-матриц ... 154
Трансляция митохондриальных генов растений ... 157
Литература ... 158

Глава 5. Организация митохондриального генома грибов ... 167

Митохондриальный геном дрожжей ... 168
Митохондриальная ДНК дрожжей — кольцевая или линейная? ... 168
Размер и нуклеотидный состав митохондриальных геномов дрожжей ... 169

Гены, кодируемые митохондриальной ДНК дрожжей 171
Рекомбинации митохондриального генома дрожжей 176
Митохондриальный геном *Neurospora* 177
Митохондриальные плазмиды Neurospora 178
Геномы митохондриальных плазмид Neurospora 179
Аномалии митохондриального генома и старение 182
Транскрипция митохондриальных генов и ее регуляция 184
Митохондриальная РНК-полимераза Saccharomyces 185
Регуляция транскрипции 186
РНК-процессинг 189
РНК-сплайсинг 190
Регуляция трансляции митохондриального генома дрожжей 191
Белки ядерного кодирования — регуляторы трансляции митохондрий 193
Литература 196
Глава 6. Организация митохондриального генома животных 201
Гены митохондриальных ДНК животных — "уплотненная" организация 203
Гены рибосомальных и транспортных РНК 205
Гены белков митохондрий 207
Область D-петли и репликация митохондриальной ДНК 208
Митохондриальная ДНК-полимераза 209
Инициация транскрипции на LSP-промоторе 210
Процессинг РНК-праймера 212
Асинхронность репликации H- и L-цепей митохондриальной ДНК 213
Регуляция репликации митохондриальной ДНК с помощью специфических белковых факторов 213
Транскрипция митохондриальных генов 215
Процессинг митохондриальных транскриптов 217
Митохондриальный геном человека 218
Литература 223
Глава 7. Происхождение клеточных органелл. Теория симбиоза 227
Ближайшие родственники митохондрий — α-протеобактерии 228
Митохондриальный геном *Reclinomonas americana* — бактериальный геном "в миниатюре" 230
Эволюционные изменения "генетической компетентности" митохондрий 235
Гипотезы происхождения митохондрий 236
Водородная гипотеза происхождения первых эукариот 238
Митохондриальный геном простейших — бесконечное разнообразие 240
Происхождение пластид, особенности эволюции пластидных геномов 243
Эндосимбиоз и первичные пластиды 245
Пигменты и общий предок пластид 245
Пластиды и повторные эндосимбиозы 247
Нуклеоморфы — "пластидные ядра" 247
Геномы облигатных внутриклеточных паразитов и нуклеоморфы 249

Зеленое животное Elysia chlorotica — уникальный симбиоз 250
Литература 251

Глава 8. Перемещение органельных генов в ядро. Взаимодействие клеточных геномов 255

Редукция органельных геномов 256
Изменение локализации органельных генов 259
Механизм переноса органельных генов в ядро 262
Экспрессия транслоцированных генов 265
Происходит ли обратный перенос генов из ядра в органеллы? 268
Почему гены органелл переносятся в ядро? 269
Взаимодействие геномов ядра и органелл 270
Контроль ядра за делением и развитием хлоропластов 270
Ядерные гены, необходимые для синтеза специфических белков пластид 272
Пластиды и регуляция экспрессии ядерных генов 273
Взаимодействие геномов ядра и митохондрий у дрожжей 276
Митохондрии регулируют экспрессию ядерных генов 277
Взаимодействие геномов ядра и митохондрий у растений 280
Импорт белков в митохондрии 282
Внутриклеточное распределение ферментов — механизмы регуляции 285
Литература 287

Глава 9. Изменение генетической структуры органелл. Мутации спонтанные и индуцированные 295

Спонтанные мутации органельных геномов 299
Горячие точки при структурных реорганизациях органельных геномов 304
Происхождение малых повторов и возможность обратной транскрипции в органеллах 307
Индуцированные мутации органельных геномов 309
Индукция органельных мутаций химическими мутагенами 310
Локализация органельных мутаций chlorina у подсолнечника 310
Идентификация первичных изменений в органельных ДНК при точечных мутациях . 314
Мутации органельных геномов, индуцированные ядерными генами-мутаторами 318
Культивирование растений in vitro и мутации органельных ДНК 321
Литература 324

Глава 10. РНК-редактирование: генетическая информация корректируется после транскрипции 331

Редактирование митохондриальной мРНК кинетопластных простейших 332
Механизм редактирования кинетопластной мРНК 333
Эдитинг митохондриальной мРНК плесневого гриба *Physarum polycephalum* 337
Эдитинг митохондриальных мРНК растений 338
Ферменты эдитинга митохондриальных мРНК растений и его специфичность . 341
Эдитинг некодирующих участков транскриптов митохондрий 343
Эдитинг и посттранскрипционные процессы 344
Эдитинг и продукты экспрессии 344

Редактирование структурных РНК ... 345
Эдитинг хлоропластных мРНК растений ... 350
Редактирование в хлоропластах, процессинг и трансляция ... 354
Специфичность эдитинга мРНК хлоропластов ... 355
Ферменты эдитинга пластидных мРНК ... 358
Сходство пластидных и митохондриальных систем РНК-эдитинга у растений ... 358
Происхождение и эволюция РНК-редактирования ... 359
Литература ... 363

Глава 11. Молекулярно-генетическая природа цитоплазматической мужской стерильности растений ... 369
Происхождение ЦМС-растений и ядерных генов-восстановителей фертильности ... 370
ЦМС и клеточные органеллы ... 372
Химерные гены в митохондриях и происхождение ЦМС ... 372
Экспрессия ЦМС-генов в митохондриях ... 378
Транскрипция локусов, связанных с ЦМС ... 378
РНК-эдитинг и ЦМС ... 380
Трансляция ЦМС-генов ... 381
Ядерные гены-восстановители фертильности: механизм действия ... 382
Эффект генов Rf на митохондриальный геном ... 382
Эффект генов Rf на экспрессию ЦМС-локусов ... 384
Эффект генов Rf на посттрансляционную регуляцию ... 385
Эффект генов Rf на РНК-редактирование ... 386
Гены Rf — клонирование in vitro ... 387
ЦМС у пшеницы: ядерно-плазменный конфликт ... 388
Природа дефектов, возникающих при ЦМС ... 390
ЦМС и апоптоз ... 392
Литература ... 394

Глава 12. Ядерно-плазменные химеры и моделирование растительной клетки ... 401
Реципрокные гибриды, алло- и изоплазматические линии ... 402
Ядерно-цитоплазматический гетерозис — реальность или иллюзия? ... 411
Геном какой органеллы важнее? ... 412
Гибридизация путем слияния протопластов — моделирование ядерно-плазменных клеточных химер *in vitro* ... 413
Сегрегация органелл у соматических гибридов ... 413
Рекомбинация органельных ДНК у соматических гибридов ... 415
Соматическая гибридизация и замещение клеточных органелл у животных ... 417
Литература ... 420

Глава 13. Направленная трансформация — моделирование органельных геномов. Инвертированная генетика ("генетика наоборот") ... 427
Генетическая трансформация органелл ... 428
Направленная трансформация хлоропластов ... 430

Стабильность трансформированных хлоропластов 431
Метод трансформации пластома — подход к проблемам цитоплазматической генетики 433
Транспластомные растения перспективнее трансгенных 438
Метод трансформации пластома и задачи биотехнологии 440
Направленная трансформация органелл и внутриклеточное перераспределение генов 442
Инвертированная генетика — новое направление науки о генах 444
Инвертированная генетика и функция неизвестных пластидных генов 444
Литература 450

Глава 14. Митохондриальный геном человека и проблемы медицинской генетики 453

Особенности митохондриальной генетики и проявление патологий 454
Крупные делеции и дупликации митохондриальных ДНК человека 456
Множественные делеции. Истощение митохондриальной ДНК 459
Точечные мутации митохондриальных ДНК 461
Мутации генов рибосомальных РНК 461
Мутации генов транспортных РНК 461
Мутации белок-кодирующих генов 465
Митохондриальная ДНК — мишень для мутаций и дисфункций 468
Патологии с неустановленными причинами митохондриальных дисфункций 468
Митохондриальный геном и канцерогенез 471
Митохондриальный геном и старение 475
Мутации митохондриального генома и старение 476
Митохондриальный геном и апоптоз 482
Литература 483

Заключение 490

Перечень основных публикаций сотрудников лаборатории нехромосомной наследственности (1980—2002 гг.) 491

Предисловие

ИНФОРМАЦИОННЫЙ взрыв в молекулярной биологии и особенно в исследовании органельных геномов привел к формированию целого мира новых концепций и представлений. Отрасль генетики, именуемая цитоплазматической (нехромосомной) генетикой, почти так же стара, как и сама генетика. Тем не менее в течение последних двух десятилетий эта ветвь чрезвычайно разрослась и внедрилась в различные отрасли эволюционной теории, сельскохозяйственной генетики, медицины и т.д.

Авторы настоящей монографии работают в области цитоплазматической генетики более 30 лет и не перестают удивляться, с какой стремительностью идет накопление информации о крошечных внутриклеточных геномах пластид и митохондрий. Поэтому было очень нелегко поставить точку в каждой из глав этой книги.

Опубликовано большое количество прекрасных обзоров и монографий, описывающих отдельные вопросы цитоплазматической генетики. В их числе книги таких крупных ученых, как R.Sager, J.Kirk и R.Tilney-Bassett, P.Grun, R.Hagemann, R.Herrmann, K.Tsunewaki, L.Margulis, А.Н.Палилова, Г.Гаузе, М.С.Одинцова и др., которые появились в "домолекулярную" и "раннюю молекулярную" эру развития цитоплазматической генетики. Однако до настоящего времени не написана монография, которая освещала бы основные направления молекулярной генетики клеточных органелл.

Без проникновения в мир органельных геномов невозможно понять ни эволюцию эукариот, ни молекулярные основы множества заболеваний, необходимы эти знания и для разработки новейших методов селекции растений и сельскохозяйственных животных. Поэтому основные вопросы, рассматриваемые в данной монографии, касаются молекулярной структуры органельных геномов и особенностей их функционирования в клетке при взаимодействии с ядром и под его руководством.

Мы полагаем, что наша книга будет весьма полезной как для специалистов, работающих в различных отраслях генетики и молекулярной биологии клетки, так и для тех, кто только начинает обучение этим наукам.

Книга состоит из четырнадцати глав, содержит множество таблиц и рисунков и ссылки на более чем 1400 источников. Первая глава посвящена особенностям наследования клеточных органелл и причинам нарушения при этом законов Менделя.

Во второй и третьей главах рассматривается пластидный геном, его организация и особенности экспрессии. Главы 4—6 описывают особенности митохондриального генома и его функционирование в трех царствах эукариот — растениях, грибах, животных.

В седьмой главе обсуждается вопрос возникновения эукариотической клетки и описываются свободно живущие организмы — предшественники органелл, участвовавшие в образовании симбиотической клетки эукариот. Важнейшие моменты внутриклеточного перераспределения генов, редукции органельных геномов и координации экспрессии генов ядра и органелл рассматриваются в главе 8. Различные типы мутаций органельных геномов описываются в главе 9, особое внимание уделяется вопросам их индукции и идентификации.

Отдельная глава — десятая — посвящена вопросу РНК-редактирования: генетическому феномену посттранскрипционной модификации заложенной в ДНК информации. РНК-редактирование характерно в основном для органельных генетических систем.

Хорошо известный в течение долгих лет и широко используемый в практике феномен цитоплазматической мужской стерильности у растений может быть наконец расшифрован благодаря новым молекулярным данным, обсуждаемым в главе 11.

Экспериментальные модели как инструмент изучения ядерно-цитоплазматического взаимодействия рассматриваются в главах 12—13 со специальным обсуждением аллоплазматических линий, соматических гибридов и направленной трансформации органельных геномов. Обсуждается так называемая "инвертированная", или "обратная", генетика — новый подход к исследованию неизвестных генов.

И наконец, в главе 14 мы попытались ознакомить читателя с аномалиями митохондриального генома человека, что сегодня является наиболее стремительно развивающейся областью цитоплазматической генетики. Интенсивное исследование связи между особенностями митохондриального генома человека и различными болезнями (в том числе онкологическими), а также процессами старения — предмет "митохондриальной медицины" и заключительной главы данной монографии.

Глава 1

Особенности наследования клеточных органелл. Гены органелл не подчиняются законам Менделя

В ОТЛИЧИЕ от менделевских генов, расположенных в аутосомах клеточного ядра, гены органелл постоянно пребывают в полиплоидном состоянии, не объединяются в зиготе в равных соотношениях и достаточно случайно распределяются при митотическом делении клетки. Именно по этим причинам они не подчиняются законам Менделя, которые по сути описывают распределение аутосомных генов в потомстве. В силу этого такие мощные инструменты формальной генетики, как гибридологический, рекомбинационный или цитогенетический анализ, чаще всего невозможно использовать для анализа генов пластид и митохондрий.

Множественность органельных геномов и случайное распределение органелл в клетке создает предпосылки для соматической сегрегации генов органелл

Соматические клетки обычно содержат тот же диплоидный набор хромосом и тот же набор генов, что и зигота, от которой они происходят в результате последовательных митотических делений. Поэтому при использовании соматической клетки или ее ядра для последующего формирования особи мы получаем точную генетическую (со стороны ядерных генов) копию организма или клон. Та же соматическая клетка может оказаться гетерозиготной (гетероплазматической) по своим органельным генам. На одну соматическую клетку приходятся сотни, а иногда и десятки тысяч хлоропластов и митохондрий, к тому же сами органеллы могут содержать значительное количество копий своих геномов.

В отличие от "привязанных" к нитям веретена хромосом органеллы клетки ведут себя достаточно произвольно. Делению клетки, как правило, предшествует деление самих органелл, и этот процесс также резко отличается от точнейшей репликации ядерных хромосом (табл.1.1).

Если зигота будущего многоклеточного организма содержит, например, два разных типа хлоропластов (условно ***N*** — нормальные и ***M*** — мутантные), то часть дочерних клеток может получить только хлоропласты типа ***N***, другие — типа ***M***, а третьи — как ***N***, так и ***M***, причем в разных клетках количество тех и других может сильно варьировать. Таким образом, отдельные клетки данной особи будут различаться по признакам, кодируемым разными хлоропластами. И, следовательно, клонирование каждого из этих типов клеток может давать различные по хлоропластным генам особи — происходит

так называемая вегетативная сегрегация, которую наблюдали у пестролистных гибридов еще E.Baur (1909) и C.Correns (1909).

Заметим, что выше приведена весьма упрощенная ситуация, не учитывающая полиплоидности самих органелл: геном каждой представлен не одной молекулой ДНК, а несколькими десятками, иногда даже сотнями, и среди них может также наблюдаться гетерогенность. Таким образом, органельный геном в клетке может быть повторен до 100 — 10000 раз и более. Такое "множество во множестве" необходимо учитывать, рассматривая любые вопросы органельной наследственности. В главах, посвященных структуре хлоропластного и митохондриального геномов, мы обсудим эту ситуацию более подробно.

Таблица 1.1

Репликация и распределение ядерных и органельных геномов между дочерними клетками в митозе

Репликация и распределение хромосом ядра в митозе	Репликация и распределение органелл в митозе
Происходит синхронно в строго определенный период клеточного цикла	Происходит несинхронно в течение клеточного цикла
Каждая хромосома реплицируется в течение клеточного цикла только один раз	Одни органеллы могут реплицироваться неоднократно и чаще, чем другие, некоторые совсем не реплицируются, в результате чего изменяется соотношение органелл в клетке
Дочерние клетки абсолютно идентичны материнской по набору хромосом	Дочерние клетки могут получить неравное количество различных органелл, так как различаются скорости их репликации и отсутствует механизм точного распределения органелл при делении клетки
Сегрегация хромосом отсутствует	Происходит вегетативная сегрегация органелл

На рис. 1.1 дано схематическое изображение митотического деления клетки, приводящее к вегетативной сегрегации. Гипотетическая упрощенная клетка содержит всего одну органеллу, которая несет четыре полные геномные копии, причем одна из них отличается от трех других содержанием мутантного аллеля какого-то гена. Как видно из рисунка, всего одно митотическое деление клетки может привести к вегетативной сегрегации: дочерние клетки, сохраняя идентичный ядерный геном, различаются по органельным. Одна из них содержит геномы органелл только дикого типа и, таким

образом, становится *гомоплазматической*. Другая остается *гетероплазматической*, но мутантных органельных геномных копий у нее большинство, и не исключено, что при последующем клеточном делении появится клетка, гомоплазматическая уже по мутантным генам.

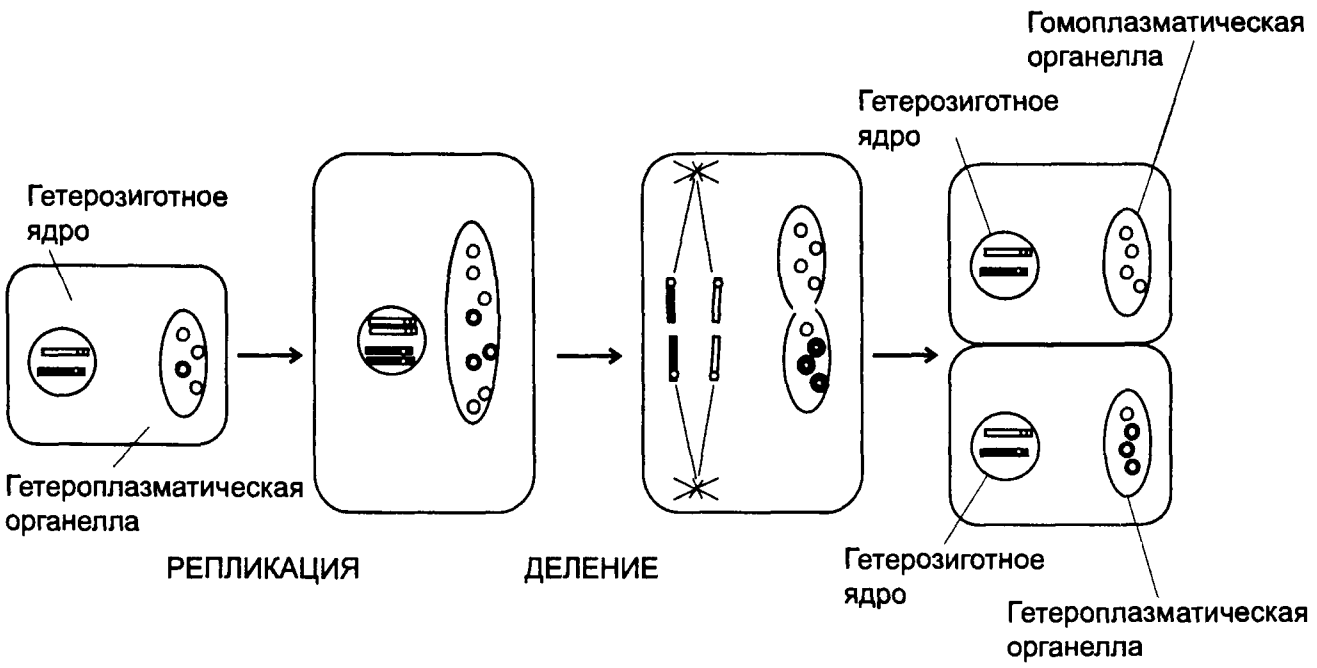


Рис. 1.1. Упрощенная схема условной эукариотической клетки (одна пара хромосом в ядре, один хлоропласт с четырьмя ДНК молекулами). Одна из молекул (жирные линии) несет мутантный аллель, т.е. клетка гетероплазматична по пластидным генам. В результате репликации и деления органелл пластидные геномы распределяются случайно, вследствие чего могут образовываться как гомо-, так и гетероплазматические органеллы и клетки [по Birky, 1994]

Таким образом, множественность органельных геномов и отсутствие точного механизма распределения их при делении как органелл, так и клеток приводит к вегетативной сегрегации — это один из основных законов неменделевской генетики. Этот закон оказался справедливым для хлоропластов и митохондрий во всех исследованных организмах [Birky, 1994].

Передача органелл и органельных генов в половом процессе

Второй особенностью наследования органелл в ряду поколений является необязательное участие генов органелл обоих родителей в половом процессе.

Чаще всего у растений и животных пластиды и митохондрии наследуются однородительски — от матери ко всем потомкам, проявляя так называемое материнское наследование. Однако сегодня уже известно много случаев, описывающих двуродительское или даже отцовское наследование

органелл. Даже в случае двуродительского наследования органелл и органельных генов оно отличается от двуродительского наследования хромосомных генов. Гаплоидные хромосомные наборы ядерных генов объединяются в диплоидные наборы в зиготе, которые затем митотически воспроизводят тот же геном во всех соматических клетках. Цитоплазматические органеллы полиплоидны, и в зиготе могут присутствовать либо гены органелл только одного из родителей, либо обоих. В последнем случае при митотическом воспроизведении зиготы дочерние митотические клетки могут получать разные пропорции материнских и отцовских органелл от их смеси в различных пропорциях до "чистых" клеток, содержащих органеллы только одного из родителей. Даже гаметы, воспроизводимые диплоидным организмом, могут быть как гомо-, так и гетероорганельными.

Наследование органелл у растений гораздо детальней изучено для хлоропластов, чем для митохондрий. К настоящему времени описано лишь несколько случаев, когда у растений митохондрии не наследовались строго по материнской линии [Hagemann, 1992; Birky, 1995; Reboud, Zeyl,1994; Nagata et al., 1999]. Наследование митохондрий у разных типов животных долгое время считалось исключительно материнским, и лишь недавние исследования выявили отдельные случаи передачи отцовских митохондриальных ДНК потомству (см. далее в этом разделе).

Материнское наследование органелл

На ранних этапах становления цитоплазматической генетики внеядерное наследование нередко называли материнским. Действительно, чаще всего органеллы передаются с цитоплазмой женских гамет от матери, поэтому одним из основных тестов на внеядерный характер признака считалась его передача по материнской линии.

Еще C.Correns (1909), изучая наследование стерильности пыльцы у *Saturea hortensis* (чабера садового), при опылении стерильных растений нормальной пыльцой получал полностью дефектное по этому признаку потомство, и так повторялось в последующих поколениях. Признак не передавался с пыльцой от нормальных отцовских растений.

Позднее Михаэлис произвел беккроссирование стерильных растений кипрея пыльцой нормальных растений 25 раз, и вновь признак остался неизменным. Таким образом, признак не только кодировался вне ядра, но и передавался лишь по материнской линии. Такой тип наследования впоследствии был подтвержден для хлоропластов и митохондрий большинства видов и родов покрытосеменных [Sears, 1980; Corriveau, Coleman 1988; Harris, Ingram, 1991; Reboud, Zeyl, 1994; Raspe, 2001].

Двуродительское наследование органелл

В 1909 г. E.Baur на своем излюбленном объекте *Pelargonium zonale* обнаружил, что одни растения при скрещивании наследовали пеструю окраску листьев от материнской формы, другие были зелеными, как отцовская форма, третьи оказывались белыми и вскоре погибали. Если проводилось реципрокное скрещивание (т.е. материнская форма была зеленой, отцовская — пестролистной), вновь получались потомки трех типов, но их численное соотношение было другим [Baur, 1909].

Таким образом, наряду с материнским наследованием органельных признаков было описано и ***двуродительское.*** В последующие десятилетия двуродительский тип наследования пластид был обнаружен у *Oenothera, Hypericum* и др. [Hagemann, 1992]. К настоящему времени описано более 40 случаев двуродительского наследования пластид у высших растений разных семейств и родов [Harris, Ingram, 1991; Reboud, Zeyl, 1994].

Двуродительское наследование митохондрий часто наблюдается у голосеменных: *Sequoia sempervirens, Calocedrus decurrens* [Neale et al.,1989, 1991], межвидового гибрида *Pinus banksiana* × *contorta* [Wagner et al., 1991], а также у покрытосеменных: *Pelargonium* [Kuroiwa et al., 1993; Guo, Hu, 1995; Nagata et al., 1999], *Musa acuminata Colla* [Nagata et al., 1999], *Brassica napus, Petunia hybrida* и межродовых гибридов *Hordeum vulgare* × *Secale cereale* [Reboud, Zeyl, 1994].

Передача митохондрий от обоих родителей описана не только у растений, но и у животных: у плодовой мушки *Drosophila* [Satta et al.,1990; Kondo et al.,1990], межвидового гибрида мышей *Mus musculus* × *M. spretus* [Gyllensten et al., 1991] и некоторых других.

Необычное наследование митохондрий было обнаружено у моллюсков рода *Mytilus*. Самки этих моллюсков наследуют мтДНК только от матери, но передают ее как сыновьям, так и дочерям. Самцы наследуют мтДНК от обоих родителей, но передают своим сыновьям только отцовскую мтДНК [Zouros et al., 1994]. Клеточные механизмы, контролирующие такое необычное наследование, пока неясны.

Отцовское наследование

Однородительское отцовское наследование пластид первоначально было выявлено у голосеменных [Neale et al., 1986; Stine et al., 1989]. Более того, у *Sequoia* и *Calocedrus* и митохондрии, и хлоропласты передаются по отцовской линии [Neale et al., 1989, 1991], чего не обнаружено пока ни для одного из видов покрытосеменных.

Всего три случая отцовского наследования пластид описаны у покрытосеменных — *Medicago sativa* [Schumann, Hancock, 1989], *Actinidia* [Testolini, Cipriani, 1997] и межвидовых гибридов *Daucus* [Boblenz et. al., 1990]; при этом митохондрии как у *Medicago*, так и у *Actinidia* наследуются по материнской линии [Forsthoefel et al., 1992; Testolini, Cipriani, 1997]. У аллоплазматических линий рода *Daucus* показано материнское наследование как пластид, так и митохондрий [Steinborn et al., 1995], вопрос об отцовском наследовании пластид у этого рода остается открытым. Тем не менее очевидно, что отцовское наследование органелл у покрытосеменных — явление исключительно редкое, тогда как у голосеменных оно чрезвычайно распространено.

Определение характера наследования органелл

Интенсивное изучение наследования органелл стало возможным с описанием фенотипических маркеров, первым и до сих пор наиболее распространенным из которых является нарушение окраски листьев (хлорофиллдефектность). Кроме того, используются такие селективные признаки, как устойчивость к антибиотикам или гербицидам. Прослеживая у гибридного потомства характер наследования какого-то маркерного органельного признака, можно определить характер наследования органелл, контролирующих этот признак.

Позднее к выяснению типа наследования органелл были привлечены цитологические (в том числе электронномикроскопические) и различные молекулярные методы: прежде всего метод анализа полиморфизма рестриктных фрагментов (ПДРФ), а затем и методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), блот-гибридизации и секвенирования органельных ДНК. В последующих главах мы не раз обратимся к этим методам для выяснения многих других вопросов генетики органелл. В обобщенном виде их особенности приведены в табл. 1.2.

При выборе метода, позволяющего определить характер наследования органелл, приходится учитывать не только преимущества, но и недостатки каждого. Так, например, Diers, исследуя передачу пластид у *Antirrhinum majus,* использовал два пластомных мутанта как фенотипические маркеры. Проанализировав огромную выборку — 97613 F1 растений, он обнаружил среди них 24 пестролистных, что позволило сделать вывод о происходящей с малой частотой передаче отцовских пластид в гибридное растение [Diers, 1967, 1971, цит. по Hagemann, 1992]. Если бы был выбран любой молекулярный метод анализа пластидной ДНК, эти редчайшие случаи вряд ли бы уда-

Таблица 1.2

Преимущества и недостатки основных подходов к изучению наследования органелл у растений [по Reboud, Zeyl, 1994]

Преимущества	Недостатки
Использование фенотипических маркеров	
• Возможен анализ очень большого числа образцов • Иногда возможен селективный отбор (например, по устойчивости к гербицидам [Gasquez et al., 1981] или к антибиотикам [Medquesy et al., 1986]) • Требуют минимального оборудования и материалов и потому доступны большинству лабораторий	• Малое количество существующих маркеров • Применимы только для хлоропластов • Маркеры могут быть не нейтральными, воздействуя на тип наследования • Спонтанные мутации, изменения в химерных побегах и реституция мутантных пластид могут изменять установленные частоты трансмиссии органелл
Молекулярные методы	
• Значительно увеличивают число потенциально возможных маркеров • Позволяют изучать наследование как митохондрий, так и хлоропластов • Происхождение органельной ДНК может быть однозначно определено и, таким образом, могут быть исключены альтернативные объяснения в случае явного отцовского наследования	• Дорогие и трудоемкие, что ограничивает размер выборки и, возможно, препятствует выявлению случаев редкого отцовского наследования; также применяются в основном к видам, представляющим экономический интерес • Возможны при наличии полиморфизма ДНК; в случае отсутствия внутривидового полиморфизма необходимы межвидовые скрещивания, при этом новые пластом-геномные взаимодействия могут индуцировать атипичное наследование [Sundberg, Glimelius, 1991; Chiu, Sears, 1993] • Метод ПДРФ нечувствителен к малым концентрациям ДНК, в этом случае анализ гетероплазмии требует применения ПЦР
Цитологические методы	
• Легко осваиваются • Применимы к большому числу видов • Информативны в отношении механизмов и стадии исключения органелл • Не требуют маркеров	• Позволяют проанализировать небольшое число особей или генотипов, поэтому при обобщении могут привести к неверным выводам • Присутствие пластид или митохондрий в клетках спермиев не доказывает их включения в зиготу, что является основным предметом исследования

лось обнаружить из-за сложности анализа даже нескольких сотен растений. По той же причине вызывают сомнения данные об исключительно отцовском типе наследования пластид, например у хвойных (*Pseudotsuga, Sequoia, Pinus, Picea*), полученные методом ПДРФ. Невозможно отрицать наличие редких случаев материнского наследования пластид у этих родов, да и у многих других видов растений и животных, поскольку проанализировать удается слишком мало особей [Hagemann, 1992].

Цитологические данные о характере наследования также могут трактоваться неоднозначно. В световом микроскопе трудно, например, дифференцировать пропластиды генеративных клеток спермиев и митохондрии, что нередко приводило к ошибочным выводам о передаче отцовских органелл потомству [Sears, 1980].

Ультраструктурные исследования более надежны в ряде сложных случаев [Kuroiwa et al., 1993], однако возможное число растений или животных, которые удается проанализировать, на несколько порядков ниже, чем при световой микроскопии. В следующем разделе мы рассмотрим, как с помощью электронной микроскопии удалось детально изучить цитологический механизм передачи отцовских пластид либо их дегенерации до оплодотворения яйцеклетки.

Интересный подход к анализу передачи пластид с пыльцой применили J.L.Corriveau и A.W.Coleman [1988]. Использовав флуоресцентный краситель DAPI (4′, 6-diamidino-2-phenylindole) для окраски пыльцы, они смогли быстро оценить присутствие пропластид в пыльце у 200 видов растений. Само по себе наличие пропластид в пыльце еще не гарантирует их передачи потомству. Однако применение такого быстрого скрининга большого числа видов покрытосеменных позволяет делать определенные выводы и направлять усилия по дальнейшему детальному исследованию уже гораздо меньшего числа видов.

Применение новых, современных методов исследований в сочетании с такими традиционными генетическими подходами, как беккроссирование и анализ межвидовых гибридов, значительно расширило представления о разнообразных способах наследования митохондрий и хлоропластов у различных организмов. Как уже упоминалось, обнаружены редкие случаи передачи отцовской митохондриальной ДНК у животных: у *Drosophila* с частотой 10^{-3} [Kondo et al., 1990], у мышей с частотой 10^{-4} [Gyllensten et al., 1991], у морских мидий [Hoeh et al.,1991; Zouros et al., 1994], пчел [Meusel, Moritz, 1993] и у человека [Jazin et al., 1996].

У межродовых гибридов *Triticale* (*Triticum* × *Secale*) методами блот-гибридизации и ПЦР также удалось выявить передачу с низкой частотой отцовской митохондриальной ДНК [Kück et al.,1993].

Подробное исследование митохондриальной и хлоропластной ДНК у 12 гибридов тетра- и гексаплоидных пшениц с плазмоном, принадлежащим разным видам *Aegilops* (см. главу 12), позволило обнаружить последовательности нескольких отцовских митохондриальных генов у всех гибридов, тогда как другие участки митохондриального генома представлены лишь материнскими копиями. Никаких следов отцовских копий пластидных генов не выявлено. Авторы предполагают, что у данных гибридов отдельные участки отцовского митохондриального генома подвергаются дифференциальной амплификации. Относительное количество отцовских и материнских копий мтДНК участков у ядерно-цитоплазменных гибридов зависит от генотипа плазмона материнской формы и ядерного генома отцовской [Tsukamoto et al., 2000].

По-видимому, усовершенствование методических возможностей и увеличение как количества исследованных видов, так и числа особей приведет к уточнению представлений о характере наследования органелл. В частности, был успешно использован такой удобный молекулярный метод, как анализ полиморфизма хлоропластных микросателлитных последовательностей [Provan et al., 1999].

В последние годы были получены новые данные о необычном характере наследования органельных геномов у межвидовых гибридов и аллоплазматических форм злаков. В частности, было обнаружено двуродительское наследование митохондриальной ДНК у аллоплазматической пшеницы с цитоплазмой ржи, а также двуродительское наследование органельных геномов у межродовых гибридов ржи и пшеницы *Secalotriticum* [Sinyavskaya et al., 2001; Синявская, 2002; Синявская и др., 2003].

Клеточные механизмы контроля передачи органелл

Достаточно детально изучен процесс передачи пластид — опубликованы данные о более чем 400 видов растений, как дикорастущих, так и культурных, относящихся к 88 семействам и 233 родам [Harris, Ingram, 1991].

По крайней мере в 27% изученных семейств хотя бы один таксон характеризуется двуродительским наследованием пластид, а в 6% семейств обнаружен только такой тип наследования (например, *Ericaceae* и *Geraniaceae*).

Из всех исследованных 400 видов растений у 23% обнаружено только двуродительское наследование. Интересно, что разные виды одного рода могут иметь разные типы передачи пластид (например, виды *Castilleja foliosa* и *C. wrightii*), а у некоторых видов обнаружена даже внутривидовая изменчивость по этому признаку (например, у *Pisum sativum* и *Nepeta*

cataria). Отцовское наследование пластид у покрытосеменных описано пока только для трех видов покрытосеменных, в то же время оно типично для голосеменных.

Ни у голо-, ни у покрытосеменных до сих пор не найдено никаких следов системы ферментной рестрикции — модификации, которая могла бы узнавать и уничтожать органельную ДНК одного из родителей, хотя такой тип узнавания описан для *Chlamydomonas* [Sager, 1977; Sager, Grabowy, 1983]. Имеется лишь одна работа, прослеживающая связь между активностью фермента нуклеазы С и наличием пластидных нуклеоидов при формировании мужского гаметофита у пяти видов цветковых растений. Авторы наблюдали строго материнское наследование с исчезновением пластидных нуклеоидов у пыльцевых клеток вида *Mirabilis jalapa,* имеющего высокую активнось нуклеазы С как в пыльниках, так и в тканях пестика. У других исследованных видов активность фермента была ничтожно мала (*Rhododendron kaempferi*) либо вовсе не выявлялась (*Zygocactus truncalis, Oenothera laciniata, O. speciosa*), при этом пластиды у них наследовались двуродительски [Nakamura et al., 1992].

Опубликованы результаты многочисленных исследований, описывающих события, происходящие с органеллами как во время гаметогенеза, так и после оплодотворения в зиготе. Рассмотрение этих цитологических механизмов может дать ключ к пониманию генетического контроля процесса наследования органелл.

Цитологические механизмы передачи пластид через половые клетки

Как известно, развитие мужского гаметофита покрытосеменных растений инициируется митотическим делением гаплоидной пыльцевой клетки. По окончании этого деления мужской гаметофит представлен двумя гаплоидными клетками: генеративной и более крупной вегетативной, из которой в дальнейшем образуется пыльцевая трубка. Во время второго пыльцевого митоза генеративная клетка делится надвое с формированием двух спермиев — мужских половых клеток покрытосеменных. Последнее митотическое деление происходит либо внутри пыльцевого зерна до опыления (зрелая пыльца в этом случае состоит из трех клеток: одной вегетативной и двух генеративных), либо уже после попадания пыльцы на рыльце пестика при прорастании пыльцевой трубки (в этом случае пыльца двуядерная). Развитие мужского гаметофита завершается процессом "двойного оплодотворения": один из спермиев сливается с яйцеклеткой, другой — с центральным ядром зародышевого мешка. В результате возникают диплоидный зародыш и триплоидный эндосперм.

Таблица 1.3

Содержание пластид в генеративных клетках и/или клетках спермиев и тип наследования пластид [по Hagemann, 1992]

Виды растений	Генеративные клетки	Клетки спермиев	Тип наследования пластид
Тип ***Lycopersicon***			
Antirhinum majus	-	-	Материнский
Beta vulgaris	-	-	Материнский
Chlorophytum comosum	-		Материнский
Gossypium hirsutum	-	-	Материнский
Lycopersicon esculentum	-		Материнский
Mirabilis jalapa	-		Материнский
Petunia hybrida	-		Материнский
Тип ***Solanum***			
Convallaria majalis	(-)		
Epilobium spec.			Материнский
Fritillaria imperialis	(-)		
Hosta ventricosa	(-)		
H. japonica	(-)		Материнский
Solanum chacoense	(-)		
S. tuberosum	(-)		
Тип ***Triticum***			
Hordeum vulgare	+	+	Материнский
Triticum aestivum	+	+	Материнский
Pisum sativum	+		Материнский
Zea mays		+	Материнский
Тип ***Pelargonium***			
Oenothera erytrosepala	+	+	Двуродительский
O. hookeri	+		Двуродительский
Pelargonium zonale	+	+	Двуродительский
Plumbago zeylanica	+	+	
Rhododendron spec.	+		Двуродительский

Примечание. "-" — пластиды не обнаруживаются; "+" — пластиды обнаруживаются; (-) — пластиды есть у молодых, но нет в зрелых генеративных клетках.

Скрининг пыльцевых клеток покрытосеменных показал отсутствие пластид в клетках спермиев 192 из 235 исследованных видов покрытосеменных [Corriveau, Coleman, 1988].

Ультраструктурные исследования, проведенные в ряде лабораторий, позволили разделить высшие растения на четыре основных типа по принципу распределения и передачи отцовских пластид: тип *Lycopersicon,* тип *Solanum,* тип *Triticum* и тип *Pelargonium* (табл. 1.3) [Hagemann, 1992].

Только для типа *Pelargonium* характерна передача отцовских пластид в зиготу, у трех других типов наследуются только материнские пластиды, однако достигается это различными путями.

Тип *Lycopersicon* — во время первого пыльцевого митоза генеративная клетка не получает никаких пластид: из-за неравного распределения все они попадают в вегетативную клетку.

Тип *Solanum* — сразу после первого деления генеративная клетка содержит несколько пластид, которые, однако, в дальнейшем исчезают из генеративной пыльцевой клетки (или спермия) еще до оплодотворения.

Тип *Triticum* — пластиды обнаруживаются во всех клетках мужского гаметофита, однако при оплодотворении они не передаются в яйцеклетку. То же, очевидно, происходит и с митохондриями этих растений. В результате растения этого типа обычно наследуют только материнские органеллы.

Дегенерация пластид

В мужском гаметофите видов, относящихся по наследованию пластид к типу *Solanum* (табл.1.3), как генеративные, так и вегетативная клетки содержат пластиды (правда, в вегетативной клетке их больше). Однако в зрелых генеративных клетках пластиды уже не выявляются, следовательно, можно предположить, что происходит их дегенерация. Действительно, поэтапное разрушение хлоропластов описано, например, у *Convallaria majalis* [Shröder, 1986].

Данный феномен пока не имеет объяснения ни на молекулярно-генетическом, ни на физиологическом уровне, однако нет сомнений, что происходит специфический процесс, характерный только для генеративных клеток растений. Неясно также, почему этот механизм действует лишь у определенных видов.

Интересно, что аналогичный процесс наблюдали у папоротников рода *Pteris:* во время сперматогенеза у них уменьшался объем хлоропластов и содержание пластидной ДНК, в итоге хлоропласты превращались в амилопласты и утрачивали ДНК [Hagemann, 1992].

Исключение органелл из мужских половых клеток

У видов типа *Lycopersicon* (см. табл.1.3) генеративные клетки не содержат пластид, хотя у молодых микроспор до первого пыльцевого митоза они равномерно распределены по всей цитоплазме. Но уже в профазе первого пыльцевого митоза пластиды поляризуются и обнаруживаются либо в центре микроспоры, либо на ее проксимальном полюсе, в то время как ядро находится на дистальном. В результате все пластиды после митоза оказыва-

ются в вегетативной клетке. Такая поляризация пластид каким-то образом связана с клеточным скелетом и скорее всего контролируется биохимическими градиентами. Есть сообщения, что в процесс поляризации пластид и других органелл вовлечены актиновые нити [Hagemann, 1992].

Подробное исследование органельной ДНК в зрелых пыльцевых зернах восьми видов покрытосеменных с помощью окраски двумя флуоресцентными красителями (DAPI и DiOC(6)) позволило классифицировать их в четыре типа [Nagata et al., 1999]:

1) m^+p^+: в пыльцевых зернах обнаружена как митохондриальная, так и пластидная ДНК (*Pelargonium zonale*);
2) m^+p^-: обнаружена лишь митохондриальная ДНК (*Musa acuminata*);
3) m^-p^+: обнаружена лишь пластидная ДНК (*Actinidia deliciosa, Medicago sativa, Rhododendron mucronatum*);
4) m^-p^-: никакой органельной ДНК в пыльцевых зернах не выявлено (*Antirrhinum majus, Arabidopsis thaliana, Petunia hybrida*).

Эта цитологическая классификация полностью совпала с типом наследования органелл, выявленным генетическим анализом. В том случае, если органельная ДНК присутствовала в генеративных клетках пыльцы, количество ее начинало резко возрастать после первого пыльцевого митотического деления (ПМ1). Напротив, количество пластидной и/или митохондриальной ДНК резко уменьшалось сразу после этого деления в том случае, когда в зрелых генеративных клетках пыльцы ДНК соответствующих органелл отсутствовала (m^- и/или p^-). Эти данные свидетельствуют о том, что тип наследования органелл (отцовский либо двуродительский или материнский) определяется независимо для пластид и митохондрий. Критический временной момент при этом совпадает с первым пыльцевым митотическим делением [Nagata et al., 1999].

Иногда пластиды исключаются из половых клеток не при первом пыльцевом митозе, а позднее, при формировании двух клеток спермиев. Удивительный полиморфизм этих клеток описан у *Plumbago zeylanica* [Russel, 1984]. В результате второго митотического деления образуются два спермия, различающиеся по размерам, форме и содержанию органелл (рис.1.2). Более крупный спермий тесно прилегает к вегетативному ядру, содержит множество митохондрий и лишен (или почти лишен) пластид. Наоборот, второй, меньший по размерам спермий содержит до 40—50 пластид, но почти не имеет митохондрий. В 94% наблюдавшихся случаев оплодотворения малый спермий сливался с яйцеклеткой и таким образом передавал последующему поколению свои пластиды, а большой спермий сливался с центральным ядром. Вполне можно представить себе обратную ситуацию (пока, правда, не описанную для конкретного вида), когда ядро яйцеклетки оплодотворяет спермий, не несущий пластид [Hagemann, 1992].

Исключение органелл из клеток спермиев может происходить и иначе: у ячменя *Hordeum vulgare* происходит выпячивание (инвагинация) оболочки спермия, куда попадают митохондрии, которые затем переносятся в вегетативную клетку [Hagemann, 1992]. К сожалению, пока совершенно не понятны механизмы, посредством которых осуществляется исключение органелл из половых клеток.

Но даже в том случае, когда пластиды обнаруживаются в зрелых спермиях, это не гарантирует их передачи в зиготу. У некоторых злаков, например у пшеницы, несмотря на присутствие пластид в спермиях, генетические при-

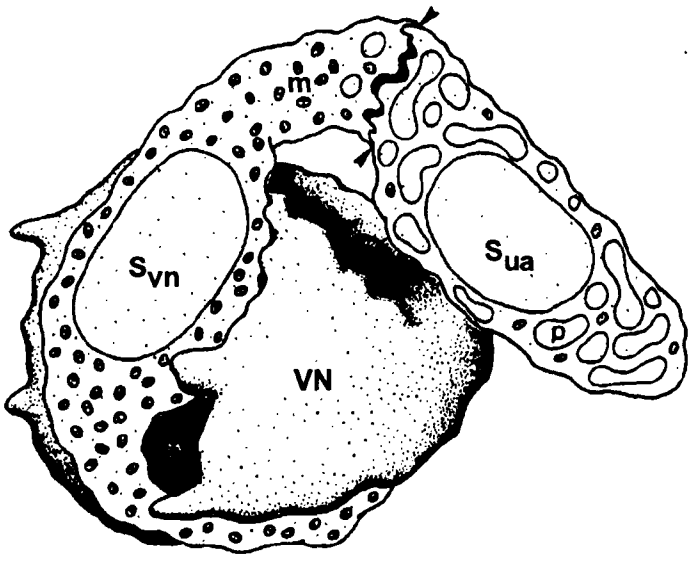


Рис.1.2. Реконструкция двух клеток спермиев (S_{vn}, S_{ua}) *Plumbago zeylanica* и ассоциированного вегетативного ядра (VN). Спермий S_{vn} содержит большинство митохондрий и две пластиды возле клеточной стенки, граничащей со спермием S_{ua}; цитоплазма спермия S_{ua} содержит множество пластид и незначительное количество митохондрий [по Russel, 1984]

знаки, кодируемые хлоропластами (и митохондриями), наследуются исключительно по материнской линии. Объяснить эту ситуацию можно, только предположив, что органеллы спермиев исключаются при оплодотворении, не попадая в зиготу. Действительно, остатки цитоплазмы спермиев с органеллами наблюдали в синергидах ячменя и вне зиготы после оплодотворения у мхов и голосеменных [Mogensen, 1988; Hagemann, 1992].

Обобщая факты, изложенные в этом разделе, мы можем заключить, что у растений имеются разные механизмы, препятствующие участию отцовских органелл в оплодотворении, — от дегенерации их на ранних стадиях развития мужских гамет до вытеснения их из мужских генеративных клеток или разрушения во время оплодотворения.

Цитологические механизмы передачи пластид материнского растения в зиготу

Парадоксально, но факт: хотя цитоплазматическая наследственность чаще всего материнская, передача органелл женского гаметофита изучена значительно хуже, чем мужского, по крайней мере у покрытосеменных. Имеются данные о многочисленных пластидах в яйцеклетках ряда видов

[Hagemann, 1992], однако, например, в женских гаметах *Quercus gambelii* пластид крайне мало [Mogensen, 1972, цит. по Hagemann, 1992]. До сих пор не исследованы яйцеклетки *Medicago* и *Daucus,* для которых описан отцовский тип наследования пластид и которые в связи с этим представляют особый интерес.

Голосеменные растения видов *Larix decidua, Biota orientalis, Cephalotaxus drupacea* и некоторых других при тщательном ультраструктурном исследовании показали полное или почти полное отсутствие пластид в яйцеклетках. У таких видов пластиды в зиготу преимущественно либо полностью передаются из спермиев. У других видов голосеменных наследование хотя и двуродительское, но с преобладающим отцовским типом [Gianordoli, 1974].

Механизмы, приводящие к частичному или полному отсутствию пластид в яйцеклетках, как и в случаях, рассмотренных выше для спермиев, сводят к двум типам — дегенерации или неравному распределению между клетками при делении.

Первый тип наблюдали у *Cephalotaxus drupacea* [Gianordoli, 1974] и *Taxus baccata* [Pennel, Bell, 1987].

Неравное распределение пластид при формировании женских гамет описано для нескольких видов голо- и покрытосеменных. У *Epilobium palustre* и у орхидных обнаружено, что при мейозе одна гаплоидная клетка, из которой позднее развивается зародышевый мешок, получает почти все пластиды, три другие, которые позднее дегенерируют, практически лишены пластид. Можно предположить (хотя это кажется менее рациональным) обратную ситуацию для некоторых видов — в таком случае пластиды будут отсутствовать в яйцеклетке, а в зиготу попадут преимущественно или исключительно отцовские пластиды [Hagemann, 1992].

Исключение хлоропластов яйцеклетки во время оплодотворения наблюдалось у *Pinaceae*, при этом в зиготу вносятся пластиды с цитоплазмой спермия [Stine et al., 1989].

Генетика наследования органелл

Контролируется ли наследование органелл ядерными генами или генами, расположенными в самих хлоропластах и митохондриях?

Ряд фактов свидетельствует в пользу первого предположения. По крайней мере относительная скорость репликации отцовских и материнских пластид в потомстве может зависеть от конкретных локусов хромосом. При скрещивании растений пеларгонии с зелеными (у матери) и белыми пластидами наблюдается два типа распределения частот фенотипов потомков [Tilney-Bassett et al.,1992]:

I тип — большинство растений выщепляют зеленые листья, меньшее количество — пестрые, и совсем у небольшого числа растений в потомстве оказываются белые листья.

II тип — зеленые и белые растения присутствуют в потомстве в почти равных количествах, пестролистных очень мало. Ряд скрещиваний, проделанных авторами между растениями 8 генотипов I типа и 8 генотипов II типа, позволили установить, что принадлежность к тому или другому типу определяют два ядерных гена *Pr1* и *Pr2*, контролирующих репликацию пластид. Растения второго типа несут одну или две копии доминантных аллелей обоих генов, тогда как отсутствие доминантных аллелей одного или двух генов определяет их принадлежность к первому типу.

Все 8 исследованных образцов II типа оказались двойными гетерозиготами: *Pr1pr1Pr2pr2* либо гетерозиготами по одной паре и доминантными гомозиготами по второй паре генов: *Pr1Pr1Pr2pr2* или *Pr1pr1Pr2pr2*. Растения первого типа содержали такие комбинации генов: *Pr1Pr1pr2pr2; pr1pr1Pr2Pr2* или *pr1pr1Pr2pr2*.

Таким образом, наличие обоих доминантных генов (хотя бы в гетерозиготном состоянии) определяет присутствие наравне с материнским отцовского типа наследования пластид, двуродительский же крайне редок. Если доминантным является только один из двух генов *Pr* (неважно, находится он в гомо- или гетерозиготном состоянии), то отцовский тип наследования почти исключается, однако большое количество растений характеризуются двуродительским наследованием и еще большее — материнским.

Ни механизм действия этих генов, ни продукт их экспрессии пока не определены, однако сам феномен представляется весьма значимым. Контроль за наследованием пластид в этом случае зависит от материнского растения, которое осуществляет "предетерминацию", т.е. определяет тип репликации и сегрегации пластид в следующем поколении [Tilney-Bassett et al.,1992].

Другой тип контроля — со стороны отцовского ядерного генотипа — наблюдали у *Petunia* [Derepas, Dulieu, 1992]. Оба родительских ядра участвуют в контроле за передачей пластид у *Medicago* [Smith,1994], а у *Oenothera* этот процесс контролируется пластом-геномным взаимодействием [Chiu, Sears, 1993]. На трансмиссию пластид влияет также геном самих пластид [Chiu et al.,1988].

У водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* обнаружена ядерная мутация *mat3*, которая изменяет наследование пластид. Обычно в зиготе этих водорослей на ранней стадии происходит активная элиминация хлоропластной ДНК родителя "–" типа, и практически вся хлоропластная ДНК потомства принадлежит "+" родителю. Происходит это предположительно благодаря активности зигото-специфической нуклеазы. Ядерная мутация "+" родите-

ля *mat3* препятствует этой избирательной деструкции хпДНК "–" родителя, и наблюдается двуродительское наследование пластидных ДНК [Rosen et al., 1991; Armbrust et al., 1995]. Еще одна ядерная мутация *uvsE1,* находясь в гомозиготном состоянии в зиготе, приводит к передаче пластидных генов от "–" родителя, при наличии обеих мутаций *mat3* и *uvsE1* процесс передачи значительно усиливается. Ни одна из этих мутаций не влияет на характер наследования митохондрий [Rosen et al., 1991].

Ни механизм распознавания хпДНК одного из родителей, ни природа нуклеазной активности в данном случае долгое время были неясны. Однако недавно удалось показать, что в материнских гаметах *Chlamydomonas* происходит гиперметилирование хлоропластной ДНК, тогда как в отцовских (–) гаметах этого не наблюдается. Было показано, что фермент, вызывающий это метилирование, — хлоропластно локализованная метилтрансфераза (CrMET1) — переносится в хлоропласты; в пластидах (+) гамет обнаруживается высокий уровень активности данного фермента, в то время как в (–) гаметах фермент не активен. Интересно, что у мутанта mat-1 фермент CrMET1 активен в (–) гаметах, их пластидная ДНК сильно метилирована и наследуется по "отцовской" линии [Nishiyama et al., 2002].

Нередко необычный для данных видов растений тип наследования пластид обнаруживается у межвидовых и особенно межродовых гибридов *Hordeum* × *Secale; Triticum* × *Secale; Triticum* × *Aegilops; Festuca* × *Lolium* и др. [Soliman et al.,1987; Kiang et al., 1994; Laser et al., 1997; Shore et al., 1994; Yao et al.,1994; Tsukamoto et al., 2000], что указывает на сбой эволюционно закрепленного механизма контроля за наследованием органелл в случаях отдаленной гибридизации [Sinyavskaja et al., 2001].

* * *

Несмотря на многочисленные исследования на сотнях видов растений и некоторых видах животных, вопрос о наследовании клеточных органелл все еще остается одной из загадок генетики. Поскольку и материнский, и двуродительский типы наследования встречаются как у самых примитивных, так и у наиболее высокоорганизованных групп растений, можно сделать вывод лишь о том, что оба типа эволюционно возникали и закреплялись неоднократно. Не существует единой гипотезы, которая объяснила бы огромный диапазон изменчивости, наблюдаемый при изучении наследования разных органелл у разных организмов. Остается спорным вопрос об эволюционном преимуществе однородительского наследования цитоплазматических геномов [Birky, 1994, 1995].

На смену предположению о качественном характере данного признака пришло представление, что это скорее количественный признак, контроли-

руемый рядом генетических и эпигенетических факторов. На степень проявления данного признака могут воздействовать многие молекулярные и клеточные процессы на всех стадиях полового размножения. Невозможен единый механизм, объясняющий все случаи однородительского наследования. Не идентифицированы гены, влияющие на трансмиссию органелл, а в том случае, когда эти гены известны, неясен механизм их действия. Предстоит изучить также механизмы взаимодействия геномов ядра и органелл в контролировании этого признака. Данные по передаче отцовской мтДНК у человека приобрели значительный резонанс в связи с бурным прогрессом в исследовании заболеваний человека, вызванных мутациями митохондриальной ДНК [Jazin et al., 1996; Coller et al., 2001] (см. главу 14).

Литература

Синявская М.Г. Наследование ДНК органелл клетки у межродовых гибридов ржи (*Secale cereale* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.): Автореф. дис... канд. биол. наук. 2002. 20с.

Синявская М.Г., Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. и др. Наследование органельных ДНК у гибридов ржи (*Secale cereale* L.) с тритикале (*x Triticale* Thch) // Генетика. 2003 (в печати).

Armbrust E.V., Ibrahim A., Goodenough U.W. A mating type-linked mutation that disrupts the uniparental inheritance of chloroplast DNA also disrupts cell-size control in *Chlamydomonas* // Mol. Biol. Cell. 1995. Vol. 6, No 12. P. 1807—1818.

Baur E. Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "varietates albomarginatae hort" von *Pelargonium zonale* // Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungsl. 1909. Bd. 1. S. 330—351.

Birky C.W. Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws // J. Heredity. 1994. Vol.85. P.355—365.

Birky C.W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1995. Vol.92, No.12. P.11331—11338.

Boblenz K., Nothnagel T., Metzlaff M. Paternal inheritance of plastids in the genus *Daucus* // Mol. Gen. Gen. 1990. Vol. 220. P. 489—491.

Chiu W.L., Stubbe W., Sears B.B. Plastid inheritance in *Oenothera:* organelle genome determines the extent of biparental plastid transmission // Curr. Genet. 1988. Vol. 13. P.181—189.

Chiu W.L., Sears B.B. Plastome-genome interactions affect plastid transmission in *Oenothera* // Genetics. 1993. Vol.133. P. 989—997.

Coller H.A., Khrapko K., Bodyak N.D. et al. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection // Nat. Genet. 2001. Vol. 28. P.147—150.

Correns C. Vererbungsversuche mit blass(gelb)grünen und buntblättrigen Sippen bei *Mirabilis jalapa, Urtica pilulifera* und *Lunaria annua* // Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungsl. 1909. Bd. 1. S. 291—329.

Corriveau J.L., Coleman A.W. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species // Am. J. Bot. 1988. Vol. 75. P.1443—1458.

Derepas A., Dulieu H. Inheritance of the capacity to transfer plastids by the pollen parent in *Petunia hybrida* // J. Heredity. 1992. Vol. 83. P. 6—10.

Forsthoefel N.R., Bohnert H.J., Smith S.E. Discordant inheritance of mitochondrial and plastid DNA in diverse alfaalfa genotypes // J. Heredity. 1992. Vol. 83, No 5. P. 342—345.

Gasquez J., Mouemar A., Darmency H. Etude de la transmission de la resistance chloroplastique aux triazines chez *Solanum nigrum* // C.R. Acad. Sa. Paris. 1981. Vol. 292. P. 847—849.

Gianordoli M. A cytological investigation on gametes and fecundation among *Cephalotaxus drupacea* // Fertilization in higher plants. North-Holland, Amsterdam, 1974. P. 221—232.

Guo F.L., Hu S.Y. Cytological evidence of biparental inheritance of plastids and mitochondria in *Pelargonium* // Protoplasma. 1995. Vol.186, No.3-4. P. 201—207.

Gyllensten U., Wharton D., Josefsson A., Wilson A.C. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice // Nature. 1991. Vol. 352. P. 255—257.

Hagemann R. Plastid genetics in higher plants// Cell Organelles. Wein: Springer-Verlag, 1992. P. 65—96.

Harris S.A., Ingram R. Chloroplast DNA and biosystematics: The effects of intraspecific diversity and plastid transmission // Taxon. 1991. Vol. 40. P.393—412.

Hoeh W. R., Blakley K.H., Brown W.M. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytillus* mitochondrial DNA // Science. 1991. Vol. 22. P. 1488—1490.

Jazin E.E., Cavelier L., Eriksson I. et al. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P.12382—12387.

Kiang A.-S., Connolly V., McConnell D.J., Kavanagh T.A. Paternal inheritance of mitochondria and chloroplasts in *Festuca pratensis-Lolium perenne* intergeneric hybrids // Theor. Appl. Gen. 1994. Vol. 87. P. 681—688.

Kondo R., Satta Y., Matsuura E.T. et al. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in Drosophila // Genetics. 1990. Vol. 126. P.657—663.

Kück U. U., Mohr S., Laser B. Nuclear-mitochondrial interactions in *Triticum* and *Triticale* // Plant mitochondria: with emphasis on RNA editing and cytoplasmic male sterility. Brennicke, Axel (ed.). 1993. P.357—366.

Kuroiwa T., Kawazu T., Uchida H. et al. Direct evidence of plastid DNA and mitochondrial DNA in sperm cells in relation to biparental inheritance of organelle DNA in *Pelargonium zonale* by fluorescence/electron microscopy // Eur. J. Cell Biol. 1993. Vol. 62, No 2. P.307—313.

Laser B., Mohr S., Odenbach W. et al. Paternal and novel copies of the mitochondrial *orf25* gene in the hybrid crop-plant triticale: predominant transcription expression of the maternal gene copy // Curr. Genet. 1997. Vol. 32. P. 337—347.

Medquesy P., Pay A., Marton L. Transmission of paternal chloroplasts in *Nicotiana* // Mol. Gen. Gen. 1986. Vol. 204. P.195—198.

Meusel M.S., Moritz R.F. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee *(Apis mellifera L.)* eggs // Curr. Genet. 1993. Vol. 24. P. 539—543.

Mogensen H.L. Exclusion of male mitochondria and plastids during syngamy in barley as a basis for maternal inheritance// Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 9347—9349 .

Nagata N., Saito C., Sakai A. et al. The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance// Planta.1999. Vol. 209, No.1. P. 53—65.

Nakamura S., Ikehara T., Uchida H. et al. Fluorescence microscopy of plastid nucleoids and a survey of nuclease C in higher plants with respect to mode of plastid inheritance // Protoplasma. 1992. Vol.169, No.1-2. P. 68—74.

Neale D.B., Wheeler N.C., Allard R.W. Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Douglas* fir // Can. J. Forest Res. 1986. Vol. 16. P.1152—1154.

Neale D.B., Marshall K.A., Harry D.E. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*) // Can. J. Forest Res. 1991. Vol. 21. P. 717—720.

Neale D.B., Marshall K.A., Sederoff R.R. Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1989. Vol. 86. P. 9347—9349.

Nishiyama R., Ito M., Yamaguchi Y. et al. A chloroplast-resident DNA methyltransferase is

responsible for hypermethylation of chloroplast genes in *Chlamydomonas* maternal gametes // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2002. Vol. 99, No.9. P. 5925—5930.

Pennel R.I., Bell P.R. Megasporogenesis and the subsequent cell lineage within the ovule of *Taxus baccata* L. // Ann. Bot. 1987. Vol. 59. P. 693—704.

Provan J., Soranzo N., McNicol J.W. et al. The use of uniparentally inherited simple sequence repeat markers in plant population studies and systematics // Molecular Systematics and Plant Evolution. London: Taylor and Francis, 1999. P. 36—50.

Raspe O. Inheritance of the chloroplast genome in *Sorbus aucuparia* L. (*Rosaceae*) // J. Heredity. 2001. Vol. 92, No. 6. P. 507—509.

Reboud X., Zeyl C. Organelle inheritance in plants // Heredity. 1994. Vol.72. P.132—140.

Rosen H., Newman S.M., Boynton J.E., Gillham N.W. A nuclear mutant of *Chlamydomonas* that exhibits increased sensitivity to UV irradiation? Reduced recombination of nuclear genes and altered transmission of chloroplast genes // Curr. Genet. 1991. Vol. 19. P. 35—41.

Russel S.D. Ultrastructure of the sperm cell of *Plumbago zeylanica.* Quantitative cytology and three-dimensional organization // Planta. 1984. Vol. 162. P.385—391.

Sager R. Genetic analysis of chloroplast DNA in *Chlamydomonas* // Adv. Genet. 1977. Vol.19. P. 287—340.

Sager R., Grabowy C. Differential methylation of chloroplast DNA regulates maternal inheritance in a methylated mutant of *Chlamydomonas* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1983. Vol. 80. P. 3025—3029.

Satta Y., Takahata N. Evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA and the history of the melanogaster subgroup // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1990. Vol. 87. P. 9558—9562.

Schumann C.M., Hancock J.F. Paternal inheritance of plastids in *Medicago sativa* // Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 78. P. 863—866.

Sears B.B. Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom // Plasmid. 1980. Vol. 4. P. 233—255.

Shore J., McQueen K.L., Little S.H. Inheritance of plastid DNA in the *Turnera ulmifolia* complex (*Turneracia*) // Am. J. Bot. 1994. Vol. 81, No.12. P.1636—1639.

Shröder M.B. Ultrastructural studies on plastids of generative and vegetative cells in *Liliaceae.* 4. Plastid degeneration during generative cell mutation in *Convallaria majalis* L. // Biol. Zentralbl. 1986. Vol.105. P. 427—433.

Sinyavskaja M., Aksyonova E., Dubovets N. et al. Alloplasmic wheat with rye cytoplasm: peculiarities of organelle genomes integration and inheritance // Proc. Int. Conf. "Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines" July 30—Aug. 3, 2001. Novosibirsk, 2001. P.104—107.

Smith S.E. Biparental inheritance of organelles and its implications in crop improvement // Plant Breed. Rev. 1988. Vol. 6. P. 361—393.

Soliman K., Fedak G., Allard R.W. Inheritance of organelle DNA in barley and *Hordeum* × *Secale* intergeneric hybrids // Genome. 1987. Vol. 29. P. 867—872.

Steinborn R., Linke B., Nothnagel T., Borner T. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in alloplasmic forms of the genus *Daucus* // Theor. Appl. Gen. 1995. Vol. 91. P. 632—638.

Stine M., Sears B.B., Keathley D.E. Inheritance of plastids in interspecific hybrids of blue spruce and white spruce// Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 78. P. 768—774.

Sundberg E., Glimelius K. Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae* // Theor. Appl. Gen. 1991. Vol. 83. P. 81—88.

Testolini R., Cipriani G. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia* // Theor. Appl. Gen. 1997. Vol. 94. P. 897—903.

Tilney-Bassett R.A.E., Almouslem A.B., Amoatey H.M. Complementary genes control biparental plastid inheritance in *Pelargonium* // Theor. Appl. Gen. 1992. Vol.85, No. 2—3. P. 317—324.

Tsukamoto N., Asakura N., Hattori N. et al. Identification of paternal mitochondrial DNA

sequences in the nucleus-cytoplasm hybrids of tetraploid and hexaploid wheat with D and D2 plasmons from *Aegilops* species // Curr. Genet. 2000. Vol. 38. P. 208—217.

Wagner D.B., Dong J., Carlson M.R., Yanchuk A.D. Paternal leakage of mitochondrial DNA in *Pinus* // Theor. Appl. Gen. 1991. Vol. 82. P. 510—514.

Yao J.L., Cohen D., Rowland R.E. Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia (Araceae)* // Theor. Appl. Gen. 1994. Vol. 88, No. 2. P. 255—260.

Zouros E., Oberhauser A.B., Saavedra C., Freeman K. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 7463—7467.

Глава 2

Генетическая система пластид

ОБЯЗАТЕЛЬНЫЕ компоненты растительных клеток — пластиды — вовлечены в ряд важнейших жизненных процессов: пластический и энергетический обмены, запасание ряда синтезированных метаболитов, репродукцию. Впервые "гранулы растительной клетки", вероятно, хлоропласты, описал итальянец Comparetti еще в 1791 г. В середине XIX в. исследователь Trecul сделал первые зарисовки пластид. Термин "хлоропласты" появился в конце XIX в.; тогда же эти органеллы стали активно изучать в связи с процессами фотосинтеза.

Соответственно перечисленным функциям существуют модификации пластид: этиопласты, лейкопласты, амилопласты, элайопласты, хромопласты и хлоропласты. Пластиды развиваются из недифференцированных пропластид. Пластиды, как и митохондрии, никогда не возникают вновь, для них характерна та же непрерывность, что и для самих клеток. Разные типы пластид генетически тождественны, способны превращаться друг в друга в ходе дифференцировки. Предмет обсуждения в данной главе — геном пластид, или пластом, его структура, кодирующая способность и функционирование. Термин "пластом" [Renner, 1934] намного опередил открытие ДНК в пластидах.

Краткая история обнаружения ДНК в пластидах

Наблюдения за наследованием пластид, их репликацией, дефектами, передающимися чаще всего по материнской линии, неизбежно приводили к идее о том, что пластиды несут собственные, отличные от ядра гены. Хотя нуклеиновые кислоты и были обнаружены в органеллах раньше, чем Watson и Crick создали свою модель "двойной спирали" ДНК, понимание того, что органеллы имеют весьма специфическую генетическую систему, стало возможным только после того, как компоненты этой генетической и белоксинтезирующей системы были выделены и охарактеризованы. Поиск ДНК и РНК в пластидах проводился всеми доступными в то время методами и прежде всего микроскопическими.

Методы световой микроскопии

Клетки обрабатывали красителем, специфическим для нуклеиновых кислот, и пытались выявить, окрашиваются ли органеллы. Впервые данные об окрашивании хлоропластов листьев *Selaginella, Tradescantia* и *Rhodeo* метиловым зеленым и красителем Фельгена опубликованы в 1951 г. [Chiba,

цит. по Kirk, Tilney-Bassett,1967]. Если предварительно листья обрабатывались трихлоруксусной кислотой (ТХУ), разрушающей ДНК, окраска отсутствовала. При использовании пиронина (еще один специфический краситель для ДНК) обработка клеток ТХУ также приводила к исчезновению окрашивания, а инкубация с рибонуклеазой — к уменьшению его интенсивности. Был сделан вывод, что хлоропласты содержат ДНК, а возможно, и РНК [Chiba, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Аналогичные сообщения вскоре появились для хлоропластов *Agapanthus*, *Elodea, Beta vulgaris* [Metzner, 1952, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967]. Обработка препарата ДНКазой устраняла специфическое окрашивание хлоропластов, что указывало на наличие ДНК в этих органеллах.

Однако не всегда попытки обнаружить нуклеиновые кислоты в пластидах приводили к положительным результатам. Так, не наблюдалось окрашивания хлоропластов по Фельгену, зато была обнаружена слабая базофилия при обработке азуром Б, которая исчезала при преинкубации с ТХУ [Littau, 1958, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967]. Сделан вывод о возможном присутствии в хлоропластах исследованных видов незначительного количества РНК и о том, что ДНК если и имеется, то лишь в концентрации, не обнаруживаемой цитохимическими методами. Не удалось выявить Фельген-положительный материал и в хлоропластах бобов [Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Удачными оказались попытки выявить ДНК в хлоропластах водорослей *Chlorella*. Фельген-положительные тельца наблюдались и в хлоропластах трех видов *Chlamydomonas*. Если клетки водоросли обрабатывали РНКазой, а затем окрашивали акридиновым оранжевым, под микроскопом вне ядра были видны флуоресцирующие желто-зеленые тельца, которые ассоциировались с хлоропластами. После обработки ДНКазой эти тельца не обнаруживались ни при одном способе окрашивания [Ris, 1961]. У *Euglena* обнаружить ДНК в хлоропластах не удалось, даже несмотря на применение наиболее чувствительной модификации окрашивания по Фельгену с флуоресцентными красителями [Givner, Moriber, 1964, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967]. Авторы пришли к выводу о том, что либо ДНК в пластидах находится в лабильной форме и теряется при фиксации и окраске препаратов по Фельгену, либо ее там вообще нет.

Поиск нуклеиновых кислот проводили и в других типах пластид: в хромопластах моркови ДНК не обнаружили, но выявили интенсивное окрашивание пиронином, указывающее на присутствие РНК. Этиопласты проростков кукурузы интенсивно окрашивались азуром Б, при предварительной обработке РНКазой окрашивания не было. Не окрашивались они также по Фельгену. Все эти факты говорят о присутствии РНК в пластидах [Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Таким образом, в световом микроскопе гистохимически удалось показать наличие РНК в хлоропластах и других типах пластид как у водорослей, так и у высших растений. ДНК выявлялась не во всех случаях. Концентрация ее при окрашивании по Фельгену должна составлять, по расчетам, от 3,3 до 6,7 % от сухого веса органеллы [Pollister, 1955, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967]. Как позднее было показано, у многих растений этот показатель значительно ниже (Kirk, Tilney-Bassett, 1967, см. табл. X.1). Существуют также особенности окрашивания ДНК красителем Фельгена, связанные, возможно, с проницаемостью мембран и приводящие к отрицательным результатам даже в случае высокой концентрации ДНК. Все это привело к поиску других, более тонких методов выявления генетического материала в пластидах.

Электронная микроскопия

В 1957 г. Р. Сэджер описала в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* гранулы диаметром 100—150 Å, чрезвычайно похожие на цитоплазматические рибосомы. Позднее такие же рибосомоподобные частицы были обнаружены в хлоропластах самых разных водорослей и высших растений: *Chlamydomonas moewusii, Ochromonas danica, Chenopodium album,* шпината, кукурузы, овса, а также в этиопластах выращенных в темноте растений кукурузы и овса. В случае предварительной обработки РНКазой частицы не выявлялись, что подтверждает наличие в них РНК [цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

H. Ris и W. Plaut, применив специфическое контрастирование связывающимся с ДНК уранил-ацетатом, обнаружили в хлоропластах *Chlamydomonas moewusii* зоны низкой электронной плотности, содержащие фибриллы диаметром 25—30 Å. Предварительная обработка ДНКазой приводила к исчезновению этих фибрилл, которые удивительно напоминали бактериальную хромосому. Авторы сделали вывод, что фибриллы содержат ДНК. Позднее аналогичные фибриллы диаметром 25 Å были описаны у мхов *Anthoceros* и у цветковых растений *Elodea, Helianthus, Zea mays* [Ris, Plaut, 1962], а также у *Phaseolus, Beta vulgaris* и овса [Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Таким образом, использование электронномикроскопического метода позволило выявить в пластидах различных растений ДНК в виде фибрилл и РНК в форме рибосомоподобных гранул.

Авторадиографические исследования

Обнаружить нуклеиновые кислоты в пластидах исследователи пытались и методом авторадиографии. Включение в хлоропласты H^3-тимидина — одного из составляющих ДНК нуклеотидов — было установлено в 1958 г.

у водоросли *Acetabularia*, затем у *Spirogyra* и у папоротника *Ceratopteris*, однако, поскольку ни в одном из случаев не проводили контроль с ДНКазой, доказать, что тимидин включался именно в хлоропластную ДНК, невозможно [Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Спустя несколько лет эксперименты по включению в хлоропласты H^3-тимидина, проведенные на листовых высечках табака *in vitro*, показали, что только молодые листья включали тритий. Радиоактивность сохранялась после обработки РНКазой, но исчезала после горячей перхлорной кислоты или ДНКазы, что однозначно доказывает синтез ДНК в хлоропластах молодых листьев табака [Wollgiehn, Mothes, 1964, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967]. Эти данные были вскоре подтверждены на многих других видах как высших растений, так и водорослей.

Применив совместно метод авторадиографии и электронной микроскопии, удалось показать синтез ДНК в пропластидах папоротника *Pteridium* [Bell, 1961, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Было обнаружено включение трития не только в молекулы ДНК, но и в РНК — с помощью H^3-цитидина в этиопласты кукурузы и с помощью H^3-гуанина и H^3-аденина в хлоропласты *Euglena* [Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Итак, метод радиоавтографии позволил однозначно доказать синтез нуклеиновых кислот в клеточных органеллах; особенно информативным он оказался в сочетании с электронномикроскопическим методом.

Исследование изолированных пластид

Данный метод является излюбленным у исследователей органельной ДНК. Еще в 1938 г., осадив хлоропласты листьев шпината, удалось выделить из них вещество нуклеопротеиновой природы [Menke, цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967]. Напомним, что в этот период даже химическая природа вещества наследственности еще не была установлена окончательно. Пять лет спустя был выделен рибозосодержащий нуклеопротеин из хлоропластов табака, а в начале 50-х годов в нуклеопротеиновой фракции хлоропластов были найдены азотистые основания: аденин, гуанин, цитозин и урацил [Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Органеллы выделяли из клеточных гомогенатов методом дифференциального центрифугирования в изотонических буферных растворах с последующей обработкой ДНКазой или центрифугированием в градиенте плотности для получения чистой фракции пластид. Хлоропласты листьев табака, полученные таким образом, содержали 0,1—0,2% ДНК от сухого веса пластид. При выделении пластид в неводных органических средах концентрация ДНК составила 0,2—0,4% сухого веса, хотя, по данным других

исследователей, эта величина не достигала 0,05% [Biggins, Park, 1964; Ruppel, Van Wyk, 1965 — цит. по Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

При всех способах выделения органелл в хлоропластах также обнаруживается РНК. Иногда концентрация ее совсем невысокая — 0,1%, что связано с потерями при выделении в водной среде. Если хлоропласты выделяются в неводной фазе, концентрация РНК значительно выше и достигает 1,0—7,5% [Kirk, Tilney-Bassett, 1967].

Отметим, что все испытанные методические подходы дали положительный результат. В пластидах были найдены как ДНК, так и РНК.

Особенности пластидной ДНК

Нуклеотидный состав

Определить нуклеотидный состав ДНК хлоропластов можно несколькими путями: прямым биохимическим анализом, определением плотности в градиенте центрифугирования хлористого цезия, а также по температуре плавления. Чем выше два последних показателя, тем больше содержание ГЦ-пар.

У большинства изученных видов высших растений общее содержание ГЦ-пар составляет 37—39%. Однако у печеночника *Sphaerocarpos* обнаружено более низкое содержание ГЦ-пар (31,6%), а у водоросли *Euglena gracilis* — 25% [Herrmann, Possingham, 1980].

Содержание ГЦ-пар хлоропластных ДНК может быть выше, ниже или равным таковому в ядерных ДНК тех же видов [Kirk, Tilney-Bassett, 1978]. Так, например, у *Acetabularia* плотность пластидной ДНК выше, чем ядерной, а у другой водоросли — *Vaucheria* — полосы распределения пластидной и ядерной ДНК в градиенте плотности практически совпадают [Herrmann, Possingham, 1980].

Изменяется содержание ГЦ-пар и по длине молекулы: у кукурузы, например, 44% (наивысшее) — в инвертированных повторах, 26,3% — в большом однокопийном районе и 22,8% (минимальное) — в малом однокопийном районе [Maier et al.,1995].

Конфигурация

Хлоропластная ДНК имеет кольцевую структуру. Об этом впервые сообщили исследователи хпДНК *Euglena gracilis* [Manning et al.,1971]. Позднее кольцевая структура хлоропластной ДНК была показана для многих видов растений (табл. 2.1). Длина молекул ДНК для каждого вида растений оказалась величиной постоянной [см. обзор Sugiura, 1992]. На замкнутость моле-

Таблица 2.1

Размеры кольцевых молекул и ГЦ-состав некоторых хлоропластных ДНК [по Herrmann, Possingham, 1980]

	Виды	Тип органелл	ГЦ-содержание, %	Длина кольцевой молекулы, мкм	Источник
Покрытосеменные					
Двудольные	*Antirrhinum majus*	Хлоропласт	38	46	Herrmann et al., 1975
	Beta vulgaris	»	38	46	Herrmann et al., 1975
	Lactuca sp	»	39	41	Kolodner, Tewari, 1975
	Oenothera hookeri	»	38	45	Herrmann et al., 1975
	Phaseolus sp	»	39	40	Kolodner, Tewari, 1975
	Pisum sp	»	32,7–39	39	Kolodner, Tewari, 1975
	Spinacia oleracea	»	37	44	Manning et al., 1972
	» »	»	38	46	Herrmann et al., 1975
	» »	»	37–39	39,5	Kolodner, Tewari, 1975
	Tropaeolum majus	Хромопласт	–	44	Sitte, 1977
Однодольные	*Avena sativa*	Хлоропласт	39	37	Kolodner, Tewari, 1975
	Narcissus pseudo-narcissus	Хромопласт	–	44	Falk et al., 1974
	» »	»	37	–	Herrmann et al., 1975
	Tulipa gesneriana	»		43,6	Wuttke, 1976
	Zea mays	»	38	43	Manning et al., 1972
	Zea mays	»	39	38	Kolodner, Tewari, 1975
	Spirodela oligorrhiza	»	37	54	Van Ee et al., 1979
Архегониата					
Filicinae	*Asplenium nidus*	»	38	44	Herrmann et al., 1975
	(Pteris vittata)	»	38	43	Там же
Musci	*Sphaerocarpos donnellii*	»	31	37	Там же
Водоросли					
Euglenophyceae	*Euglena gracilis*	»	28	40/44	Manning et al., 1971
Xanthophyceae	*Vaucheria sessilis*	»	38	36	Kowallik, Hennig (не опубл.)

кулы пластидной ДНК указывают и физические рестриктные карты (см. далее в этой главе).

Довольно редко в пластидах встречаются димерные молекулы ДНК (1—3% всех молекул) [Kolodner, Tewari, 1975]. Однако в развивающихся листьях шпината частота димеров достигала 15% [Herrmann, Possingham, 1980].

Методом электронной микроскопии выявлено, что димерная молекула пластидной ДНК обычно представляет собой кольцо, вдвое большее по длине [Kolodner, Tewari, 1975]. Позднее было показано, что мономеры объединены в нем по принципу "голова к хвосту" [Tewari et al., 1977].

Менее ясна ситуация со сцепленными димерами, которые описаны у нескольких высших растений [Kolodner, Tewari, 1975] и представляют собой два сцепленных взаимно замкнутых мономерных кольца.

В последнее время с появлением новых, более высокоразрешающих методов исследования в пластидах все чаще обнаруживаются линейные молекулы ДНК. Так, применив флуоресцентную ДНК-гибридизацию *in situ* (fiber-FISH) для анализа интактной структуры пластидного генома арабидопсиса, табака и гороха, наряду с кольцевыми удалось обнаружить большое число линейных ДНК [Lilly et al., 2001]. Кроме того, в пластидах табака и арабидопсиса были выявлены мультимерные формы молекул хлоропластной ДНК (> 900 т.п.н.), содержащие от 6 до 10 геномных эквивалентов. Использованный методический подход выявил большую, чем ранее предполагалось, пластичность генома хлоропластов [Lilly et al., 2001].

Размер и плоидность генома

Мономерная кольцевая молекула пластидной ДНК у разных групп растений имеет размер от 37 до 62 мкм; у высших растений наиболее часто встречаются молекулы длиной 44 — 46 мкм (табл. 2.1). Молекулы пластидной ДНК одного вида гомогенны, чем существенно отличаются от митохондриальной ДНК (см. главу 4).

Одной из основных особенностей органельных геномов в клетке является их множественность. Обычно диплоидная растительная клетка содержит две копии ядерных генов, но тысячи копий генов пластид (табл. 2.2). Так, только в одном хлоропласте *Antirrhinum* обнаружено 50—60 одинаковых молекул ДНК, у *Euglena* их количество чрезвычайно изменчиво и может достигать 200 пластидных геномов на органеллу. Однако в хромопластах *Narcissus* найдено всего 8 молекул ДНК на органеллу [Herrmann, Possingham, 1980].

Показано, что количество пластидной ДНК на клетку в процессе онтогенеза может изменяться в десять и более раз. Так, у шпината при развитии листа обнаружено увеличение числа пластидных геномов от 500 до 13000 на

клетку и от 50 до 200 на пластиду. В течение трех первых дней прорастания пшеницы обнаружено увеличение количества ДНК на пластиду в 7,5 раза и пластидной ДНК на клетку в 34 раза. При перенесении культуры водорослей *Chlamydomonas* на свежую среду число генных копий на хлоропласт увеличивалось с 85 до 340 [Bendich, 1987].

Таблица 2.2

Максимальные уровни хлоропластной ДНК в листьях на свету [по Bendich, 1987]

Растение	% от тотальной ДНК	Число геномов на клетку	Число геномов на пластиду	Источник
Горох	12	10000	270	Lamppa, Bendich, 1979
Соя	17	13000	–	Cannon et al., 1986
Шпинат	23	13000	200	Lawrence, Possingham,1985
Свекла	11	1900	100	Tymms et al., 1983
Картофель	8	3000	22*	Scott et al., 1984
Пшеница	17	50000	900	Boffey, Leech, 1982

* Поскольку у картофеля анализировались только зрелые листья, не исключено, что данный показатель у молодых листьев намного больше чем 22.

В нефотосинтезирующих тканях растений пластид в клетках значительно меньше. Так, около 300 пластидных геномов на клетку содержится в корешках гороха и всего 2—5 геномов на пластиду на предсеменной стадии развития зародыша у горчицы *Brassica juncea* [Bendich, 1987].

При дифференцировке хлоропластов из пропластид, например, у свеклы объем органелл возрастает в 25 раз, число копий молекул ДНК на пластиду при этом увеличивается с 10 до 100; эти копии концентрируются в 10—20 районах зрелого хлоропласта [Herrmann, Possingham, 1980], образуя нуклеоиды.

Нуклеоид — пластидное "ядро"

В 60-е годы в оригинальной работе H.Ris было показано, что организация генетического материала, исследованная автором в пластидах *Chlamydomonas, Zea, Elodea* и *Anthoceros,* напоминает таковую у прокариот. Участки пластид, несущие ДНК, назвали нуклеоидами, или ядерными эквивалентами [Ris, 1961].

На ультратонких срезах обычно видна локализация ДНК в одном или нескольких электронно-прозрачных участках органельного матрикса. ДНК представляет собой сеть тонких фибрилл диаметром порядка 30 Å, что соот-

ветствует двойной спирали ДНК, не связанной с гистонами [Ris, 1961; Herrmann, Possingham, 1980].

ДНК в пластидах может концентрироваться в одном нуклеоиде, расположенном вблизи центра органеллы или на ее периферии, а также может распределяться по нескольким нуклеоидам. Последний тип наиболее распространенный. Число нуклеоидов на пластиду варьирует в зависимости от ряда факторов и может достигать 80—100 [Gibbs et al.,1974, цит. по Herrmann, Possingham, 1980].

Нуклеоиды полиморфны. В пластидах, не имеющих развитой мембранной структуры, они обычно сферические. По мере роста органелл и развития мембранной системы нуклеоиды, как правило, становятся дисковидными, вытянутыми, иногда разветвленными или кольцеобразными [Herrmann, Possingham, 1980].

Подробное исследование онтогенетического изменения нуклеоидов в клетках апекса стебля и разных участков листа пшеницы было проведено с применением флуоресцентной микроскопии после окрашивания красителем DAPI (4′6-диамидино-2-фенилиндол). Количественная оценка проводилась с помощью сверхчувствительного микроспектрофотометра [Miyamura et al., 1990]. На смену 1—10 сферическим нуклеоидам пропластид появлялись кольцеобразные нуклеоиды в хлоропластах и этиопластах, которые затем распадались на множество более мелких сферических структур и наблюдались как в молодых, так и в зрелых хлоропластах. Интересно, что число копий молекул ДНК на органеллу для фотосинтезирующих пластид достигает 100, в то время как в нефотосинтезирующих пластидах (лейкопластах) тех же растений оно находится на уровне 3—5 молекул ДНК на лейкопласт [Miyamura et al., 1990].

Объемы нуклеоидов определяются видом растений, а также зависят от плоидности геномов, содержащихся в них: в хлоропластах *Beta* они составляют 0,01—0,3 мкм^3, у *Prorocentrum* — 0,007—0,055, тогда как у *Ochromonas* — 0,6—2,8 мкм^3. У *Acetabularia* в пластидах имеется всего один нуклеоид, при этом количество ДНК в нем может варьировать в 25 раз [Herrmann, Possingham, 1980].

На форму нуклеоидов влияет не только развитие пластидных мембран, но и связь ДНК с этими мембранами [Gibbs et al.,1974, цит. по Herrmann, Possingham, 1980]. Вероятно, все молекулы ДНК нуклеоида прикреплены к мембране в одном и том же месте, поскольку из хлоропластов ряда высших растений выделялись комплексы, состоящие из десяти и более нитей ДНК.

Функциональную связь ДНК нуклеоидов с тилакоидами показали опыты по осмотическому шоковому лизису пластид, после которого выделяли ассоциации молекул ДНК с мембранами тилакоидов. По мнению авторов, эта

связь нуклеоидов с мембранами пластид обеспечивает нитям ДНК определенную стабильность [Herrmann, Possingham, 1980]. Вероятно, связь с мембранами функциональна и для репликации ДНК, в которой участвует мембранно-связанный ферментный комплекс [Rose, Possingham, 1976].

Все эти факты свидетельствуют о том, что кольцевые молекулы ДНК в органеллах организованы в особые, напоминающие прокариотические, нуклеоиды, а не разбросаны случайно. Внутри нуклеоида молекулы ДНК, возможно, прикрепляются друг к другу. Кроме того, ДНК комплексы нуклеоидов связаны с мембранами пластид.

Первичная структура пластидной ДНК растений

В 1986 г. двум группам японских исследователей впервые удалось определить полную нуклеотидную последовательность пластидных геномов двух видов растений. Один из них — низшее растение печеночник *Marchantia polymorpha* [Ohyama et al.,1986], другой — излюбленный генетический и биотехнологический объект, высшее двудольное растение *Nicotiana tabacum* [Shinozaki et al.,1986].

Кольцевая молекула пластидной ДНК маршанции состояла из 121024 п.н., пластидный геном табака оказался несколько больше — около 156000 п.н.

По целому ряду свойств пластомы двух столь различных растений оказались схожими. Кольцевая молекула хлоропластной ДНК обоих видов состоит из четырех зон:

— большой однокопийный район (далее мы будем обозначать его общепринятой аббревиатурой LSC — large single copy);

— малый однокопийный район (SSC — small single copy);

— два инвертированных, т.е. имеющих противоположную ориентацию, но идентичных друг другу повторяющихся района (IR — inverted repeats), разделяющих LSC и SSC (рис. 2.1, табл. 2.3).

Размеры большого и малого однокопийных районов маршанции и табака оказались весьма близкими, в то время как инвертированный повтор у табака в два с половиной раза длиннее, чем у маршанции. Именно из-за этого общий размер генома *Nicotiana tabacum* почти на 35 т.п.н. превышает таковой *Marchantia polymorpha* [Hagemann et al., 1987].

В последующие 15 лет были секвенированы геномы пластид еще двадцати трех видов, относящихся к различным систематическим группам. Среди них высшие растения: однодольные — кукуруза [Kössel et al., 1992], рис [Hiratsuka et al., 1989], пшеница (рис. 2.2) [Ogihara et al., 2000]; двудольные —

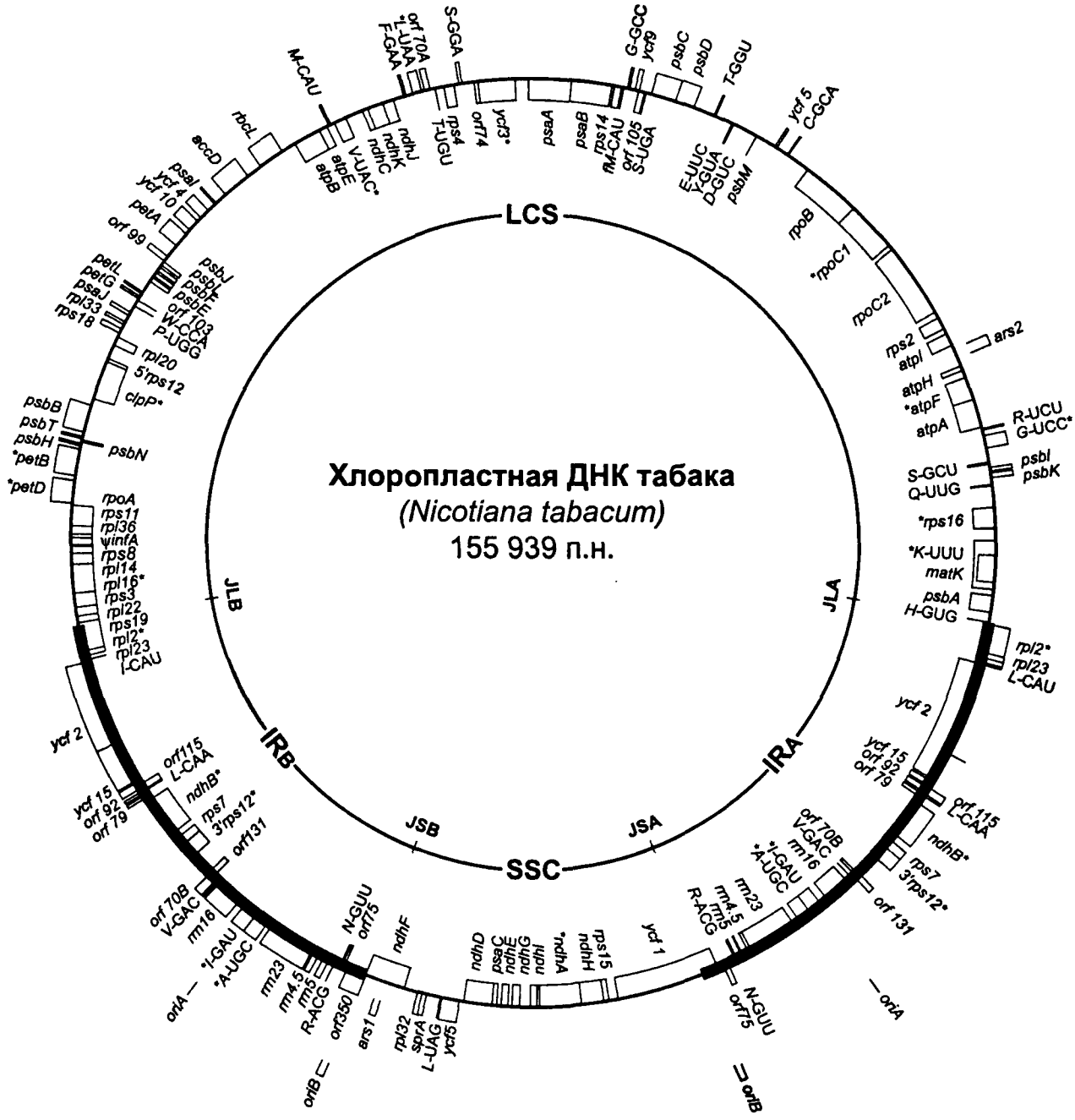


Рис. 2.1. Генетическая карта хлоропластной ДНК табака. Геном состоит из большого — 86686 п.н. и малого —18571 п.н. однокопийных районов и двух инвертированных повторов размером 25431 п.н. каждый. Гены, изображенные внутри круга, транскрибируются по часовой стрелке, гены, изображенные снаружи, — против часовой стрелки. Звездочками отмечены разделенные гены [по Wakasugi et al., 1998a]

Arabidopsis thaliana [Sato et al., 1999], шпинат [Schmitz-Linneweber et al., 2001], а также нефотосинтезирующий корневой паразит *Epifagus virginiana* [Wolfe et al.,1992]; голосеменное — черная сосна *Pinus thunbergii* [Wakasugi et al., 1994] (рис. 2.3); папоротник — *Psilotum nudum* [Wakasugi et al., 1998]. Кроме того, определены полные нуклеотидные последовательности пластомов ряда водорослей: одноклеточных зеленых *Euglena gracilis* (рис. 2.4) [Hallick et al., 1993] и *Chlorella vulgaris* (рис. 2.5) [Wakasugi et.al., 1997]; бурых *Porphyra purpurea* [Reith, Munholland, 1995] и *Cyanophora paradoxa*

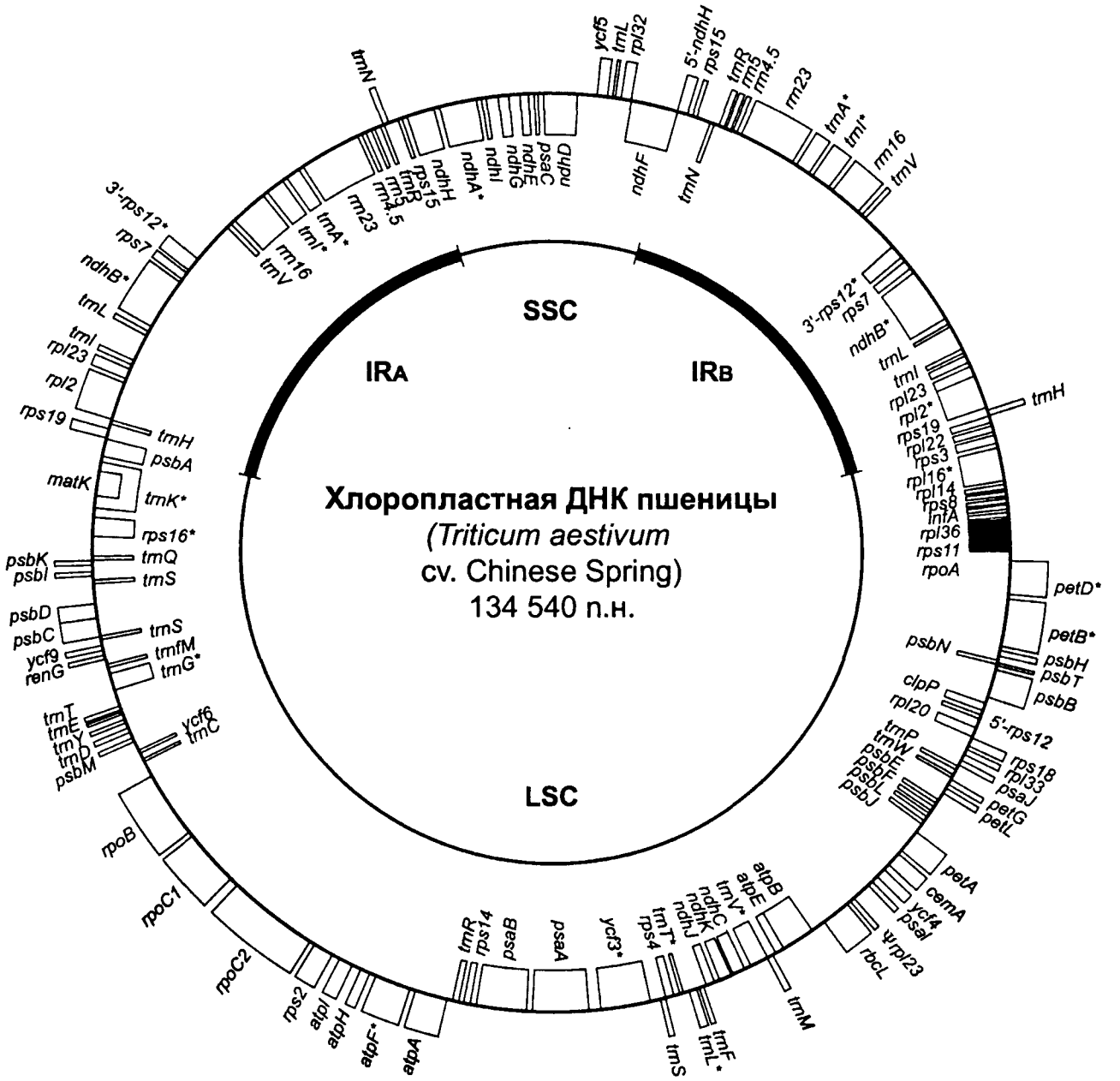


Рис. 2.2. Генетическая карта хлоропластной ДНК пшеницы [по Ogihara et al., 2000]

[Stirewalt et al., 1995], красных *Odontella sinensis* [Kowallik et al., 1995] и protoflorideophyceous *Cyanidioschyzon merolae* [Ohta et al., 1998] и др. Всего к середине 2002 г. опубликованы полные нуклеотидные последовательности 26 пластомов (http://megasun.bch.umontreal.ca/gobase/).

Из всех пластидных ДНК, секвенированных к данному моменту, наиболее протяженной и генетически насыщенной оказалась пластидная ДНК водорослей *Nephroselmis olivacea* (200,8 т.п.н., 127 генов) (рис.2.6), наименьшей — ДНК нефотосинтезирующих организмов: *Epifagus virginiana* (50—73 т.п.н.) и гетеротрофной водоросли *Prototheca wickerhamii* [Turmel et al., 1999; Knauf, Hachtel, 2002]. В табл. 2.3 приведены некоторые общие сведения, характеризующие секвенированные пластомы отдельных видов.

Инвертированные повторы (ИП), как следует из табл. 2.3 и рис. 2.7, чрез-

Таблица 2.3

Характеристика некоторых пластидных геномов (по Hagemann, Hagemann, 1994, с дополнениями и исправлениями)

Вид	Общий размер генома, т.п.н.	LCS (большой однокопийный район), т.п.н.	SSC (малый однокопийный район), т.п.н.	IR (2×) (инвертированный повтор), т.п.н.	тРНК гены	рРНК гены	Белок-кодирующие гены	Неизвестные ORFs	Источник
Marchantia polymorpha	121,024	81,095	19,813	10,058	32	4	55	30	Nature 322 (1986). P. 572—574
Nicotiana tabacum	155,844 155,939	86,684 86,686	18,482 18,571	25,339 25,341	30 30	4 5	55 78	30 6	EMBO J.5 (1986). 2043—2049; Plant Mol.Biol.Rep. 16 (1998), P. 231—241
Oryza sativa	134,525	80,592	12,335	20,799	30 + 3 псевдогена	4	56	35	MGG 217(1989). P. 185—194
Zea mays	140,387	82,355	12,536	22,748	30	4	70		J. Mol.Biol. 251 (1995). P. 614—628
Epifagus virginiana	70,028	19,799	4,759	22,735	17 + 5 псевдогенов	4	21		PNAS 89 (1992). P. 10648—10652
Pinus thunbergii	119,707	65,696	53,021	0,495	32	4	62	11	PNAS 91 (1994). P. 9794—9798
Euglena gracilis	143,170			Нет	27	3	51	Более 10	Nucl.Acids Res. 21 (1993). P. 3537—3544
Porphyra purpurea	191,028			Вместо инвертированного – прямой повтор	35	3	133	65	Plant Mol.Biol.Rep. 13 (1995). P. 333—335
Cyanophora paradoxa	135,599	94,946	18,083	11,285	33	3	192		Plant Mol.Biol.Rep. 13 (1995). P. 327—332
Odontella sinensis	119,704	65,346	38,908	7,725	25	3	174		Plant Mol. Biol. Rep. 13 (1995). P. 336—342

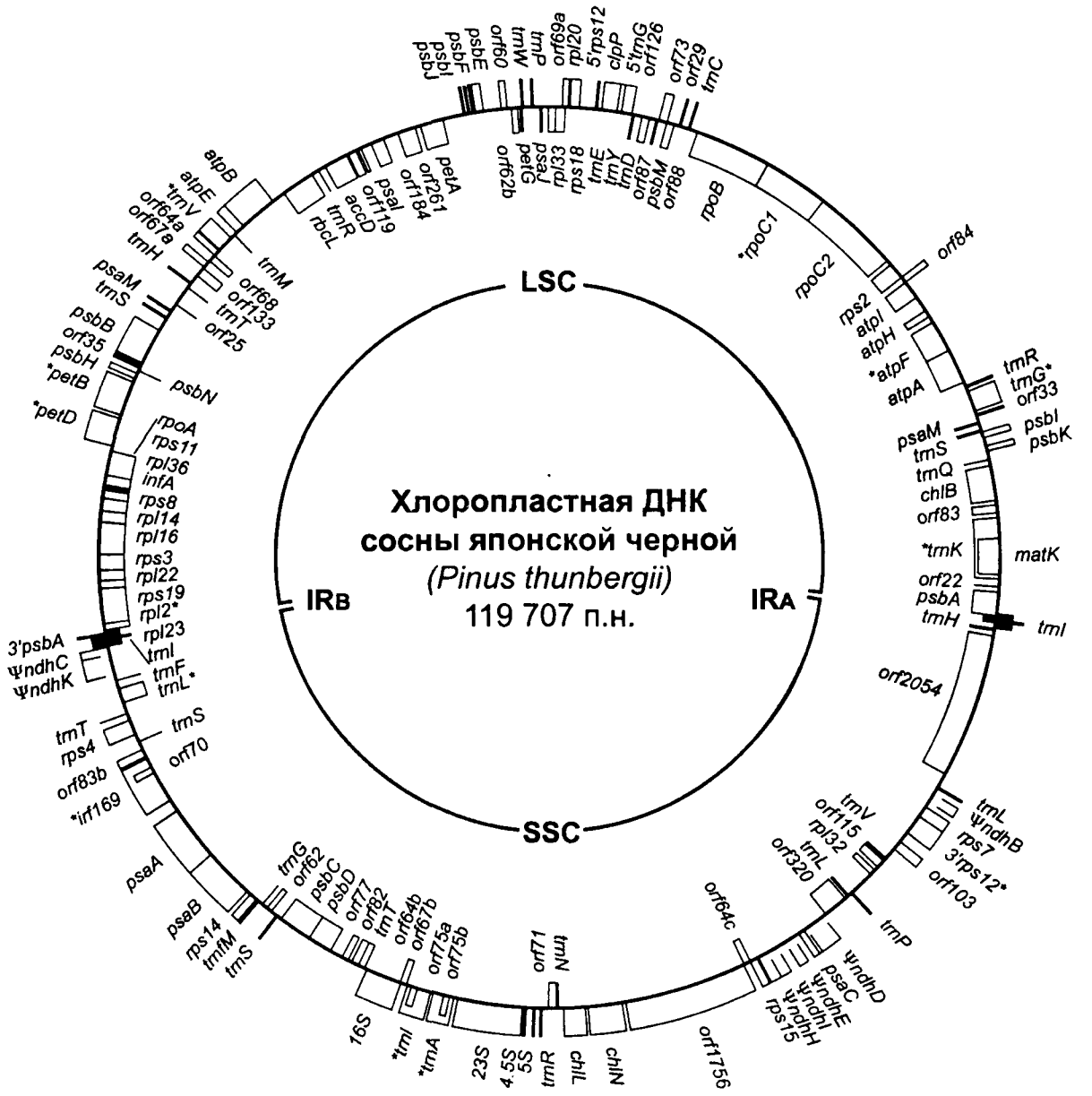


Рис. 2.3. Карта хлоропластной ДНК сосны японской черной. Показаны основные ORF размером более 60 кодонов и законсервированные ORF. Гены, изображенные внутри круга, транскрибируются по часовой стрелке, гены изображенные снаружи, — против часовой стрелки [по Sugiura et al., 1993]

вычайно сильно различаются по длине: у сосны они крайне редуцированы (всего 495 п.н.), тогда как у всех секвенированных покрытосеменных в несколько раз протяженнее малого однокопийного района (12—25 т.п.н.). Наиболее протяженные инвертированные повторы (по 76 т.п.н.) найдены у герани, благодаря чему размер ее хпДНК необычно большой (217 т.п.н.) [Palmer et al., 1987].

Иногда в пластидных ДНК обнаружить ИП не удается: так, у эвглены их нет вообще, а у *Porphyra purpurea* вместо инвертированного — прямой повтор. Отсутствуют инвертированные повторы у некоторых представителей покрытосеменных (гороха, бобов, альфа-альфа), хвойных и водорослей [Sugiura et al., 1998].

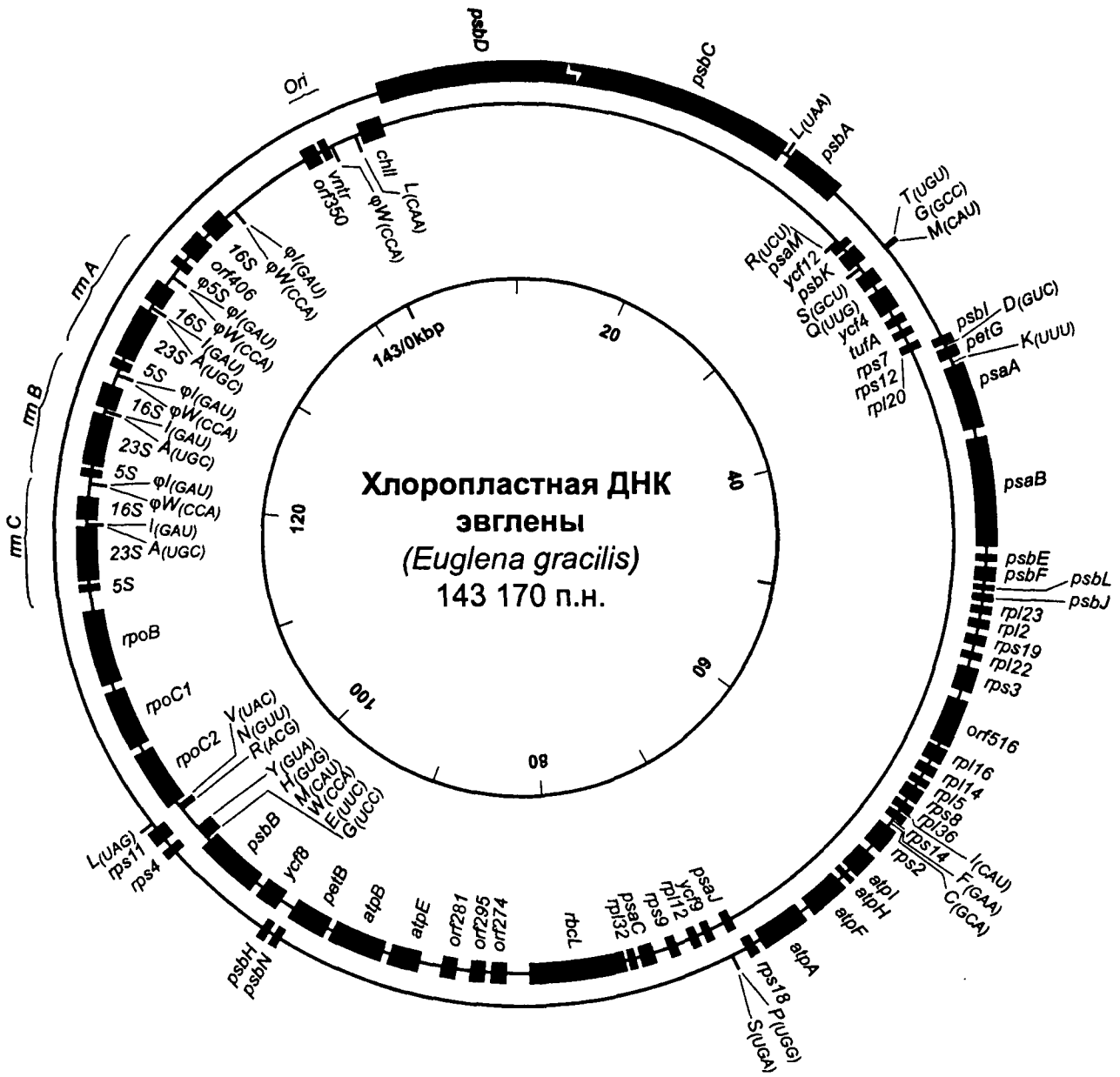


Рис. 2.4. Карта хлоропластной ДНК эвглены. Гены, изображенные внутри круга, транскрибируются по часовой стрелке, гены, изображенные снаружи, — против часовой стрелки [по Hallick et al., 1993]

Соотношение размеров большого и малого однокопийных районов также весьма изменчиво: у кукурузы они различаются почти в семь раз, тогда как у сосны — всего на 20% (рис.2.7). Сравнительные размеры этих районов у трех видов покрытосеменных представлены на рис. 2.8.

Хлоропластные гены — идентификация и локализация

Для того чтобы охарактеризовать хлоропластные гены, прежде всего хлоропластную ДНК подвергали воздействию специальных ферментов — эндонуклеаз (рестриктаз), которые разрезают молекулу в строго определенных местах (сайтах узнавания). Применяя эндонуклеазную обработку не-

Рис. 2.5. Генетическая карта хлоропластной ДНК хлореллы [по Wakasugi et al., 1997]

сколькими ферментами в различных комбинациях, определяли последовательность рестриктных фрагментов в хлоропластном геноме, что позволило строить так называемые физические карты. Первая такая карта была создана для хлоропластного генома кукурузы [Bedbrook, Bogorad, 1976].

Суммарный молекулярный вес всех фрагментов дает возможность установить более или менее точно размеры пластидной ДНК еще до проведения полного секвенирования. Большинство исследованных пластидных геномов имеют размеры в диапазоне 120—160 т.п.н. Самый большой геном обнаружен у пластид зеленой водоросли *Chlamydomonas moewusii* — 292 т.п.н., однако, по некоторым данным, пластом *Acetabularia* может достигать

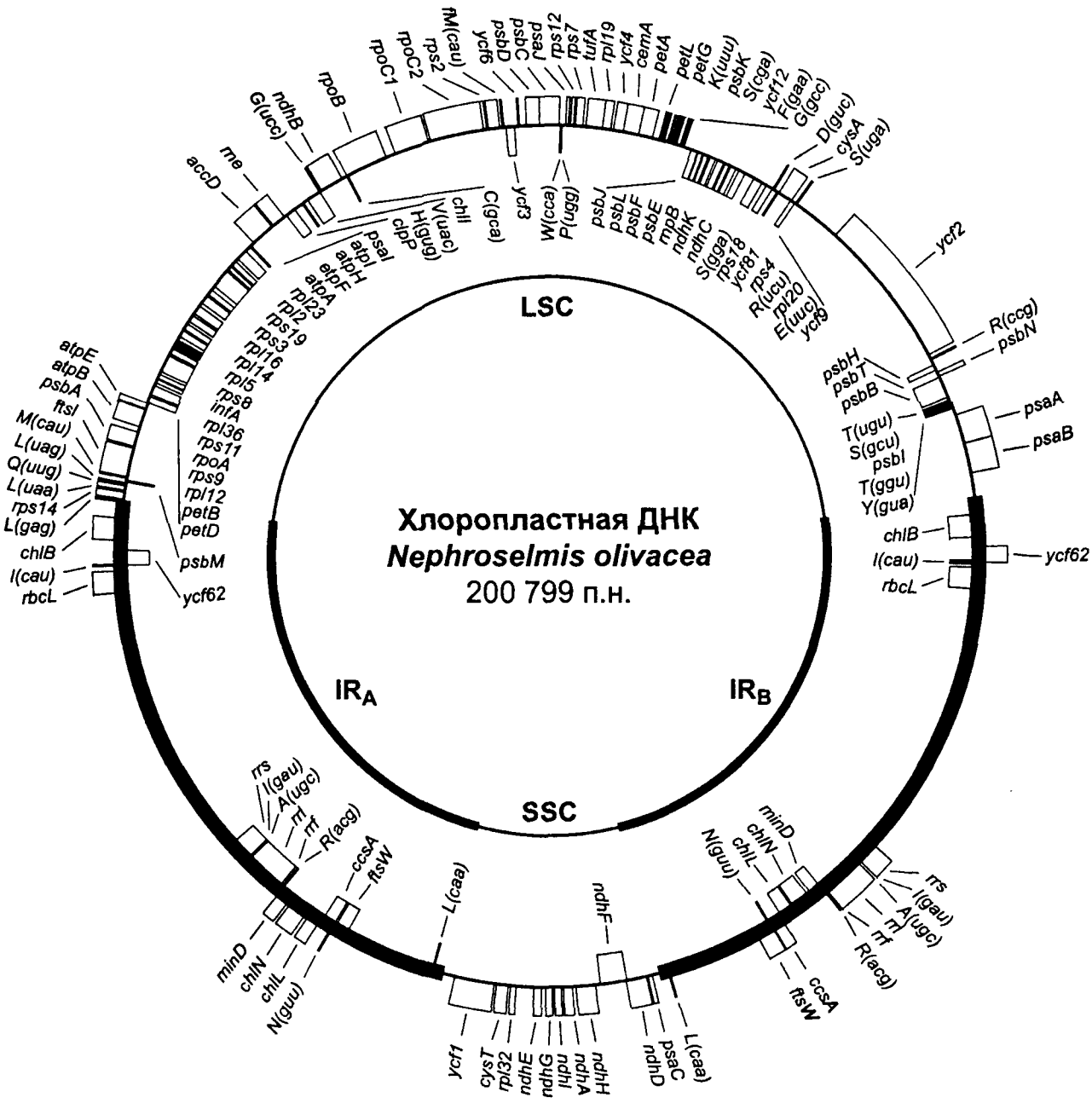


Рис. 2.6. Генетическая карта хлоропластного генома *Nephroselmis*. Гены, изображенные снаружи окружности, транскрибируются по часовой стрелке, изображенные внутри, — против часовой стрелки [по Turmel et al., 1997]

размера 400 т.п.н. [Leible et al., 1989]. Самые маленькие пластидные ДНК — у сифоновой водоросли *Codium fragile* — 85 т.п.н. и у нефотосинтезирующего паразита *Epifagus virginiana* — 70 т.п.н. [Palmer, 1985; Hagemann et al.,1996].

Физическая карта дает представление о размере генома, его потенциальной кодирующей способности, но не дает никакой информации о генах, входящих в этот геном. Поэтому следующий этап установления структуры пластома — превращение физической карты в генетическую.

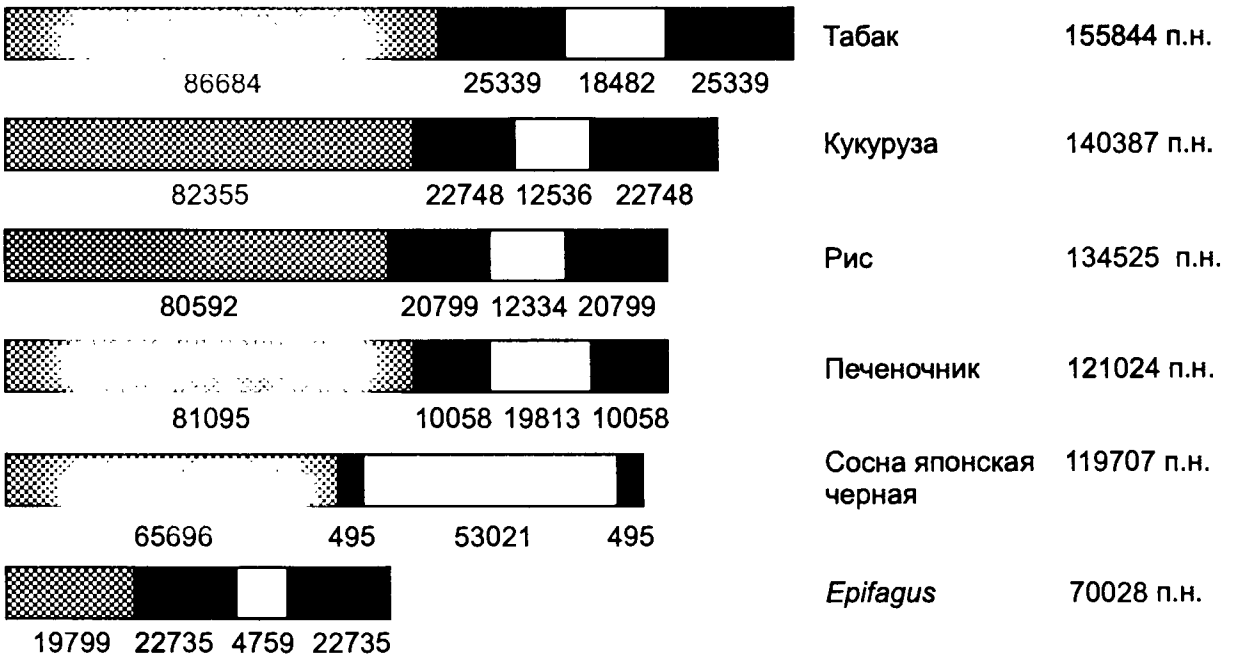


Рис. 2.7. Вариации размеров некоторых секвенированных пластомов высших растений [по Maier et al., 1995]

Положение генов, кодирующих молекулы рибосомальных и транспортных РНК, удалось установить методом гибридизации соответствующих меченых молекул РНК с заданным рестриктным ДНК фрагментом и затем определить данный локус на карте [Bedbrook, Kolodner, 1979].

Для локализации первых хлоропластных генов, кодирующих белки, применяли более сложный способ: после очистки белка получали специфические антитела к этому белку, затем этими антителами тестировали полипептиды, транслирующиеся в системе *in vitro* с молекул мРНК. Установив соответствие определенной матричной РНК какому-то белку, можно методом ДНК-РНК гибридизации локализовать на карте участок ДНК (ген), кодирующий этот белок [Weil, 1987].

Применялся также другой методический прием: с фрагмента пластидной ДНК, положение которого на физической карте известно, в системе *in vitro* осуществлялась транскрипция—трансляция. Белки — продукты этого синтеза — анализировались с помощью специфических антител, а также путем установления аминокислотной последовательности [Sugiura, 1992]. Когда белок частично секвенирован, т.е. определена последовательность хотя бы 15—20 аминокислот, синтезируют искусственный полинуклеотид, который используется как зонд для нахождения участка молекулы ДНК, кодирующего этот белок [Weil, 1987].

Широко используются данные уже известных последовательностей аминокислот и соответственно нуклеотидов, полученные для растений одного

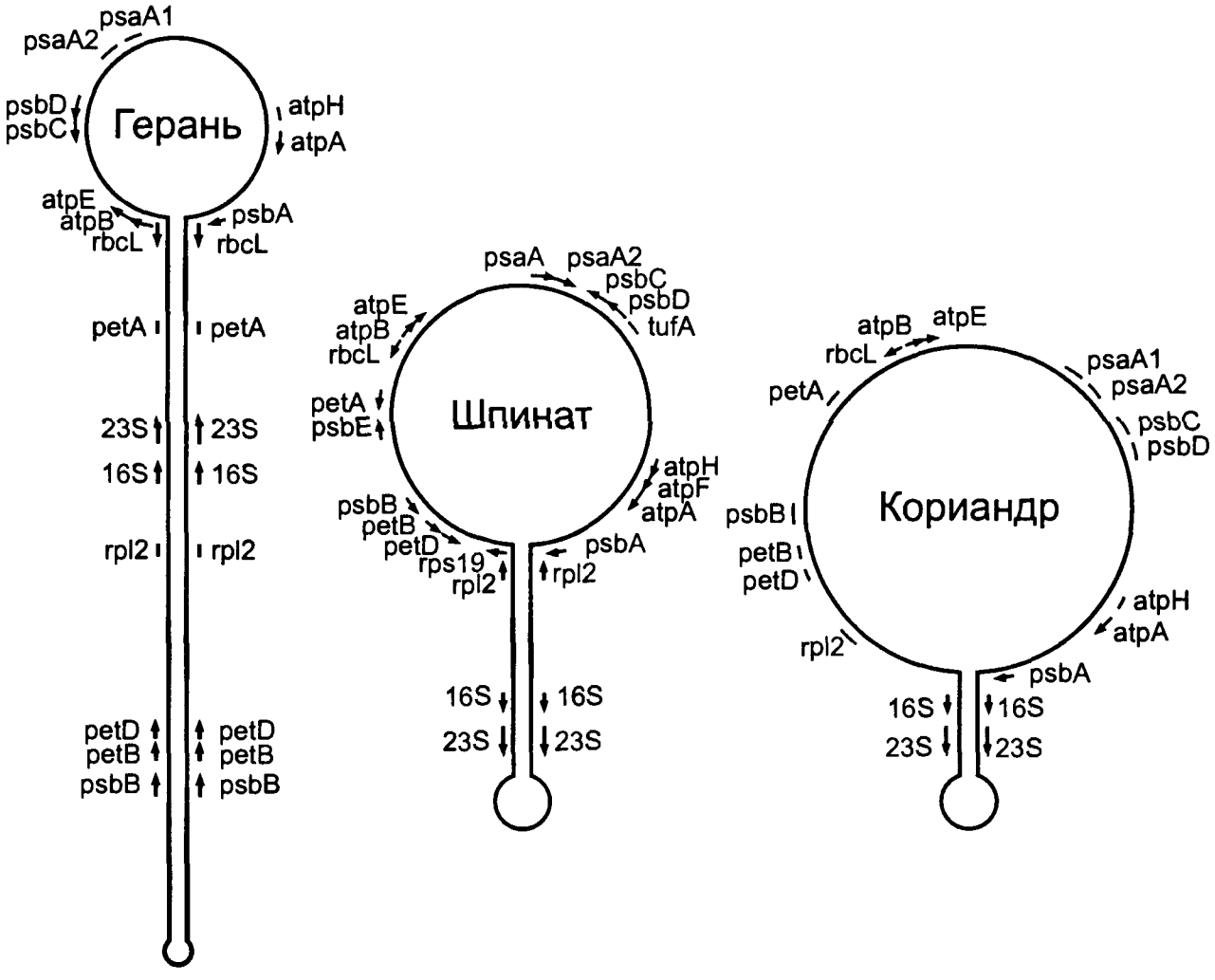


Рис. 2.8. Вариации размеров однокопийных районов и инвертированных повторов хлоропластных ДНК покрытосеменных: *Pelargonium hortorum, Spinacia oleracea, Coriandrum sativum* [по Palmer, 1985]

вида, в картировании этих же генов у других видов. Так как гены хлоропластной ДНК оказались весьма консервативны по структуре, после того, как ген локализован на карте ДНК одного вида растений, его можно клонировать и амплифицировать (размножить), чтобы использовать как зонд для идентификации аналогичного гена в пластомах других видов. В настоящее время эта работа проводится исключительно с использованием интернет-баз данных, доступных всем исследователям [Shimko et al., 2001].

Значительное число пластидных генов было локализовано на картах секвенированных пластидных ДНК благодаря их гомологии с соответствующими генами прокариот, в частности с прекрасно изученным геномом *E.coli* [Weil, 1987].

Нефотосинтезирующий паразит растений *Epifagus* содержит пластиды с минимальным набором генов — около 20, большинство функциональных пластомов высших растений состоят из 60—80 генов, у различных водо-

рослей число генов пластидной ДНК колеблется от 120—130 *(Odontella, Cyanophora)* до 200 *(Porphyra)* [Martin, Herrmann, 1998 — см. литературу к гл. 8]. Вероятно, в ходе эволюции растений от одноклеточных водорослей до высших растений происходит утрата пластидных генов. У растений, утративших способность к фотосинтезу, генов становится еще меньше, но в то же время небольшое количество пластидных генов, как и сами пластиды, остаются совершенно необходимыми для растения в целом. Объяснить эту необходимость достаточно сложно.

Для обозначения пластидных генов используется номенклатура, предложенная R.B.Hallick [1989].

Пластидные гены — "генетические" и фотосинтетические

Именно на две такие группы разделяют все гены, найденные в пластоме, большинство исследователей [Hagemann et al., 1987; Shinozaki et al., 1988; Sugiura, 1992; Юрина, Одинцова, 1998].

К первой группе относятся все гены, связанные в работой генетического аппарата пластид: гены транспортных и рибосомальных РНК, РНК-полимеразные гены и гены, кодирующие белки пластидных рибосом.

Кроме того, в хлоропластном геноме обнаружен целый ряд генов, связанных с регуляцией экспрессии генома пластид: факторы инициации транскрипции, тРНК-синтетазы, субъединицы факторов элонгации и хеликазы, участвующей в репликации, и некоторые другие [Sugiura et al., 1998].

Ко второй группе принадлежат гены большой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы, фотосистем I и II, цитохромного комплекса b/f, АТФ-синтазные гены [Sugiura, 1992; Sugiura et al., 1998].

В хлоропластах также найдены гены, аналогичные по нуклеотидной последовательности генам NADH-дегидрогеназы митохондрий; чаще всего их выделяют в самостоятельную группу [Shimada, Sugiura, 1991; Hagemann, Hagemann, 1994].

Гены, контролирующие формирование генетического аппарата пластид

Гены рибосомальных РНК. Как известно, хлоропласты содержат 70S рибосомы в отличие от цитоплазматических, более крупных рибосом с константой седиментации 80S. Пластидные 70S рибосомы, как обычно, состоят из двух субъединиц с константами седиментации соответственно 50S и 30S. С большой субъединицей связаны три типа рРНК молекул, кодируемых

хлоропластным геномом: 23S, 5S и 4,5S, в состав малой субъединицы входит 16S рРНК. Таким образом, у высших растений в хлоропластном геноме имеется четыре гена, кодирующих рибосомальные рРНК и расположенных в последовательности 16S-23S-4,5S-5S, прерываемой обычно между 16S и 23S локусами несколькими генами транспортных РНК. Чаще всего это изолейциновые и аланиновые тРНК и, таким образом, генный кластер, обозначаемый *rrn,* имеет состав: 16S-tRNA^{Ile}–tRNA^{Ala}-23S-4,5S-5S [Sugiura, 1992; Sugiura et al., 1998]. У разных систематических групп наземных растений нуклеотидные последовательности генов рибосомальных РНК чрезвычайно консервативны [Shimada, Sugiura, 1991].

У водорослей *rrn* кластер может содержать дополнительные низкомолекулярные рРНК гены — 7S и 3S у *Chlamydomonas*, а также вместо четырех генов нести только три, как у *Euglena gracilis*, не содержащей 4,5S гена [Sugiura, 1992].

Гены рибосомальных РНК в пластидах чаще всего локализованы в инвертированных повторах и таким образом представлены двумя копиями (рис. 2.8). В то же время у сосны *Pinus thunbergii*, имеющей чрезвычайно редуцированные повторы, данный кластер представлен только одной копией. У *Euglena gracilis* кластер из трех генов 16S-23S-5S, прерываемый между 16S и 23S двумя тРНК генами, повторен в геноме три раза подряд, а ген 16S имеет еще дополнительную, четвертую копию (см. рис. 2.4).

Гены белков пластидных рибосом. Хлоропластные рибосомы наземных растений состоят из 58—62 белков: в среднем 25 белков в малой и 35 в большой субъединице. Для сравнения — у *E.coli* их 55: 21 в 30S и 34 в 50S субъединице. При изучении процесса синтеза белка в изолированных хлоропластах было установлено, что примерно треть из них кодируется пластомом, остальные — ядерным геномом [Eneas-Filho et al., 1981; Sugiura et al., 1998]. Так, у табака 12 из 24 белков малой и 9 из 34 белков большой субъединицы хлоропластных рибосом кодируется пластомом. Гомология генов с неизвестной функцией в пластидах и генов рибосомальных белков у *E.coli* позволила идентифицировать гены рибосомальных белков у табака, маршанции и риса. 12 из них кодируют белки 30S субъединицы (гены *rps*), а 9 — белки 50S субъединицы (гены *rpl*) [Shimada, Sugiura, 1991; Sugiura et al., 1998].

Секвенирование генов рибосомальных белков хлоропластного кодирования показало уникальность этих белков по сравнению с белками пластидных рибосом, кодируемых ядром. Гены рибосомальных белков собраны в опероны. Так, у табака 10 из 21 (*rps+rpl*) гена представляют собой самый большой хлоропластный кластер ctL23, в который входят дополнительно два гена, связанных с синтезом белка: ген инициирующего фактора (IF1) и ген субъединицы РНК-полимеразы (рис. 2.9). Структура ctL23 кластера у

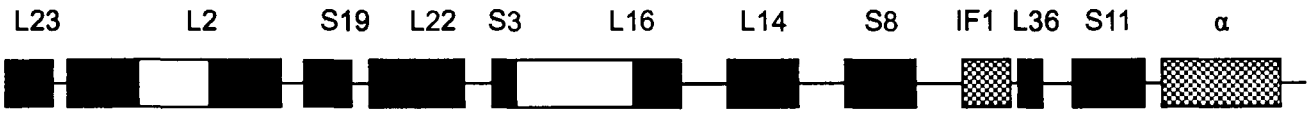


Рис. 2.9. Структура ctL23 кластера хлоропластов табака [по Sugiura et al., 1998]. Черные и заштрихованные прямоугольники — экзоны, белые — интроны. IF1 — инициирующий фактор 1, α — субъединица РНК-полимеразы

наземных растений чрезвычайно консервативна [Sugiura, 1992; Sugiura et al., 1998].

Оперон *rpl23* включает 12 генов рибосомальных белков у табака, но 13 — у эвглены, при этом последовательность отдельных генов в опероне весьма сходна с тремя расположенными друг за другом оперонами у *E.coli* (см. рис. 2.4).

Отдельные гены белков рибосом могут у некоторых видов растений отсутствовать: *rpl22* не найден в хлоропластном геноме бобовых, *rpl5* эвглены не встречается ни у одного из изученных видов высших растений; отсутствуют у них и три гена — *rpl13, rps9* и *rps10,* выявленные в пластоме морской водоросли *Cryptomonas* [Sugiura, 1992].

Гены транспортных РНК. В хлоропластном геноме выявляется чаще всего от 27 до 35 генов тРНК (см. табл. 2.3) [Sugiura, 1992; Sugiura et al., 1998]. Кроме того, в некоторых хпДНК имеется один или несколько псевдотРНК генов. Найденные у однодольных, эти псевдогены расположены на инверсионных концах или вблизи них, в связи с чем возникло предположение об участии тРНК генов в эволюционной реорганизации пластома.

Геном пластид табака содержит 30 тРНК генов (табл. 2.4). Достаточно ли этого количества, чтобы транслировать 61 кодон, используемый в белковом синтезе в пластидах? Если кодон-антикодонное узнавание происходит по обычному механизму "wobble" спаривания оснований, необходимо 32 тРНК гена. Возможно, для трансляции белков хлоропласты импортируют 1—2 недостающих тРНК, хотя доказательств этого до сих пор не получено [Sugiura et al., 1998].

В то же время *in vitro* исследования, в которых очищенные тРНК из бобов оценивались по способности распознавать мРНК кодоны, показали, что 30 генов тРНК достаточно для того, чтобы успешно транслировать 61 кодон [Pfitzinger et al., 1990].

Картирование тРНК генов, как мы уже упоминали, производилось методом гибридизации очищенных индивидуальных тРНК с ДНК фрагментами хлоропластного генома. Гены тРНК затем секвенировали [Driesel et al., 1979; Graf et al., 1980].

Таблица 2.4

РНК-кодирующие пластидные гены [по Sugiura, 1992]

Гены	Генные продукты
Рибосомальные РНК	
23S рДНК	23S рРНК
16S рДНК	16S рРНК
5S рДНК	5S рРНК
4,5S рДНК	4,5S рРНК
Транспортные РНК	
trnA-UGC[a]	тРНК ^{ala}(UGC) аланин
trnR-ACG	тРНК ^{arg}(ACG) аргинин
trnR-UCU	тРНК ^{arg}(UCU) аргинин
trnN-GUU	тРНК ^{asn}(GUU) аспарагин
trnD-GUC	тРНК ^{asp}(GUC) аспарагиновая кислота
trnC-GCA	тРНК ^{cys}(GCA) цистеин
trnO-UUG	тРНК ^{gln}(UUG) глутамин
trnE-UUC	тРНК ^{glu}(UUC) глутаминовая кислота
trnG-GCC	тРНК ^{gly}(GCC) глицин
trnG-UCC[a]	тРНК ^{gly}(UCC) глицин
trnH-GUG	тРНК ^{his}(GUG) гистидин
trnI-GAU[a]	тРНК ^{ile}(GAU) изолейцин
trnI-CAU	тРНК ^{ile}(CAU) изолейцин
trnL-UAA[a]	тРНК ^{leu}(UAA) лейцин
trnL-CAA	тРНК ^{leu}(CAA) лейцин
trnL-UAG	тРНК ^{leu}(UAG) лейцин
trnK-UUU[a]	тРНК ^{lys}(UUU) лизин
trnfM-CAU	тРНК ^{fmet}(CAU) формилметионин
trnM-CAU	тРНК ^{met}(CAU) метионин
trnF-GAA	тРНК ^{phe}(GAA) фенилаланин
trnP-UGG	тРНК ^{pro}(UGG) пролин*
trnS-GGA	тРНК ^{scr}(GGA) серин
trnS-UGA	тРНК ^{ser}(UGA) серин
trnS-GCU	тРНК ^{ser}(GCU) серин
trnT-GGU	тРНК ^{thr}(GGU) треонин
trnT-UGU	тРНК ^{thr}(UGU) треонин
trnW-CCA	тРНК ^{trp}(CCA) триптофан
trnY-GUA	тРНК ^{tyr}(GUA) тирозин
trnV-GAC	тРНК ^{val}(GAC) валин
trnV-UAC[a]	тРНК ^{val}(UAC) валин

[a] Гены с интронами.

* У сосны *Pinus thunbergii* обнаружена еще одна пролиновая тРНК (GGG).

Хлоропластные тРНК гены весьма консервативны по своей структуре. При сравнении нуклеотидных последовательностей этих генов у риса, табака и маршанции выявлена гомология более 80%. Вместе с тем уникальный ген тРНК (CCG) был найден только у маршанции [Shimada, Sugiura, 1991]. Ген пролиновой тРНК (GGG) до сих пор обнаружен лишь в одном из секвенированных пластидных геномов — у черной сосны *Pinus thunbergii.* Три дополнительных гена тРНК, не встречающиеся у высших растений, были обнаружены в пластоме *Porphyra purpurea* [Hagemann et al.,1996].

Гены РНК-полимеразы. Долгое время считалось, что РНК-полимераза хлоропластов кодируется исключительно ядерным геномом и импортируется в хлоропласты [Lerbs et al.,1985]. Это представление оказалось несостоятельным, так как в хлоропластной ДНК были обнаружены последовательности, гибридизующиеся с РНК-полимеразными генами *E.coli* [Watson, Surzycki, 1983]. РНК-полимераза *E.coli* кодируется тремя генами (*rpoA, rpoB, rpoC*), контролирующими соответственно α-, β- и β′-субъединицы в соотношении 2:1:1, т.е. синтезируемый фермент имеет структуру $\alpha_2 \beta\beta'$.

Структура хлоропластной РНК-полимеразы оказалась гомологичной, за исключением того, что N- и C-части β′-субъединицы кодируются в хлоропластах двумя различными генами (*rpoC1* и *rpoC2*) и обозначаются соответственно β′и β″. Следовательно, РНК-полимераза хлоропластов состоит из субъединиц $\alpha_2 \beta\beta'\beta''$. В настоящее время с помощью анализа секвенированных последовательностей картировано 4 хлоропластных гена, кодирующих субъединицы хлоропластной РНК-полимеразы: *rpoA, rpoB, rpoC1* и *rpoC2* [Sugiura, 1992].

Несмотря на неопровержимые доказательства существования пластидной РНК-полимеразы, ряд данных указывают на активную роль РНК-полимеразы ядерного кодирования в пластидах (см. главу 3).

"Фотосинтетические" гены пластид

Гены субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы. Процесс фотосинтеза включает в себя ряд темновых и световых реакций. В фиксации CO_2 в темновой фазе принимает участие множество ферментов цикла Кальвина, из которых лишь один — рибулозодифосфаткарбоксилаза (РДФК) — частично, а иногда полностью кодируется хлоропластным геномом [Shinozaki et al., 1988].

Основной белок стромы хлоропластов — рибулозодифосфаткарбоксилаза состоит из восьми идентичных больших субъединиц (LS) с молекулярной массой 53—55 кД и восьми идентичных малых субъединиц (SS) с молекулярной массой 12—14 кД. У высших растений и зеленых водорослей ма-

лую субъединицу кодирует ядерный, а большую — хлоропластный геном [Ohyama et al., 1986; Shinozaki et al., 1986; Hallick et al., 1993]. У бурых и красных водорослей гены обеих субъединиц РДФК находятся в хлоропластном геноме [Reith, Cattolico, 1986], что представляет чрезвычайный интерес с позиции биосистематики и эволюции клеточных геномов. В тех случаях, когда в хлоропластном геноме находятся оба *rbc* гена, они составляют единый оперон, как это описано для цианобактерий и цианелл [Sugiura, 1992]. Ген *rbcL* кукурузы — первый хлоропластный ген, который был клонирован и секвенирован [McIntosh et al., 1980]. Ген *rbcL* секвенирован у огромного числа видов растений, на основании этих данных сделан ряд важных выводов о филогенетическом родстве видов [Zurawski, Clegg, 1987].

Гены компонентов тилакоидных мембран пластид. Тилакоидные мембраны хлоропластов включают в себя четыре различных комплекса: фотосистемы I и II, цитохромный комплекс b/f и АТФ-синтазу. Эти гены были идентифицированы с помощью следующей процедуры: клонированные фрагменты ДНК помещали в транскрипционно-трансляционную систему, или же выделенная мРНК транслировалась в бесклеточной системе. Синтезированный белок идентифицировали с помощью специфических антител [Herrmann et al., 1985]. После опубликования первых данных по секвенированию последовательностей хлоропластной ДНК некоторые гены идентифицировали методом белкового (western) блоттинга с помощью антител против синтетических олигопептидов, созданных по данным ДНК сиквенса [Steinmetz et al., 1986]. Применялся также метод сопоставления последовательностей аминокислот выделенных белков с последовательностями аминокислот, определенными на основе данных ДНК сиквенсов [Fish, Bogorad, 1986]. Таким путем к настоящему времени идентифицировано 27 хлоропластных генов фотосинтетических мембранных комплексов.

Гены фотосистемы I. Пять белковых компонентов фотосистемы I контролирует хлоропластный геном — это гены *psaA, psaB, psaC, psaI* и *psaJ* (табл. 2.5). Два первых кодируют субъединицы A1 и A2 P700 апопротеина хлорофилла *a* и у высших растений расположены рядом на карте (см. рис. 2.2). В отличие от них у *Chlamydomonas* данный ген *psaA* разделен на три экзона, разбросанных в разных местах пластома, и для образования функциональной мРНК необходим сплайсинг (см. раздел "Интроны" в главе 3) [Sugiura, 1992]. Ген *psaC* кодирует апопротеин размером 9 кД для Fe-S-центров A и B [Sugiura, 1992].

Гены фотосистемы II. Хлоропластный геном содержит гены по крайней мере 12 компонентов фотосистемы II (табл.2.5). Ген *psbA,* кодирующий белок массой 32 кД, был первым геном фотосистем, секвенированным у шпината и табака [Zurawski et al., 1982]. Поскольку 32 кД белок связывается с

Таблица 2.5

Белок-кодирующие пластидные гены [по Hagemann, Hagemann, 1994]

Ген	Продукт гена	Число аминокислот (у *Nicotiana)*
Гены рибосомальных белков *30S субъединица*		
rps 2	CS 2	236
rps 3	CS 3	218
rps 4	CS 4	201
rps 7	CS 7	155
rps 8	CS 8	134
rps 11	CS 11	138
rps12^{i}	CS 12	123
rps 14	CS 14	100
rps 15	CS 15	15
rps 16^{i}	CS 16	86
rps 18	CS 18	101
rps19	CS 19	92
50S субъединица		
rpl 2^{i}	CL 2	274
rpl 14	CL 14	123
rpl 16^{i}	CL 16	134
rpl 20	CL 20	128
rpl 21	CL 21	116 *(Marchantia)*
rpl 22	CL 22	155
rpl 23	CL 23	93
rpl 32	CL 32	55
rpl 33	CL 33	66
rpl 36	CL 36	37
Гены РНК-полимеразы и матуразы		
rpo A	α-субъединица	337
rpo B	β-субъединица	1070
rpo C1^{i}	β′-субъединица	687
rpo C2	β″-субъединица	1392
mat K	Интронная матураза (*Epifagus*)	
Гены NADH-дегидрогеназы		
ndh A^{i}	Субъединица 1	364
ndh B^{i}	Субъединица 2	387
ndh C	Субъединица 3	120
ndh D	Субъединица 4	509
ndh E	Субъединица 4L	101
ndh F	Субъединица 5	710
ndh G	Субъединица 6	176

Продолжение табл. 2.5

Ген	Продукт гена	Число аминокислот (у *Nicotiana)*
ndh I	"psbG" полипептид 27 кД	284
ndh H	ORF 393; субъединица 49 кД	393
frx B	ORF 167; 18 кД Fe-S-белок ORF 158	167 158
Гены полипептидов стромы		
rbcL	Большая субъединица рубиско	477
inf A	Инициирующй фактор 1	96
tuf A	Фактор элонгации EF-Tu (*Chlamydomonas*)	
clp P	АТФ-зависимая протеаза	
Гены фотосистемы I		
psa A	P700 апопротеин Ia	750
psa B	P700 апопротеин Ib	734
psa C	9 кД Fe-S-белок	81
psa I	I-полипептид	
psa J	J-полипептид	
Гены фотосистемы II		
psb A	Полипептид реакционного центра D_1	353
psb B	47 кД хлорофилл апопротеин	508
psb C	43 кД хлорофилл апопротеин	473
psb D	Полипептид реакционного центра D_2	453
psb E	α-субъединица цитохрома b_{559}	83
psb F	β-субъединица цитохрома b_{559}	39
psb G	G -белок	284
psb H	Фосфопротеин 10 кД	73
psb I	I-полипептид 4,8 кД	52
psb K	K-полипептид 3,9 кД	
psb L	L-полипептид ФСII	
psb M	M-полипептид ФСII	
psb N	N-полипептид ФСII	
Гены комплекса цитохром *b/f*		320
pet A	цитохром *f*	215
pet B[i]	цитохром b_6	160
pet D[i]	Субъединица IV	
pet G	Субъединица V; ORF 37	
H^+ АТФаза		
atp A	α-субъединица	507
atp B	β-субъединица	498
atp E	ε-субъединица	133
atp F[i]	Субъединица I	184
atp H	Субъединица III	81
atp I	Субъединица IV	247

[i] Гены с интронами.

гербицидами, в частности с атразином, ген *psbA* представляет агрономическую ценность и наряду с *rbcL* геном является одним из наиболее изученных. Следует заметить, что оба этих гена транскрибируются по моноцистронному типу, характерному для генов ядра, тогда как все остальные идентифицированные фотосинтетические гены транскрибируются полицистронно, подобно генам прокариот (см. табл. 2.5) [Sugiura, 1992].

Гены *psbB* и *psbC* кодируют соответственно белки массой 47 и 43 кД, входящие в состав мембран фотосистемы II [Sugiura, 1992].

Белок 32 кД, называемый D1, вместе с белками D2 (продукт гена *psbD*) и цитохромом b559 (две его субъединицы кодируют соответственно гены *psbE* и *psbF*) составляют реакционный центр фотосистемы II [Shinozaki et al., 1988].

У высших растений гены белков *psbC* и *psbD* перекрываются в среднем на 50 п.н., что связано скорее всего с механизмом регулирования количества белка, продуцируемого каждым геном в комплексе (см. главу 3).

Гены цитохромного комплекса b/f. Из семи компонентов, входящих в цитохромный комплекс b/f, пять контролируются ДНК хлоропластов (табл. 2.5). Продуктом гена *petA* является цитохром *f*, *petB* — цитохром *b6*. Гены *petB* и *petD* у высших растений входят в состав единой транскрипционной структуры с генами фотосистемы II — *psbB* и *psbH*.

В состав нуклеотидной последовательности *petD* гена у зеленой водоросли KS3/2 входит самый большой из всех известных к настоящему времени интронов — 3,5 т.п.н. [Kück, 1989] (см. главу 3).

Гены АТФ-синтазы. АТФ-синтазу составляют два комплекса: CF_1 и CF_0. Первый состоит из пяти, второй — из четырех субъединиц. Хлоропластный геном контролирует три субъединицы — α, β и ε — CF_1 комплекса и три субъединицы — I, III и IV — CF_0 комплекса (см. табл. 2.5). Гены β и ε субъединиц (*atpB* и *atpE*) перекрываются на четыре пары оснований, так что первые два нуклеотида TGA стоп-кодона *atpB* и предшествующий им A нуклеотид формируют инициирующий кодон ATG *atpE* гена. Гены трех субъединиц CF_0 (*atpI, atpH, atpF*) расположены рядом непосредственно перед геном *atpA* (см. рис. 2.1—2.5) [Sugiura, 1992].

Гены NADH-дегидрогеназы

В хлоропластном геноме высших растений выявлены участки, кодирующие последовательности, гомологичные 11 белкам, входящим в состав дыхательной цепи NADH-дегидрогеназы митохондрий [Shinozaki et al., 1986; Ohyama et al., 1986]. Показано, что эти гены активно транскрибируются и подвергаются сплайсингу в хлоропластах, что приводит к мысли о наличии

в этих органеллах респираторной дыхательной цепи. Требуется, однако, доказать, что на основании этих транскриптов формируются полноценные функциональные белки. Примечательно, что ни в одном из секвенированных хлоропластных геномов водорослей гены NADH-дегидрогеназы не найдены (табл. 2.6).

Таблица 2.6

Перечень известных генов некоторых полностью секвенированных пластидных геномов*[по Sugiura et al., 1998]

	Наземные растения		Водоросли				
	Фотосинтетики**	*Epifagus****	*Chlorella*	*Euglena*	*Odontella*	*Porphyra*	*Cyanelle*
Всего	**105~113**	**40**	**105**	**87**	**129**	**183**	**145**
Генетическая система	59~63	38	61	58	78	98	79
Фотосинтез							
Rbc и тилакоиды	31~32	0	32	27	42	44	41
NADH-дегидрогеназы	11	0	0	0	0	0	0
Фикобилисомы	0	0	0	0	0	10	7
Биосинтез и прочие	2~8	2	11	2	9	31	18

* *ycf* и уникальные ORF не включены.

** Включая рис, кукурузу, табак, черную сосну и печеночник.

*** Нефотосинтезирующее паразитическое высшее растение.

* * *

Мы рассмотрели коротко далеко не полный перечень хлоропластных генов, открытых к моменту написания этой главы. Существует ряд генов, кодирующих так называемые инициирующие факторы (IF), один из которых — *if-1* — входит в состав *rpl23* оперона у шпината, располагаясь между генами *rps8* и *rpl36*. Однако у табака гомологичная последовательность в том же районе хпДНК не составляет полноценного ORF, но транскрибируется вместе с соседними генами (см. рис. 2.7). Эта же последовательность была обнаружена в ядерной ДНК табака [Wakasugi et al., цит. по Sugiura, 1992]. Удивительно, что лишь один из компонентов кластера, содержащего 12 генов, был дуплицирован и перенесен в ядро [Sugiura, 1992].

Описан также ген пшеницы (*clpP*), кодирующий протеолитическую субъединицу АТФ-зависимой протеазы. Этот фермент деградирует непол-

ные полипептиды и несобранные в комплексы белки в хлоропластах [Gray et al., 1990].

Ряд неожиданностей принесли результаты секвенирования геномов пластид красных и желто-зеленых водорослей: кодирующая способность их геномов значительно превысила таковую всех ранее секвенированных пластомов (см. главу 7).

В последние годы были исследованы еще некоторые пластидные гены, функцию отдельных удалось установить с помощью метода трансформации пластома, они описаны в главе 13. Появились уточненные данные, касающиеся первого из секвенированных пластидных геномов — табака [Wakasugi et al., 1998a]. Сравнительный анализ, проведенный для 19 полностью секвенированных пластомов, помог установить функцию некоторых не идентифицированных ранее рамок считывания и решить ряд вопросов эволюции видов [Las Rivas et al., 2002].

Результаты многочисленных исследований, начатых около 50 лет назад с попыток выявления вещества наследственности в хлоропластах, к концу XX в. привели к блистательным достижениям:

— построены полные карты нуклеотидных последовательностей хлоропластной ДНК для разных в систематическом отношении групп растений;

— идентифицировано на этих картах множество генов, относящихся к разным функциональным группам;

— выяснены особенности группировки этих генов в кластеры.

Генетическая состоятельность пластид растений уже ни у кого не вызывает сомнений.

Несмотря на эти успехи, все еще остается значительное количество неидентифицированных ORF и ряд протяженных участков, в которых пока не обнаружены ни гены, ни открытые рамки считывания. Функция этих участков может оказаться совершенно неожиданной.

Литература

Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сравнительная характеристика структурной организации геномов хлоропластов и митохондрий растений // Генетика. 1998. Т. 34, № 1. С. 5—22.

Bedbrook J.R., Bogorad L. Endonuclease recognition sites mapped on *Zea mays* chloroplast DNA // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1976. Vol. 73. P. 4309—4319.

Bedbrook J.R., Kolodner R. The structure of chloroplast DNA // Annu. Rev. Plant Physiol. 1979. Vol. 30. P. 593—620.

Bendich A.J. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome // BioEssays. 1987. Vol. 6. P. 279—282.

Driesel A.J., Crouse E.J., Gordon K. et al. Fractionation and identification of spinach chloroplast transfer RNAs and mapping of their genes on the restriction map of chloroplast DNA // Gene. 1979. Vol. 6. P. 285—306.

Eneas-Filho J., Hartley M.R., Mache R. Pea chloroplast ribosomal proteins: characterization and site of synthesis // Mol. Gen. Gen. 1981. Vol. 184. P. 484—488.

Fish L.E., Bogorad L. Identification and analysis of the maize P700 chlorophyll a proteins of PSI-A1 and PSI-A2 by high pressure liquid chromatography analysis and partial sequence determination // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 8134—8139.

Graf L., Kössel H., Stutz E. Sequencing of 16S-23S spacer in a ribosomal RNA operon of *Euglena gracilis* chloroplast DNA reveals two tRNA genes // Nature. 1980. Vol. 286. P. 908—910.

Gray J.C., Hird S.M., Dyer T.A. Nucleotide sequence of a wheat chloroplast gene encoding a proteolytic subunit of an ATP-dependent protease // Plant Mol. Biol. 1990. Vol. 15. P. 947—950.

Hagemann R., Bock R., Hagemann M. Extranuclear inheritance: Plastid Genetics// Progress in Botany. 1996. Vol. 57. P. 197—217.

Hagemann R., Hagemann M. Extranuclear inheritance: Plastid Genetics // Progress in Botany. 1994. Vol. 55. P. 260—275.

Hagemann R., Hagemann M., Metzlaff M. Extranuclear inheritance: Plastid Genetics // Progress in Botany. 1987. Vol. 49. P. 245—263.

Hager M., Biehler K., Illerhaus J. et al. Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b_6f complex // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 5834—5842.

Hallick R.B. Proposals for the naming of chloroplast genes. II Update to the nomenclature of genes for thylakoid membrane polypeptides // Plant Mol. Biol. Rep. 1989. Vol. 7. P. 266—275.

Hallick R.B., Hong L., Drager R.G. et al. Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA // Nucl. Acids Res. 1993. Vol. 21. P. 3537—3544.

Herrmann R.G., Possingham J. Plastid DNA //The Plastome. Wein: Springer-Verlag, 1980. P. 45—96.

Herrmann R.G., Westhoff P., Alt J. et al. Thylakoid membrane proteins and their genes // Molecular Form and Function of the Plant Genome. New York: Plenum Press. 1985. P. 233—256.

Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R. et al. The complete sequence of the rice (*Orysa sativa)* chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals // Mol. Gen. Gen. 1989. Vol. 217. P. 185—194.

Kirk J.T.O., Tilney-Bassett R.A. The plastids. San-Francisco: Freeman, Co., 1967. 528 p.

Kirk J.T.O., Tilney-Bassett R.A. The plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance. Amsterdam-New York: Elsevier. North-Holland Biomedical Press. 2nd ed. 1978. 650p.

Knauf U., Hachtel W. The genes encoding subunits of ATP synthase are conserved in the reduced plastid genome of the heterotrophic alga *Prototheca wickerhamii* // Mol. Gen. Gen. 2002. Vol. 267. P. 492—497.

Kolodner R., Tewari K.K. The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants// Biochim. Biophys. Acta. 1975. Vol. 402. P. 372—390.

Kowallik K., Stoebe B., Schaffran I. et al. The chloroplast genome of a chloropyll a+c — containing alga, *Odontella sinensis* //Plant Mol. Biol. Rep. 1995. Vol. 13. P. 336—342.

Kück U. The intron of a plastid gene from a green alga contains an open reading frame for a reverse transcriptase-like enzyme // Mol. Gen. Gen. 1989. Vol. 218. P. 257—265.

Lerbs S., Bräutigam E., Parthier B. Polypeptides of DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplasts: characterization by antibody-linked polymerase assay and determination of sites of synthesis // EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 1661—1666.

Leible M.B., Berger S., Schweiger H.G. The plastome of *Acetabularia mediterranea* and *Batophora oersteddi:* inter- and intraspecific variability and physical properties // Curr. Genet. 1989. Vol. 15. P. 355—361.

Lilly J.W., Havey M.J., Jackson S.A., Jiang J. Cytogenetic analysis reveals the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants // Plant Cell. 2001. Vol. 13, No. 2. P. 245—254.

Maier R.M., Neckermann K., Igloi G.L., Kössel H. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing // J. Mol. Biol. 1995. Vol. 251, No. 5. P. 614—628.

Manning J.E., Wolstenholme D.R., Ryan R.S. et al. Circular chloroplast DNA from *Euglena gracilis* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1971. Vol. 68. P. 1169—1173.

McIntosh L., Poulsen C., Bogorad L. Chloroplast gene sequence for the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase of maize // Nature. 1980. Vol. 288. P. 556—560.

Miyamura S., Kuroiwa T., Nagata T. Multiplication and differentiation of plastid nucleoids during development of chloroplasts and etioplasts from proplastids in *Triticum aestivum* // Plant Cell Physiol. 1990. Vol. 31, No. 5. P. 596—602.

Ohta N., Sato N., Kuroiwa T. Analysis of the plastid genome of protoflorideophyceous algae *Cyanidioschyzon merolae* // Plant Cell Physiol. 1998. Vol. 39 (Suppl.). P. 54.

Ohyama K., Fukusawa H., Kohchi T. et al. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA // Nature. 1986. Vol. 322. P. 572—574.

Ogihara Y., Isono K., Kojima T. et al. Chinese spring wheat (*Triticum aestivm)* chloroplast genome: complete sequence and contig clones // Plant Mol. Biol. Rep. 2000. Vol. 18. P. 243—253.

Palmer J.D. Comparative organization of chloroplast genomes // Annu. Rev. Genet. 1985. Vol. 19. P. 325—354.

Palmer J.D., Nugent J.M., Herbon L.A. Unusual structure of geranium chloroplast DNA: a triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions and two repeat families // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1987. Vol. 84. P. 769—773.

Pfitzinger H., Weil J.H., Pillay D.T., Guillemaut P. Codon recognition mechanisms in plant chloroplasts // Plant Mol. Biol. 1990. Vol. 14. P. 805—814.

Reith M., Cattolico R.A. Inverted repeat of *Olisthodiscus luteus* chloroplast DNA contains genes for both subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the 32000-dalton Q_B protein: phylogenetic implications // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1986. Vol. 83. P. 8599—8603.

Reith M., Munholland J. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome // Plant Mol. Biol. Rep. 1995. Vol. 13. P. 333—335.

Renner O. Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution // Ber. Verhandl. Sächsisch. Acad. Wiss. Leipzig, 1934. Bd. 86. S. 241.

Ris H. Ultrastructure and molecular organization of genetic systems // Can. J. Genet. Cytol. 1961. Vol. 3. P. 95—120.

Ris H., Plaut W. The ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplasts of *Chlamydomonas* // J. Cell. Biol. 1962. Vol. 13. P. 383—391.

Rose R.J., Possingham J.V. The localisation of (^{3}H) thymidine incorporation in the DNA of replicating spinach chloroplasts by electron microscope autoradiography // J. Cell Sci. 1976. Vol. 20. P. 341—355.

Sato S., Nakamura Y., Kaneko T. et al. Complete structure of the chloroplast genome of Arabidopsis thaliana // DNA Res. 1999. Vol. 6, No. 5. P. 283—290.

Schmitz-Linneweber C., Maier R.M., Alcaraz J.P. et al. The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization // Plant Mol. Biol. 2001. Vol. 45. P. 307—315.

Shimada H., Sugiura M. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes // Nucl. Acids Res. 1991. Vol. 19. P. 983—995.

Shimko N., Liu L., Lang F. Burger G. GOBASE: The organelle genome database // Nucl. Acids Res. 2001. Vol. 29. P. 128—132.

Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M. et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 2043—2049.

Shinozaki K., Hayashida N., Sugiura M. Nicotiana chloroplast genes for components of the photosynthetic apparatus //Molecular Biology of Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, 1988. P. 1—25.

Steinmetz A.A., Castroviejo M., Sayre R.T., Bogorad L. Protein PSII-G: an additional component of photosystem II identified through its plastid gene in maize // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 2485—2488.

Stirewalt V.L., Michalowski C.B., Loffelhardt W. et al. Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa* // Plant Mol. Biol. Rep. 1995. Vol.13. P. 327—332.

Sugiura M. The chloroplast genome // Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 19. P. 149—168.

Sugiura M., Hirose T., Sugita M. Evolution and mechanisms of translation in chloroplasts // Annu. Rev. Genet. 1998. Vol. 32. P. 437—459.

Tewari K.K., Kolodner R., Chu N.M., Meeker R.R. Structure of chloroplast DNA // Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants. NewYork; London: Plenum Press, 1977. P. 15—36.

Turmel M., Otis C., Lemieux C. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: Insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. Vol. 96, No. 18. P. 10248—10253 .

Wakasugi T., Tsudzuki J., Ito S. Loss of all ndh genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thumbergii* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 9794—9798.

Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M. et al. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris:* the existence of genes possibly involved in chloroplast division // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 5967—5972.

Wakasugi T., Nishikawa A., Yamada K., Sugiura M. Complete nucleotide sequence of the plastid genome from a fern, *Psilotum nudum* // Endocytobiosis Cell Res. 1998. Vol. 13 (Suppl). P. 147.

Wakasugi T., Sugita M., Tsudzuki T., Sugiura M. Updated gene map of tobacco chloroplast DNA // Plant Mol. Biol. Rep. 1998a. Vol. 16. P. 231—241.

Watson J.C., Surzycki S.J. Both the chloroplast and nuclear genomes of *Chlamydomonas reinhardtii* share homology with *Escherichia coli* genes for transcriptional and translational components // Curr. Genet. 1983. Vol. 7. P. 201—210.

Weil J.H. Organization and expression of the chloroplast genome // Plant Science. 1987. Vol. 49. P. 149—157.

Wolfe K.H., Morden C.W., Palmer J.D. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1992. Vol. 89. P. 10648—10652.

Zurawski G., Bohnert H.J., Whitfeld P.R., Bottomley W. Nucleotide sequence of the gene for the M_R 32.000 thylakoid membrane protein from *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debney* predicts a totally conserved primary translation product of M_R 38.950 // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1982. Vol. 79. P. 7699—7703.

Zurawski G., Clegg M.T. Evolution of higher-plant chloroplast DNA-encoded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies //Annu. Rev. Plant Physiol. 1987. Vol. 38. P. 391—418.

Глава 3

Регуляция экспрессии генома пластид

Предшественники пластид — пропластиды — попадают в зиготу с цитоплазмой яйцеклетки, иногда — с цитоплазмой мужского родителя. Пропластиды не возникают заново — они реплицируются и в недифференцированном состоянии обнаруживаются в меристематических клетках развивающихся растений [Kirk, Tilney-Bassett, 1978]. Пропластиды содержат небольшое количество ДНК, РНК, рибосом и растворимых белков [Mullett, 1988].

В онтогенезе растений пропластиды дифференцируются, превращаясь в хлоропласты или нефотосинтезирующие пластиды. К последним относятся этиопласты — предшественники хлоропластов в этиолированных растениях, растущих в темноте, а также пластиды, специализирующиеся на синтезе и накоплении определенных соединений: каротиноидов (хромопласты), крахмала (амилопласты), терпеноидов или липидов [Mullet, 1988].

Несмотря на разнообразие биосинтетических процессов в разных типах пластид, состав и организация ДНК у всех одинаковы [Thompson, 1980]. Это прекрасно согласуется с данными о взаимопревращении различных типов пластид [Thomson, Whatley, 1980; Huff, 1984]. Вполне естественно, что в процессе специализации пластид происходят изменения в экспрессии генома этих органелл.

При развитии фотосинтезирующих тканей, прежде всего мезофилла листа, происходит как интенсивное деление пластид, так и их рост. На рис. 3.1 приведено сравнение размеров меристематической клетки с пропластидами с клеткой мезофилла листа, содержащей многочисленные хлоропласты.

Деление пластид и репликация пластидной ДНК

Механизмы, регулирующие деление пластид и осуществляющие контроль за их количеством в клетке, до сих пор не известны. Показано, что у мутанта *Arabidopsis,* для которого характерны мелкие пластиды, наблюдается увеличение их количества на клетку по сравнению с клетками дикого типа [McCourt et al., 1987]. Изучение пластид у пшеницы позволило заключить, что число хлоропластов на клетку увеличивается пропорционально размерам самой клетки. Иными словами, хлоропласты делятся и распределяются в пространстве, занимая некую постоянную часть мезофильной клетки [Mullet, 1988].

Электронномикроскопические исследования [Tewari, 1988], а также двумерный электрофорез и *in vitro* репликация позволили предположительно

картировать точку начала репликации *(origin)* в спейсере между генами 16S рРНК и 23S рРНК [Tewari, 1988; Reddy et al., 1994; Sears et al., 1996].

По результатам ряда исследований была проведена аналогия между делением пластид и делением бактериальной клетки [Osteryoung, Vierling, 1995; Osteryoung, 2000]. В строме хлоропластов найден кодируемый ядром белок FtsZ, являющийся ГТФазой, который в месте деления пластиды образует

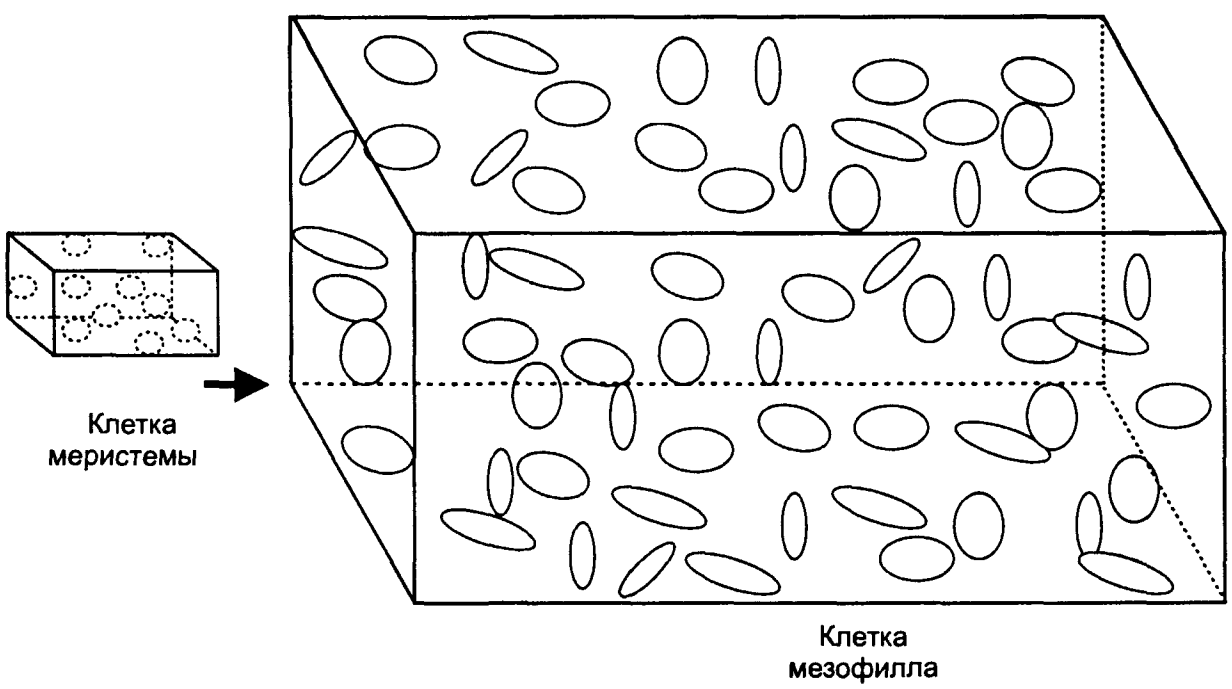


Рис. 3.1. Диаграмма, отражающая превращение меристематической клетки ячменя с 10 пропластидами диаметром 1 мкм в мезофильную клетку листа с 65 хлоропластами диаметром 6—8 мкм [по Mullet, 1988]

электронно-плотное кольцо, напоминающее FtsZ-кольцо (подобие цитоскелета) у делящихся бактерий. Идентификация гена данного белка у растений явилась стартовой точкой в исследовании механизмов контроля деления пластид и их количества на клетку в разных тканях и при изменении внешних условий [Osteryoung, Vierling, 1995]. В дальнейшем был описан еще один ген, *MinD,* также участвующий в делении хлоропластов высших растений [Osteryoung, McAndrew, 2001]. Механизмы регуляции деления пластид еще до конца не поняты и в настоящее время интенсивно изучаются [Osteryoung, 2000; Miyagishima et al., 2001a; Miyagishima et al., 2001b; Mori et al., 2001].

Увеличение числа пластид в клетках и их размеров в онтогенезе растений связано с теми функциями, которые выполняют эти органеллы и которые определяются совместно геномами ядра и самих пластид. Далее в этой главе будут обсуждены основные этапы экспрессии генома пластид.

Транскрипция пластидных генов

Большая часть хлоропластных генов высших растений организована в полицистронные кластеры, лишь немногие гены составляют исключение: *rbcL, psbA,* часть генов транспортных РНК и некоторые другие. Примечательно, что в полицистронную единицу могут быть собраны не только гены, кодирующие белки со сходными функциями или субъединицы одного сложного белка, но и гены, определяющие белки с совершенно разными функциями (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Примеры известных моно- и полицистронных транскрипционных единиц пластидных генов высших растений [по Sugita, Sugiura, 1996]

1. Моноцистронные транскрипционные комплексы
ndhF, psbA, psbM, psbN, rbcL,* большинство тРНК генов
2. Дицистронные или полицистронные транскрипционные комплексы
А. Аналогичные или связанные функции
atpB-atpE
32 rps12-rps7
psbE-psbF-psbL-psbJ
*psbD-psbC**-orf62* (у двудольных)
*psbK-psbI-psbD**-psbC**- orf62-trnG* (у однодольных)
ndhC- ndhK- ndhJ
16S rDNA-trnI-trnA-23S rDNA-4,5S rDNA-5S rDNA
rpoB-rpoC1-rpoC2
rpl23-rpl2-rps19-rpl22-rps3- rpl16- rpl14-rps8- infA- rpl36-rps11-rpoA
trnE-trnY-trnD
Б. Гетерологичные функции
clpP-52 rps12-rpl20
orf31-petG-psaJ-rpl33-rps18
psaA-psaB-rps14
psaC-ndhD
psbB-psbH-petB-petD
psbK-psbI-trnG
ndhA-ndhI-ndhG-ndhE-psaC
*rpl32-sprA***
*rps2-atpI-atpH**-atpF-atpA*

* Дицистронная мРНК *trnK-psbA* обнаружена у горчицы.

** Гены котранскрибируются с предшествующими, но также транскрибируются с собственных промоторов.

Первый этап генной экспрессии осуществляется ферментами транскрипции — РНК-полимеразами, важнейшую роль на этом этапе играют промоторы и белковые факторы, регулирующие транскрипцию.

Хлоропластные промоторы

Любая РНК-полимераза связывается с ДНК в строго определенных местах генома, называемых промоторами. Таким образом, промотор определяет точное место начала транскрипции. В хлоропластах обнаружено два типа промоторов.

PEP-промоторы. Для прокариот характерно наличие двух промоторных последовательностей, расположенных на расстоянии –10 и –35 пар нуклеотидов от начала гена и имеющих структуру соответственно TATAAT и TGTTGACA [Hawley, McClure, 1983]. Промоторные области большинства пластидных транскрипционных единиц (моно- или полицистронов), как было установлено, также состоят из двух блоков: ctp1 ("аналога –35") и ctp2 ("аналога –10") [Link, 1984; Bradley, Gatenby, 1985; Gruissem, Tonkyn, 1993]. На рис. 3.2 приведены промоторные последовательности шести пластидных генов. Как легко заметить, они весьма сходны со структурой бактериальных промоторов, хотя и не всегда тождественны им.

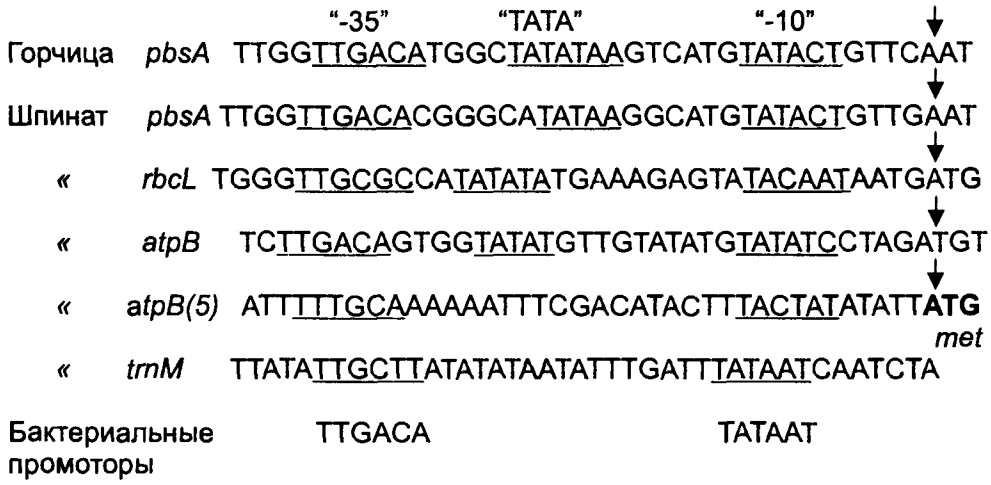


Рис. 3.2. Хлоропластные промоторные области, идентифицированные с использованием делетированных/мутантных генов и транскрипционных систем *in vitro*. *atpB(5)* — транскрипт гена, не имеющего 5′-нетранслируемой лидерной области. Стрелка указывает на точку начала транскрипции. Внизу приведена для сравнения последовательность бактериальных промоторов "-35" и "-10" [по Sugiura, 1992]

Анализ более 50 мутантов, несущих определенное изменение в промоторной области гена *psbA* шпината, показал, что мутации могут снизить эффективность промотора более чем в пять раз. Однако в отличие от *E.coli* не удалось идентифицировать ни одной мутации, которая привела бы к пол-

ному блоку инициации транскрипции хлоропластной РНК-полимеразой *in vitro*. Мутагенное изменение промоторов в сочетании с анализом эффективности инициации транскрипции нескольких генов *in vitro* показало, что эффективность промоторов различна и потому может быть важным элементом в регуляции транскрипции [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Промоторы ctp1- и ctp2, узнаваемые пластидной РНК-полимеразой, получили название PEP-промоторы (**p**lastid-**e**ncoded RNA **p**olymerase).

NEP и другие типы промоторов. Не все пластидные гены имеют сходную с *E. coli* ("–10", "–35") структуру промоторов. У наиболее протяженных полицистронных первичных транскриптов *atpB-atpE* и *rps16* промоторные области значительно отличаются: транскрипция *atpB-atpE* может инициироваться с четырех различных промоторных участков, самый проксимальный из которых даже перекрывается с кодирующей областью [Bennet et al., 1990]. Ген *rps16* содержит "–10" мотив, но не содержит "–35" [Sugita, Sugiura, 1996].

Необычная ситуация наблюдается с генами *trnR1* и *trnS1,* не имеющими ctp1-ctp2 промоторов: эффективная транскрипция этих генов с помощью растворимой РНК-полимеразы *in vitro* происходит, даже если участок перед кодирующей областью имеет протяженность менее 10 п.н. Однако транскрипция отсутствует у делеционных мутантов с утраченной частью *trn* гена, что указывает на наличие промотора внутри кодирующей области этого гена. Такое же расположение промоторов описано для *мРНК* и *5S РНК* генов, транскрибируемых ядерной РНК-полимеразой III [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Некоторые *мРНК* гены хлоропластов шпината и *Chlamydomonas* совсем не требуют предлежащих (upstream) последовательностей для транскрипции *in vitro,* вероятно, их промоторы, как и в случае с генами *trnR1* и *trnS1,* находятся внутри кодирующей области самих генов [Stern et al., 1997].

Другие пластидные *мРНК* гены транскрибируются с помощью комбинации предлежащего (upstream) и внутреннего промоторов. Так, например, у гена *trnI* промоторная область, подобная ctp1-ctp2, расположена на расстоянии 39 п.н. от начала гена. Если она утрачивается, ген транскрибируется в пять раз менее интенсивно. Вероятно, существует второй, альтернативный промотор внутри самого гена, который может, хотя и менее успешно, заменить утраченный [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Обращает на себя внимание тот факт, что ген *psbA* и другие связанные с фотосинтезом пластидные гены высших растений между промоторами прокариотического типа содержат мотив, напоминающий хорошо известный ТАТА-бокс ядерных генов (рис. 3.2) [Sugita, Sugiura, 1996].

Подобный тип промоторов обнаружен у генов, кодирующих рибосо-

мальные РНК, и других так называемых "housekeeping" генов (обеспечивающих работу органельного генома). Этот промотор назвали NEP-промотором, поскольку его узнает исключительно ядерная РНК-полимераза пластид (**n**uclear-**e**ncoded RNA **p**olymerase). NEP-промоторы имеют многие гены, включая кодирующие АТФазные субъединицы и рибосомальные белки [Stern et al., 1997]. Обнаружено, что NEP-промоторы кукурузы имеют гомологичные последовательности вокруг сайта инициации транскрипции, включая консенсусную последовательность ATAGAATA/GAA, идентифицированную у табака. Таким образом, NEP-транскрипционный аппарат одно- и двудольных сохранил ряд консервативных черт [Silhavy, Maliga, 1998].

Как уже упоминалось, у некоторых пластидных генов описаны множественные сайты инициации транскрипции.

Один из нескольких промоторов генов *atpB* и *16S рДНК* не содержит никакого повторяющегося мотива и активен на любой стадии развития хлоропластов, обеспечивая конститутивную транскрипцию этих генов [Sugita, Sugiura, 1996].

Иначе регулируется транскрипция гена *psbD*: по меньшей мере один из нескольких сайтов инициации транскрипции этого гена активируется светочувствительным промотором, который в свою очередь меняет активность в зависимости от специфических хлоропластных белковых факторов и/или различных РНК-полимераз [Sugita, Sugiura, 1996].

Описан светочувствительный промотор также для *petG* гена кукурузы. Структура таких промоторов весьма специфична [Haley, Bogorad, 1990].

Белковые факторы контролируют активность промоторов

У прокариот присоединение РНК-полимеразы к промотору происходит при участии особых белковых факторов. Регуляторные ДНК-связывающие белки, или σ-*факторы,* присоединяются к центру каталитической активности (catalytically active core) бактериальной РНК-полимеразы и определяют специфичность инициации транскрипции [Helmann, Chamberlin, 1988].

В хлоропластах также обнаружили белковую фракцию, которая усиливает связывание бактериальной РНК-полимеразы с хлоропластными промоторами и тем самым увеличивает транскрипционную активность *in vitro.* Таким путем присутствие σ-факторов было установлено в пластидах [Tiller et al., 1991; Link, 1994, 1996]. При этом генов, кодирующих σ-факторы, в пластидном геноме не найдено. Зато такой ген был обнаружен в ядре красной водоросли *Cyanidium caldarium* и *Galdieria sulphuraria* и проклонирован [Liu, Troxler, 1996; Tanaka et al., 1996].

Еще один регуляторный белок, так называемый σ-подобный *фактор SLF* (sigma-like factor), был выделен у кукурузы и *Arabidopsis*. Добавление этого белка в несколько раз увеличивало количество хлоропласт-специфических транскриптов как рРНК, так и мРНК *in vitro*. *SLF*, однако, не оказывал эффекта на транскрипцию бактериальной РНК-полимеразы, т.е. он не гомологичен σ-фактору РНК-полимеразы *E. coli* [Igloi, Kössel, 1992; Lahiri, Allison, 2000].

Спорным до сих пор остается вопрос о σ-подобном факторе *SLF*, выделенном у горчицы и шпината [Bülow, Link, 1988]. Данный белок взаимодействует с антителами к σ-фактору РНК-полимеразы *E.coli*. *SLF* у горчицы состоит из трех полипептидов, различающихся по молекулярной массе (29, 52 и 67 кД) и эффективности связывания с хлоропластными промоторами [Tiller et al., 1991]. У шпината с помощью антисыворотки к σ-фактору выделено два *SLF* полипептида — 33 и 90 кД. Интересно, что полипептид 90 кД присутствует только в хлоропластах молодых листьев и не обнаруживается в старых листьях. Этот факт говорит в пользу предположения о возможной роли *SLF* в регуляции онтогенетического развития растений [Igloi, Kössel, 1992].

При исследовании двух *SLF* кукурузы — ZmSig1 и ZmSig3 обнаружена тканеспецифичность их экспрессии: первый белковый фактор активируется в проростках кукурузы параллельно с процессом развития хлоропластов под действием света. В зрелых хлоропластах, однако, изменение светового режима уже не влияет на экспрессию ZmSig1. Второй фактор — ZmSig3 — аккумулируется в бесхлорофильных тканях: корнях, этиолированных проростках, базальной части зеленеющих листьев проростков. Два регуляторных сигмоподобных белка в пластидах кукурузы как бы комплементарны по своему проявлению и могут, вероятно, обеспечивать дифференциальную экспрессию пластидных генов во время развития хлоропластов [Lahiri, Allison, 2000].

Таким образом, к настоящему моменту описан ряд белков, связывающихся с промоторными областями пластома и участвующих в инициации транскрипции. Интересным представляется тот феномен, что, хотя в основном эти белки подобны прокариотическому σ-фактору, гены, кодирующие их структуру, найдены пока только в ядре [Liu, Troxler, 1996; Tanaka et al., 1996; Tan, Troxler, 1999].

РНК-полимеразы пластид

Транскрипция всех известных генов у всех живых организмов осуществляется с помощью фермента РНК-полимеразы. Схема этого процесса представлена на рис. 3.3.

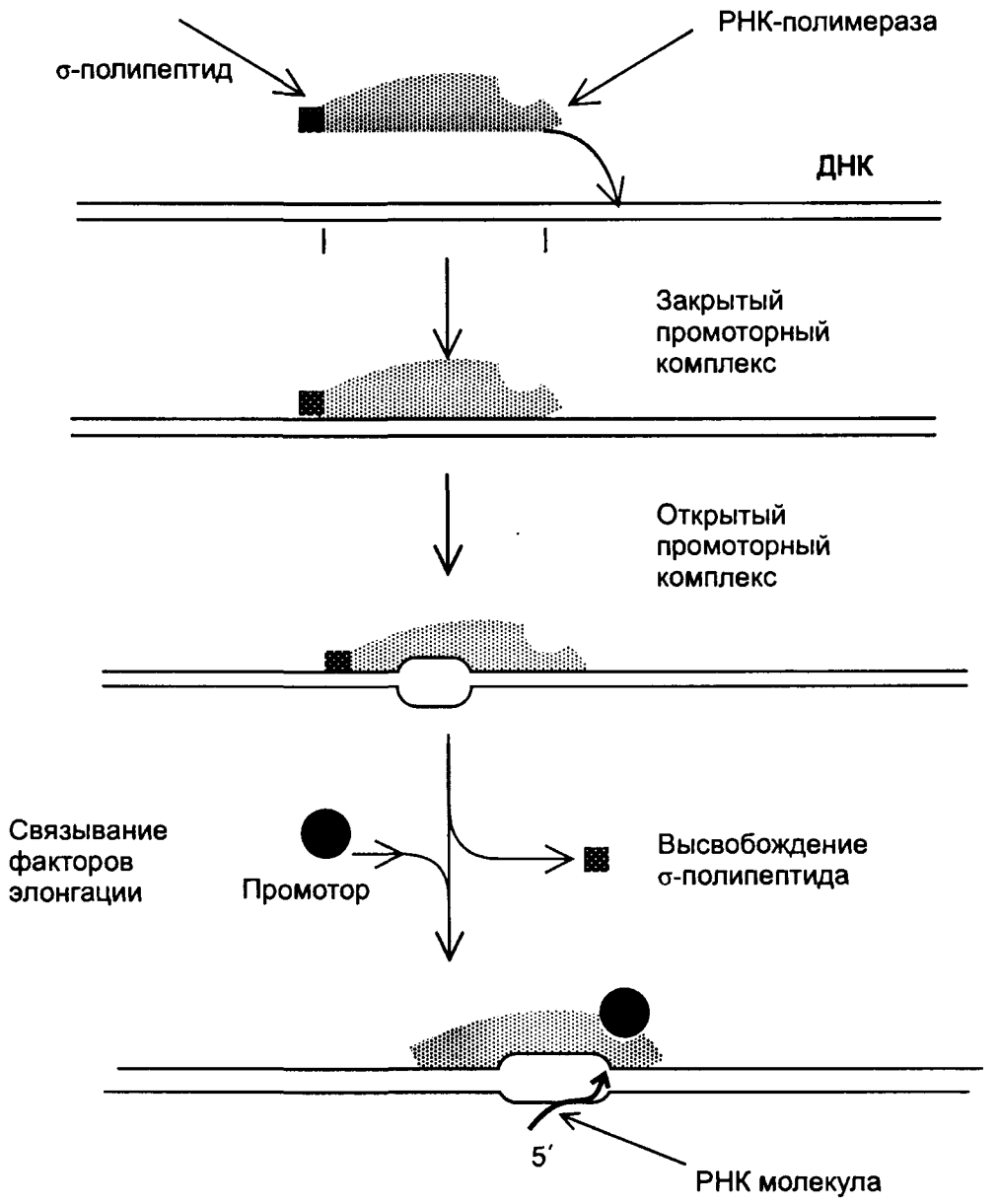


Рис. 3.3. Схематическая диаграмма инициации транскрипции ДНК, катализируемой РНК-полимеразой. Указанные стадии определены при исследовании РНК-полимеразы *E.coli*. Показана молекула ДНК, содержащая промоторную область для РНК-полимеразы. Фермент образует вначале закрытый промоторный комплекс, в котором две нити ДНК остаются полностью связанными. На следующем этапе фермент катализирует открытие небольшого участка ДНК, в результате чего с инициирующего кодона матричной цепочки начинается транскрипция. Для успешного продолжения транскрипции необходимо отщепление σ-полипептида и присоединение других белков, выполняющих роль факторов элонгации [по Alberts et al., 1994]

В хлоропластных геномах всех секвенированных видов растений обнаружены гены *rpoA, rpoB, rpoC1* и *rpoC2*, кодирующие субъединицы фермента хлоропластной РНК-полимеразы (см. рис. 2.1 — 2.5); были также получены доказательства, что эти гены активно экспрессируются. Следовательно, фермент (или ферменты), осуществляющий процесс транскрипции хлоропластной ДНК, кодируется геномом пластид [Igloi, Kössel, 1992].

Пластидная РНК-полимераза, как было показано, существует в форме

растворимого и ДНК-связанного фермента. Последний был назван *TAC* (transcriptionally active chromosome) и выделен впервые из хлоропластов *Euglena gracilis* задолго до обнаружения кодирующих его пластидных генов [Hallick et al., 1976].

Растворимая РНК-полимераза. Этот фермент был выделен из хлоропластов ряда видов впервые еще в 1971 г. у пшеницы [Polya, Iagendorf, 1971]. Ферментный комплекс состоит обычно из 7—13 субъединиц, часть из которых являются продуктами экспрессии *rpoA—rpoC* генов (табл. 3.2). Являются ли дополнительные полипептиды продуктами ядерного генома или же они кодируются какими-то из еще не идентифицированных пластидных ORF — пока не ясно. Не исключено также, что эти белки являются продуктами частичной деградации субъединиц [Igloi, Kössel, 1992].

Таблица 3.2

Молекулярные массы субъединиц РНК-полимеразы [по Gruissem, Tonkyn, 1993]

Организм	Размер субъединиц, кД	Источник
А. *Растворимый фермент*		
E.coli Субъединицы	155, 150, 70, 38 β′ β σ α	Chamberlin, 1974
Кукуруза	180 140 100 95 85 40	Smith, Bogorad, 1974
«	180 140 42 27	Kidd, Bogorad, 1979
Шпинат	150 110 102 80 75 38 25	Lerbs et al., 1983
«	150 145 110 102 82 38	Lerbs et al., 1985
«	150 145 110 102 80 75 38 25	Briat et al.,1987
Горох	150 130 115 110 95 85 75 48 44 39 (90 34 32 27)	Rajasekhar et al., 1991
Консенсус: Гомологи *E.coli*	180 150—140 110—100 90—80 42—38 27—2 β′ β(?) β(?) β′ α ?	
Б. *Транскрипционно активная хромосома (TAC)*		
Euglena	118 85 (28—32 24—26)	Narita et al., 1985
Шпинат	69 60 55 34 15	Briat, Mache, 1980
Горчица	145 125 115 81 57 33 19 17 14	Bülow et al.,1987
Горох	180 140 110 95 85 80 65 47 27	Tewari, Goel,1983

В таблице приведен субъединичный состав растворимой (А) и ДНК-связанной (Б) пластидной РНК-полимеразы. Состав РНК-полимеразы *E.coli* дается для сравнения. Цифры в скобках — молекулярные массы минорных и/или изменчивых компонентов. Консенсус-состав растворимой РНК-полимеразы определен из сравнения субъединиц у различных организмов.

Обращают на себя внимание межвидовые различия структуры РНК-полимеразы. Так, у гороха выявлен белок с молекулярной массой 130 кД, от-

сутствующий как у кукурузы, так и у шпината (табл. 3.2). Специальные эксперименты по удалению этого белка привели к снижению РНК-полимеразной активности в 5—10 раз. При добавлении в инкубационную среду 130 кД полипептида активность фермента полностью восстанавливалась, что указывает на его функциональную значимость для хлоропластов гороха [Igloi, Kössel, 1992]. Более подробно вопросы эволюции пластидной РНК-полимеразы рассмотрены в обзоре [Howe, 1996].

Установлено, что с помощью растворимой РНК-полимеразы в хлоропластах транскрибируются в основном гены белков и транспортных РНК, хотя получены данные и о транскрипции некоторых рРНК генов; чаще всего рРНК гены транскрибируются с помощью *TAC*-полимеразы [Igloi, Kössel, 1992; Gruissem, Tonkyn, 1993].

ДНК-связанная (*TAC*) полимераза. Выделенная впервые из хлоропластов водоросли *Euglena TAC*-полимераза затем была обнаружена и у высших растений: шпината, горчицы и др. [Igloi, Kössel, 1992]. Фермент также оказался состоящим из ряда субъединиц, число которых и молекулярные массы, очевидно, видоспецифичны (табл. 3.2).

Было показано, что *TAC*-полимераза обладает транскрипционной специфичностью по отношению к рРНК генам, т.е. представляет собой рРНК-специфичную РНК-полимеразу. Тем не менее имеются единичные сообщения о том, что *TAC*-полимераза может участвовать в транскрипции и некоторых других генов [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Итак, в клетках растений разных систематических групп обнаружены две разновидности кодируемой пластомом РНК-полимеразы: растворимая и ДНК-связанная. Являются ли эти биохимически различные ферменты с различными температурными, pH- и KCl-оптимумами, по-разному ингибирующиеся при добавлении гепарина, генетически независимыми? Кодируются ли они разными генами или же представляют собой некие посттранскрипционные или даже посттрансляционные модификации?

Окончательного ответа на этот вопрос пока нет, ряд данных говорит в пользу как одного, так и другого предположения.

В частности, обнаруженная функциональная специфичность двух РНК-полимераз к транскрипции белковых мРНК и тРНК (растворимая РНК-полимераза), с одной стороны, и рРНК генов (*TAC*-полимераза), с другой, оказалась не абсолютной. Показано, что растворимая РНК-полимераза хлоропластов гороха и шпината может транскрибировать гены рРНК наряду с мРНК и генами тРНК. В то же время *TAC*-полимераза горчицы и шпината, кроме рРНК, дает транскрипты других генов. Все эти факты говорят скорее в пользу изменения единого исходного (*core)* фермента с помощью каких-то белковых факторов, возможно, ядерного кодирования [Igloi, Kössel, 1992].

Вместе с тем имеются сообщения, что антитела, полученные против бел-

ков — продуктов *rpo* генов у *Euglena* и шпината, не изменяли активности *TAC*-полимеразы, что противоречит представлению о единой генетической природе двух разновидностей РНК-полимераз [Gruissem, Tonkyn, 1993]. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения истинной ситуации.

Ядерная РНК-полимераза пластид

Предположения о существовании у высших растений еще одной транскрипционной системы — РНК-полимеразы ядерного кодирования, импортируемой затем в хлоропласты, делались рядом исследователей. Генетические, молекулярно-биологические и биохимические данные в пользу такого предположения заключаются в следующем [Hagemann et al.,1999]:

1. Выявлен ряд пластидных генов, не имеющих промоторов типа σ^{70}, т.е. не связывающихся для транскрипции с пластидной РНК-полимеразой.

2. Активная транскрипция наблюдается в пластидах нефотосинтезирующего растения-паразита *Epifagus virginiana,* геном которого утерял почти все фотосинтетические гены и все гены субъединиц РНК-полимеразы [Mordon et al.,1991]. Остается невыясненным, имеются ли эти гены в ядре *Epifagus.*

3. У мутанта ячменя *albostrians* хлоропласты полностью лишены рибосом, что делает невозможным трансляцию всех пластомно кодируемых генов. Следовательно, субъединицы пластидной РНК-полимеразы также отсутствуют у данных мутантов. Тем не менее показано, что ряд пластидных генов интенсивно транскрибируется у *albostrians* [Hess et al.,1993].

4. Биохимические анализы выявили в изолированных хлоропластах горчицы по крайней мере две фракции с полимеразной активностью. Одна из фракций была чувствительна к ингибитору прокариотической РНК-полимеразы рифампицину, тогда как вторая резистентна. Кроме того, относительные активности двух РНК-полимеразных комплексов менялись в зависимости от освещения и стадий онтогенеза [Pfannschmidt et al.,1994]. У шпината также выявлялись две фракции, одна из которых была мультимерной и подобной прокариотической, тогда как другая состояла из двух компонентов. Мультимерный полипептид массой 110 кД, входящий во вторую фракцию, был весьма похож на РНК-полимеразу типа Т7 фаговой [Lerbs-Mache, 1993].

Наконец, были получены прямые доказательства присутствия в хлоропластах высших растений РНК-полимеразы ядерного кодирования. У табака индуцирована делеция гена *rpoB,* кодирующего β-субъединицу пластидной РНК-полимеразы. Тем не менее анализ РНК-синтеза в мутантных пластидах выявил существование второй, очевидно, ядерно кодируемой РНК-полимеразы. Эта новая ферментная активность была связана в основном с транскрипцией элементов генетической системы, а не генов фотосинтеза и давала возможность существовать мутантным нефотосинтезирую-

щим растениям при условии доставки восстановленного углерода [Allison et al., 1996].

Сходная работа была выполнена с мутантами, несущими делецию *rpo* гена, в культуре тканей. Регенерация растений *in vitro* из гаплоидных пыльцевых зерен злаков иногда может приводить к крупномасштабным делециям их пластидной ДНК [Day, Ellis, 1984]. У риса выделили мутантную линию, несущую остаток хлоропластного генома размером 19,3 т.п.н. с генами тРНК. У этой линии отсутствуют все пластидные гены РНК-полимеразы. Однако у мутантных пластид происходила транскрипция тРНК генов, что явно указывает на существование РНК-полимеразной активности нехлоропластного кодирования [Chiba et al., 1996].

Итак, кодирование ядром генов пластидной РНК-полимеразы можно считать доказанным. Предполагаемый продукт действия этих генов (гена) — полипептид 110 кД, сходный с РНК-полимеразой фага Т7. Активность этого фермента максимальна на ранних стадиях развития пластид, он связывается с NEP-промоторами на пластидной ДНК [Lerbs-Mache, 1993].

Вероятно, ядерная РНК-полимераза на ранних этапах биогенеза пластид активно транскрибирует гены белоксинтезирующей системы пластид, в том числе гены хлоропластной РНК-полимеразы. Будучи транслирована, РНК-полимераза пластид берет на себя основную роль в дальнейшей экспрессии хлоропластных генов, связанных прежде всего с процессами фотосинтеза (рис. 3.4). Таким образом, переключение с ядерной на пластидную РНК-полимеразу может быть решающим моментом при дифференцировке пропластид в хлоропласты [Hagemann et al.,1999].

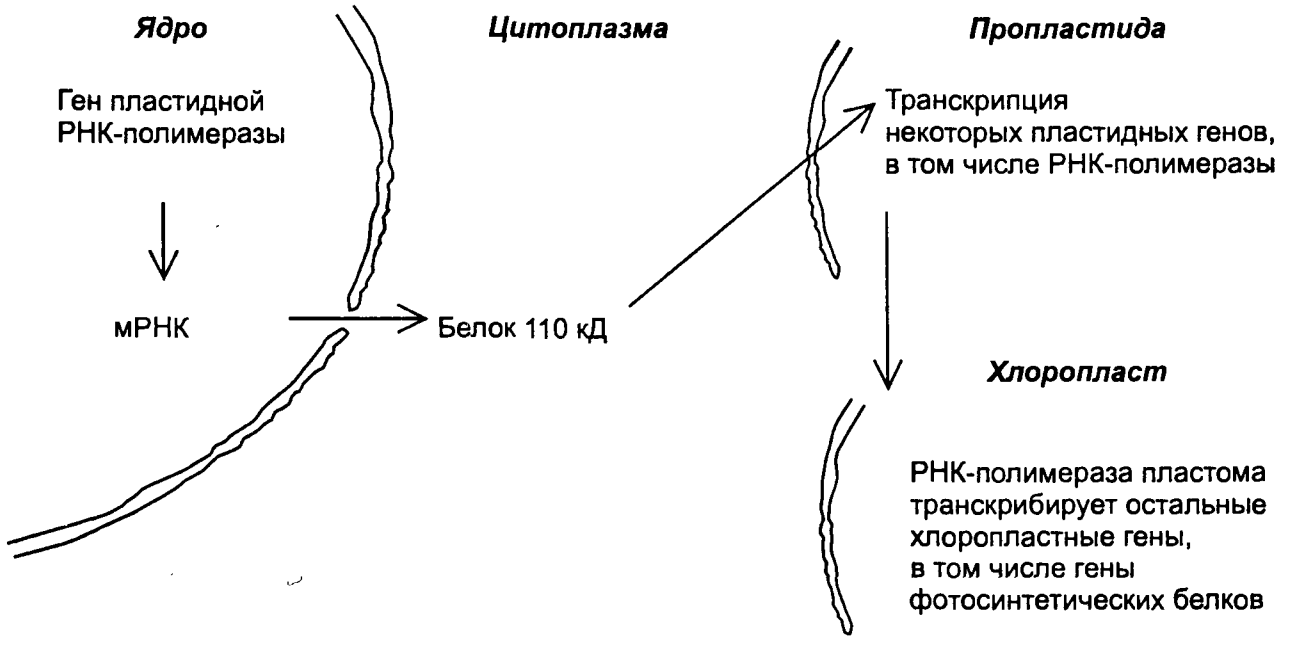


Рис. 3.4. Пластидная РНК-полимераза ядерного кодирования обеспечивает транскрипцию генов РНК-полимеразы в хлоропластах

Регуляция транскрипции

Промоторы, регуляторные белки, конформация ДНК

Интенсивность транскрипции пластидных генов может изменяться в довольно широких пределах в зависимости от самих генов, этапа онтогенетического развития организма и внешних сигналов. Скорость транскрипции определяется силой промоторов, которые контролируют инициацию синтеза определенных мРНК — чаще всего этот фактор оказывается решающим. При исследовании 10 пластидных генов шпината обнаружены 25-кратные различия скорости транскрипции (например, между генами *rrn/petB* = 5/0,2); тот же показатель среди 15 изученных пластидных генов ячменя различался более чем в 300 раз (*psbA/rpoB* = 153/0,5*)* [Gruissem, Tonkyn, 1993]. Исследования развивающихся пыльников подсолнечника выявили значительное накопление транскрибированных матриц генов *atpA, atp9, cob, rrn26* в молодых клетках, прошедших мейоз, в дальнейшем наблюдалось соответствующее увеличение количества кодируемых этими генами продуктов [Smart et al., 1994].

Механизмы, регулирующие активность промоторов, включают в себя изменение топологии ДНК, наличие регуляторных белков или модификацию РНК-полимеразы.

В хлоропластах шпината, гороха и некоторых других растений обнаружили фермент ***топоизомеразу,*** изменяющий топологию молекул ДНК. Было показано, что ингибиторы этого фермента изменяют скорость транскрипции специфических генов. Эффективная транскрипция происходит, если ДНК-матрица находится в форме негативной сверхскрученной спирали [Igloi, Kössel, 1992].

Интересны данные о связи степени сверхскручивания молекулы ДНК и интенсивности транскрипции, полученные для двух хлоропластных генов кукурузы: *rbcL* и *atpB*. Пик транскрипции первого достигается при сравнительно небольшой плотности сверхспирализации, после чего резко снижается при увеличении сверхскручивания. Напротив, у гена *atpB* скорость транскрипции достигает плато при сравнительно высокой степени сверхспирализации. Сходная зависимость описана для *rbcL* и *atpB* генов у гороха. Таким образом, максимум активности двух промоторов достигается при различной конформации ДНК, т.е. конформационные изменения ДНК поразному влияют на транскрипцию данных генов [Igloi, Kössel, 1992]. Точный механизм связи между топологией пластидной ДНК и транскрипцией органельных генов пока неясен, однако кольцевые сверхспирализованные мультимерные молекулы ДНК, несомненно, должны регулироваться данным ферментом [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Транскрипция ряда генов генетической системы пластид, как было показано, регулируется множественными промоторами. Во многих случаях одному и тому же гену или оперону предшествуют как σ^{70}-подобный промотор, так и альтернативный, не сходный с *E. coli* промоторами, который, очевидно, узнает РНК-полимераза ядерного кодирования [Vera, Sugiura, 1995]. Такой механизм обеспечивает тонкую регуляцию хлоропластной транскрипции с использованием двух РНК-полимераз и двух типов промоторов различной силы [Hagemann et al.,1999].

Термин "фотогены" был введен для тех хлоропластных генов, чей уровень транскрипции меняется в зависимости от светового режима и вызывает превращение пропластид или этиопластов в хлоропласты [Igloi, Kössel, 1992]. Эти гены регулируются сиквенс-специфическими белками, которые могут активировать или репрессировать соответствующий ген [Leon et al., 1998].

Проведенные *in vitro* и *in vivo* исследования с *psbD/C* опероном показали, что в регулируемой светом транскрипции хлоропластных генов участвуют факторы, отличные от σ-белков бактериального типа. Они присутствуют только в освещенных хлоропластах и связываются с областью ДНК выше промоторных последовательностей –35/–10, определяя светорегулируемую инициацию транскрипции [Wada et al.,1994]. Был выделен ядерный фактор AGF, вовлеченный в светозависимую регуляцию транскрипции *psbD* гена. AGF специфически взаимодействует с промоторной областью данного пластидного гена, активируя транскрипцию [Kim, Mullet, 1995]. Выяснение молекулярной организации транскрипционных факторов позволит понять как особенности их взаимодействия с РНК-полимеразой, так и путь от светового сигнала до инициации транскрипции.

Метилирование ДНК и транскрипция

Спорным является вопрос о возможной роли метилирования ДНК в регуляции транскрипции хлоропластных генов. У растений метилирование как один из регуляторных механизмов транскрипции описан для нескольких ядерных генов [Dynan, 1989]. Долгое время считалось, что пластидная ДНК растений не метилирована, за исключением пластома водоросли *Chlamydomonas*, у которой с метилированием некоторые связывают механизмы материнского наследования пластид [Sager et al., 1984].

Однако впоследствии 5-метилцитозин и следовые количества 6-метиладенозина обнаружили в пластидной ДНК высших растений, причем было показано, что метилирование носит ткане- или геноспецифический характер [Ngernprasirtsiri et al.,1988; Gauly, Kössel, 1989]. У бактерий установлена

роль 6-метиладенозина в регуляции транскрипции, но нет никаких данных в пользу участия в этом процессе 5-метилцитозина [Barras, Marius, 1989].

Дальнейшие исследования привели к предположению, что метилирование является одним из факторов, регулирующих транскрипцию пластидных генов. Корреляция между выключением фотосинтетических генов и метилированием ДНК наблюдалась при превращении хлоропластов в хромопласты в созревающих плодах томата [Kobayashi et al.,1990].

В культуре тканей смоковницы (платана) была показана различная интенсивность транскрипции ряда фотосинтетических генов *in organello* в амилопластах и хлоропластах [Ngernprasirtsiri et al.,1990]. Наблюдалась связь между метилированием и отсутствием транскрипции ДНК амилопластов и активной транскрипцией неметилированной ДНК хлоропластов. Это свидетельствует о том, что метилирование в нефотосинтезирующих амилопластах вовлечено в селективное выключение фотосинтетических генов. Оказалось, что ДНК, выделенная из амилопластов, не может транскрибироваться *in vitro* ни с хлоропластным, ни с амилопластным экстрактом, в то время как неметилированная хлоропластная ДНК эффективно транскрибируется в обоих экстрактах [Igloi, Kössel, 1992].

Однако эти исследования не могут исключить роли каких-то дополнительных факторов в узнавании метилированных оснований как сигнала прекращения транскрипции. Кроме того, поскольку амилопластная ДНК содержит наряду с 5-метилцитозином еще несколько метилированных оснований, неясно, какое именно основание или комбинация каких оснований вызывает супрессию транскрипции [Igloi, Kössel, 1992].

Отметим также, что в цитированных работах не было установлено, что метилирование происходит именно в промоторных областях и предшествует транскрипционной инактивации генов либо происходит одновременно с ней. Возможно, метилирование является лишь следствием этой инактивации [Gruissem, Tonkyn, 1993]. Следует указать, что результаты, изложенные выше, противоречат другим сообщениям, в которых авторам не удалось обнаружить ни метилирования, ни транскрипционной инактивации генов в амилопластах эндосперма и корня [Deng, Gruissem, 1988], а также в хромопластах томата и перца [Marano, Carillo, 1991; Gruissem, Tonkyn, 1993].

Для окончательного установления связи между метилированием и экспрессией пластидных генов необходимы дополнительные эксперименты.

Несмотря на факты, доказывающие существование регуляции транскрипции, особенно для фотогенов, до сих пор не удалось идентифицировать ни сигнальных последовательностей на ДНК-матрице, ни белковых факторов (подобных регуляторным белкам бактерий), с помощью которых эти сигналы передавались бы на транскрипционный аппарат пластид. Наличие разнообразных систем регуляции транскрипции в хлоропластах очевидно;

не исключено также, что у растений разных систематических групп регуляция осуществляется разными путями. Исходя из имеющихся данных, трудно представить себе существование единого механизма регуляции экспрессии всех пластидных генов.

Между транскрипцией и трансляцией

Общеизвестно, что экспрессия любых, как прокариотических, так и эукариотических, генов только начинается с транскрипции. Гены органелл — не исключение из этого правила. Что происходит далее с молекулами информационной РНК в пластидах? Каковы контрольные механизмы, обеспечивающие ее "созревание", стабильность и доступность для следующего этапа — трансляции? Посттранскрипционные события включают в себя: разрезание (trimming) молекул про-мРНК, РНК-сплайсинг, РНК-редактирование (editing), стабилизацию и сохранение мРНК молекул.

Накопление пластидной мРНК контролируется онтогенетическими программами и факторами среды

Развитие хлоропластов сопровождается прежде всего увеличением количества мРНК, кодирующих белковые субъединицы комплекса тилакоидных мембран. Гораздо меньше данных об изменении в этот период числа молекул мРНК транскриптов рибосомальных белков и РНК-полимеразы, но в целом их уровни ниже, чем мРНК фотосинтетических генов [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Уровень мРНК определяли для отдельных пластидных генов в корнях, гипокотиле и семядолях проростков, выращенных в темноте, во время прорастания семян и в листьях однодольных, выращиваемых без света. Результаты показывают, что временные и органоспецифические уровни мРНК пластид, несомненно, определяются генетической программой развития растения [Gruissem, Tonkyn, 1993].

На конкретной стадии или при определенных экспериментальных воздействиях свет может индуцировать развитие хлоропластов и вызвать изменения в уровне мРНК, регулируемом онтогенетически [Schrubar et al., 1990], т.е. процесс контролируется перекрывающимися путями регуляции — как внутренними, присущими генетической программе растения, так и внешними, связанными с различными факторами среды. Описаны мутанты *Arabidopsis*, у которых нарушено это взаимодействие, в результате чего растения в темноте активно экспрессируют те гены, для которых в норме необходим свет [Chory, Peto, 1990] .

Прямые измерения динамики уровня мРНК пластид весьма сложны, однако опубликованные данные четко показывают, что по периоду полураспада (4—10 часов) молекулы пластидной мРНК близки к цитоплазматической и намного превосходят мРНК быстро растущих бактерий, у которых этот показатель составляет от нескольких секунд до нескольких минут [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Как известно, хлоропласты и нефотосинтетические пластиды могут взаимопревращаться, их ДНК идентична. Предположение о неактивности транскрипционной системы у всех пластид, кроме хлоропластов, оказалось неверным. Действительно, амилопласты корней и эндосперма отличаются низким уровнем мРНК, однако этого нельзя сказать об этиопластах и хромопластах, где уровень мРНК высок и спектр самих молекул зависит от ткани и стадии развития растения [Gruissem, Tonkyn, 1993]. Нефотосинтетические пластиды транскрипционно активны и аккумулируют мРНК различных генов, включая гены фотосинтетических белков, хотя система мембран тилакоидов у них не синтезируется или, как у хромопластов, разрушается. Не совсем понятно, для чего транскрибируются фотосинтетические гены в нефотосинтетических пластидах. Существует версия, что, поскольку пластиды являются органеллами, где помимо фотосинтеза осуществляются различные метаболические процессы, в этих процессах могут участвовать некоторые белки, входящие в фотосинтетические комплексы, что может объяснить транскрипцию их генов у нефотосинтетических пластид [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Интересен эффект воздействия на растения светом при наличии дефекта каротиноидов. Давно известно, что каротиноиды в хлоропластах защищают хлорофилл от окисления при нормальной и высокой освещенности путем гашения триплетного состояния хлорофилла, которое может вызвать образование радикалов кислорода и привести к фотодеструкции фотосинтетических комплексов.

Листья мутантных растений с блокированным синтезом каротиноидов или нормальных растений, обработанных гербицидом норфлуразоном, накапливают хлорофилл при низкой освещенности, но быстро обесцвечиваются при ярком свете [Oelmüller, Mohr, 1986]. Обесцвечивание листьев в отсутствие каротиноидов — симптом плейотропного эффекта, включающего в себя исчезновение хлорофилла, ламелл и нескольких белков ядерного и хлоропластного кодирования.

Оказалось, что дефект каротиноидов в свою очередь вызывает снижение количества ядерных белков *rbcS* (малая субъединица РБФК) и *cab* (белки светособирающего комплекса хлорофиллов *a* и *b*). Объяснить этот феномен можно, предположив наличие какого-то пластидного фактора, который

участвует в регуляции экспрессии ядерных генов, хотя механизм этой регуляции пока неясен [Gruissem, Tonkyn, 1993]. В главе 8 мы рассмотрим совокупность имеющихся в литературе фактов, отражающих взаимодействие ядра и органелл в клетке.

Возвращаясь к экспрессии пластидных генов при воздействии гербицидом норфлуразоном, отметим, что транскрипция хпДНК у этих растений не прекращается даже при полном обесцвечивании листьев, хотя по сравнению с зелеными листьями она может быть несколько снижена. Эти данные подтверждают результаты других исследований, которые показывают, что для транскрипции пластидных генов необязательна нормальная функция хлоропластов [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Процессинг и стабильность РНК молекул

Как уже упоминалось, большинство генов пластид собраны в полицистронные блоки, транскрибирующиеся в виде одной молекулы мРНК. Из 70 белок-кодирующих генов и 9 *ycfS* (conserved ORFs) пластома табака лишь пять транскрибируются моноцистронно [Sugita, Sugiura, 1996]. Отметим, что в отличие от высших растений у водоросли *Chlamydomonas* почти все пластидные гены транскрибируются моноцистронно [Rochaix, 1995]. Что происходит далее с полицистронными матрицами?

Полицистронные мРНК превращаются в моно- и дицистронные. Протяженные первичные транскрипты обычно разрезаются на более короткие молекулы, часть из которых содержит перекрывающиеся последовательности. Например, *psbB* транскрибируется на промоторе прокариотического типа как тетрацистронная молекула-предшественник длиной 6 т.п.н., содержащая транскрипты генов *psbB-psbH-petB-petD*. В результате двух сплайсингов и множественных разрезаний РНК-матрицы формируются многочисленные промежуточные транскрипты. У шпината их образуется 17 [Westhoff, Herrmann, 1988], у кукурузы по крайней мере 20 [Barkan, 1988]. У шпината в результате процессинга гены *psbB* и *psbH* образуют моноцистронные мРНК, а *petB-petD* — дицистронную мРНК. У кукурузы, однако, происходит дальнейший процессинг дицистронной мРНК *petB-petD* с формированием моноцистронных мРНК для всех генов, входящих в данный кластер.

Расщепление ди- и полицистронных матриц — весьма важный процесс для формирования функциональных мРНК. Так, изменение длины 5′UTR при расщеплении, индуцированном метил-jasmonate, приводит к нарушению трансляции *rbcL* гена у ячменя [Reinbothe et al., 1993]. Одна ядерная мутация у кукурузы блокировала как расщепление, так и эффективную трансляцию сразу нескольких хлоропластных транскриптов [Barkan et al., 1994].

Вместе с тем GUS ген, интегрированный в пластидный геном путем трансформации следом за *rbcL* геном, транскрибируется вместе с ним и затем эффективно транслируется с такой искусственно созданной дицистронной химерной матрицы [Staub, Maliga, 1995].

Дицистронный транскрипт *psaC-ndhD* содержит не связанные функционально гены. Тщательное исследование у табака в системе *in vitro* процессинга и трансляции этой матрицы позволило обнаружить несколько (до 6) точек разрезания, в результате чего выявляются *ndhD* мРНК с 5′-концами различной длины. Однако из этих промежуточных молекул только два типа оказывались стабильными и далее связывались с рибосомами для трансляции. Дицистронный транскрипт в данной системе, как правило, не транслировался, хотя зафиксировано очень незначительное количество *psaC* (но не *ndhD)* белка с дицистронных матриц [Hirose, Sugiura, 1997]. В поисках механизма, препятствующего трансляции, была предложена модель внутримолекулярной рекомбинации. Оказалось, что 8 нуклеотидов, непосредственно прилегающих к инициирующему кодону гена *ndhD* с 5′-конца, и 5′-фрагмент кодирующей части *psaC* гена комплементарны между собой. Компьютерный анализ показал, что эти участки пре-мРНК могут взаимодействовать между собой, препятствуя связыванию с рибосомами и, следовательно, трансляции. После разрезания каждая из мРНК транслируется независимо от другой [Hirose, Sugiura, 1997] (рис. 3.5).

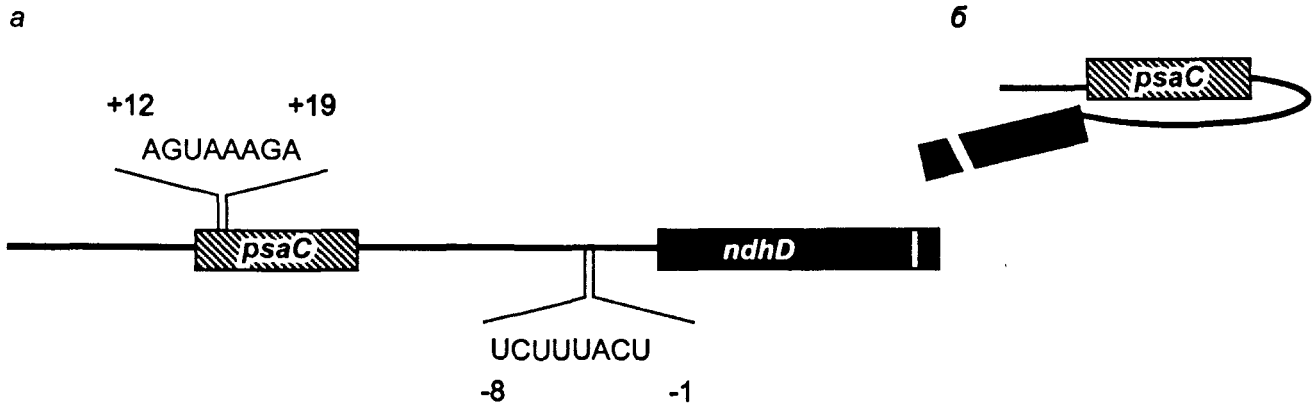


Рис. 3.5. Элементы ингибирования трансляции дицистронной мРНК пластид табака. *а* — участок мРНК гена *psaC* (+12 +19) комплементарен 5′UTR-району, непосредственно прилегающему к стартовому кодону мРНК гена *ndhD* (-8 -1); *б* — изменение конфигурации молекулы: взаимодействие комплементарных участков, препятствующее трансляции дицистронной мРНК [по Hirose, Sugiura, 1997]

Анализируя два описанных примера — трансляцию искусственно созданной химерной дицистронной матрицы и ингибирование синтеза белка до расщепления на моноцистронные у природной дицистронной матрицы *psaC-ndhD*, причину различий следует искать именно в происхождении

мРНК молекул. Естественным путем образовавшаяся дицистронная мРНК несет эволюционно отшлифованное приспособление, предотвращающее несвоевременную трансляцию, тогда как у искусственно созданной дицистронной матрицы такого приспособления нет.

Как контролируется стабильность мРНК пластид? Скорость транскрипции пластидных генов далеко не всегда коррелирует с уровнем тех или других РНК-матриц в клетке. Это указывает на различия в стабильности разных мРНК как на важный фактор регуляции генной экспрессии. Действительно, различия по стабильности мРНК могут достигать 30-кратного уровня, как это было определено для 15 пластидных генов ячменя [Rapp et al., 1992]. Более того, стабильность одного и того же транскрипта варьирует в зависимости от стадии развития. Так, при превращении пропластид в хлоропласты скорость транскрипции большинства пластидных генов изменяется очень незначительно. Однако с началом биогенеза хлоропластов несколько мРНК накапливаются очень быстро, вероятно, из-за увеличения продолжительности их периода полужизни [Mullet, 1988].

Известно, что у эукариот основные механизмы стабилизации мРНК состоят в процессах кэпирования (модификации 5′-конца молекулы с помощью так называемого кэпа) и полиаденилирования (добавления поли (А)-последовательности к 3′-концу). Пластидные мРНК этим посттранскрипционным модификациям не подвергаются. У прокариот большинство мРНК стабилизируется путем связывания с рибосомами в единый трансляционный комплекс. Значительная часть хлоропластных мРНК, в том числе *psbA* мРНК, не ассоциирована с полисомами [Sugita, Sugiura, 1996]. Что же в таком случае стабилизирует их молекулы?

Некоторые пластидные транскрипты имеют вариабельные 5′-участки, образовавшиеся в результате эндонуклеазного расщепления 5′-нетранслируемой области (5′UTR – ***untranslated region***). К сожалению, пока еще нет доказательств, что это дифференцированное созревание 5′-конца мРНК молекулы является неким контрольным механизмом, изменяющим стабильность мРНК молекулы или определяющим готовность ее к трансляции [Hagemann et al.,1999].

Недавно проведенные исследования *psbA* мРНК пластид *Arabidopsis* показали, что в 5′UTR-районе находится ключевой сайт взаимодействия с белками (43 и 30 кД), обеспечивающий посттранскрипционную регуляцию экспрессии гена. Это взаимодействие успешно лишь в определенных условиях: при окислительных воздействиях оно нарушается, нормализуясь при инкубации с восстановителем [Shen et al., 2001].

В 5′UTR-районе мРНК *petD* гена одноклеточной водоросли *Chlamydomonas* исследована структура и функции трех элементов, влияющих, как

предполагалось, на стабильность РНК-матрицы. Первый из них длиной 8 нуклеотидов образует небольшую петлю и действительно обеспечивает стабильность *petD* мРНК, блокируя экзонуклеазную деградацию. Два других элемента длиной 16 и 14 нуклеотидов, находящиеся ближе к 3′-концу 5′UTR, участвуют в регуляции трансляции, но не оказывают влияния на стабильность молекулы *petD* мРНК. Интересно, что мутация в элементе II изменяет структуру мРНК около элемента III, что может облегчать трансляцию [Higgs et al., 1999].

Эндонуклеазное разрезание молекул мРНК происходит при процессинге их 3′-конца. В отсутствие эффективного сигнала терминации транскрипции правильный процессинг 3′-конца является важным условием стабильности мРНК (рис. 3.6).

Большинство молекул хлоропластной мРНК содержат в нетранслируемой области на 3′-конце последовательность с инвертированным повтором, которая складывается в стабильную петлю. Эти последовательности весьма консервативны для одних и тех же генов даже у эволюционно отдаленных видов растений, но у разных генов различаются в одном и том же пластоме [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Наиболее прямые доказательства стабилизирующей функции 3′-инвертированного повтора были получены в экспериментах на трансформированных хлоропластах *Chlamydomonas*. Полная или частичная делеция 3′-инвертированного повтора гена *atpB* приводит к 60—80%-ной потере мРНК этого гена, хотя кодирующая и 5′-нетранслируемые области не изменены. Это позволило сделать вывод о роли 3′-инвертированных повторов как цис-действующих элементов, определяющих стабильность мРНК пластид [Gruissem, Tonkyn, 1993]. Подтверждением этому явились данные, полученные *in vitro* и *in organello,* о быстром разрушении пре-мРНК при удалении 3′-инвертированных повторов [Sugita, Sugiura, 1996].

3′-процессинг мРНК инициируется эндонуклеазным разрезанием молекулы ниже петлеобразной структуры на 3′-нетранслируемом конце первичного транскрипта (рис. 3.6). Последовательность между этой петлей и местом разрезания молекулы (приблизительно 100 п.н.) впоследствии уничтожается экзорибонуклеазой. 3′-конец остается соединенным с РНК-связывающими белками ядерного кодирования [Hayes et al., 1996], что защищает мРНК от деградации.

Полиаденилирование пластидных мРНК — сигнал к деградации. Как известно, поли(А) 3′-концы длиною в несколько сот оснований в мРНК ядерных генов эукариот — важные детерминанты стабильности матриц [Jackson, Standart, 1990]. Деаденилирование наряду с декэпированием служит сигналом к началу деградации мРНК молекул. У прокариот, напротив,

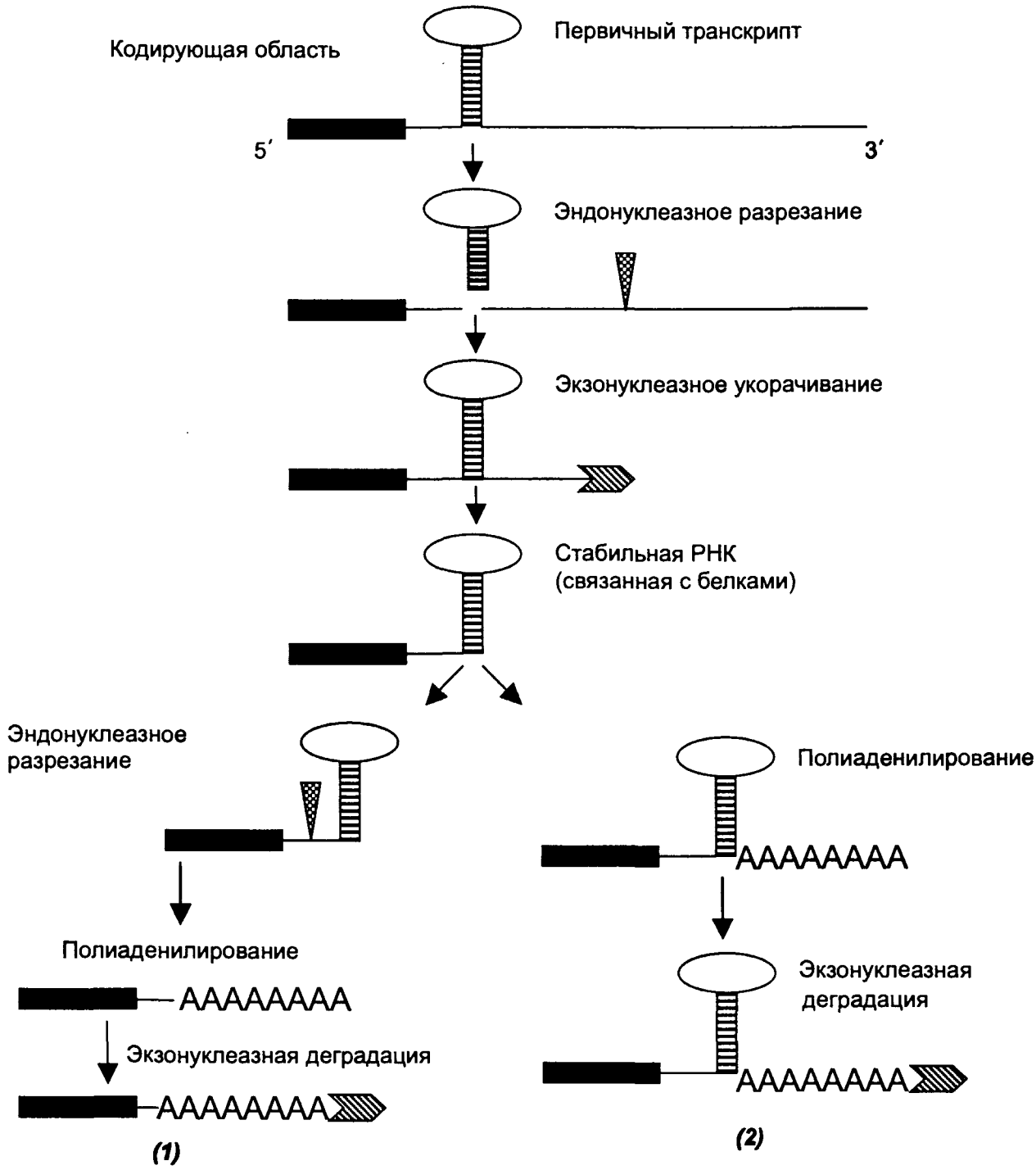


Рис. 3.6. Модель процессинга 3′-области и деградации пластидной РНК. В отсутствие структур, терминирующих транскрипцию, образуется мРНК с протяженными 3′-концами. Эндо- и экзонуклеазы деградируют последовательности, расположенные ниже петли, формируя стабильную мРНК. Зрелый 3′-конец остается связанным с белковым комплексом, присоединенным к петле. Формирование рибонуклеопротеинового комплекса предотвращает деградацию транскрипта и обеспечивает стабильный субстрат для трансляции. Разрушение мРНК инициируется альтернативными механизмами: *(1)* полиаденилированием, которое вызывает деградацию путем экзонуклеазной активности 3′→ 5′; *(2)* полиаденилированием за петлеобразной структурой (возможно, путем диссоциации 3′-РНП комплекса) и последующей экзонуклеазной деградацией [по Hagemann et al., 1999]

полиаденилирование провоцирует деградацию матриц [Haugel-Nielsen et al.,1996].

В отличие от ядерных полиаденилированный 3′-конец в пластидных мРНК не является гомополимером: аденозиновые кластеры прерываются гуанозинами и крайне редко цитидинами или уридинами. Общая длина "хвоста" может достигать нескольких сот нуклеотидов [Lisitsky et al., 1996].

Интересно, что поли(А) РНК в пластидах обнаружена более 25 лет назад [Burkard, Keller, 1974], но лишь недавно этот факт был связан с особенностями деградации мРНК органелл [Kudla et al., 1996] (рис. 3.6).

Очевидно, добавление 3′-поли (А) последовательности делает мРНК уязвимой по отношению к экзонуклеолитической активности 3′→5′. Поли(А)-"хвост" пластидной мРНК, как было установлено, обладает сродством к хлоропластной экзонуклеазе(ам) [Lisitsky et al., 1996; Kudla et al., 1996]. Примечательно, что полиаденилирование не только запускает механизм деградации мРНК в случае отсутствия петлеобразной структуры, но может также вызвать распад РНК при ее наличии. В этом случае петля уже не в состоянии защитить от экзонуклеазы [Kudla et al., 1996]. После отщепления от мРНК петлеобразной структуры (рис. 3.6, *1*) или удаления стабилизирующих матрицу белков (рис. 3.6, *2*) происходит полиаденилирование, что в свою очередь вызывает быструю эндонуклеазную деградацию. Пока не ясна роль гуанозинов в поли(А)-"хвостах". Предполагается, что они каким-то образом влияют на процесс деградации [Schuster, Bock, 2000].

Оказалось, что полиаденилирование транскриптов фотосинтетических генов усиливается в темноте, т.е. при отсутствии света посредством полиаденилирования обеспечивается деградация генов фотосинтеза [Kudla et al., 1996]. Поскольку полиаденилирование участвует в распаде мРНК у *E.coli,* это в очередной раз указывает на сходство многих механизмов метаболизма РНК у прокариот и в пластидах растений [Hagemann et al.,1999].

Стабильность мРНК пластид зависит от комплекса факторов, включающих внутреннюю стабильность самой молекулы, РНК-белковые взаимодействия, связь мРНК молекул с рибосомами, скорость трансляции и активность нуклеаз.

Кроме обязательного процессинга мРНК пластид еще до начала трансляции с некоторыми молекулами мРНК могут происходить события двух типов: вырезание интронов (сплайсинг) и мРНК-редактирование (эдитинг).

Интроны пластидных генов

Впервые интроны — участки мРНК, удаляемые после транскрипции, были обнаружены в 23*S* рибосомальном гене пластома *Chlamydomonas* [Rochaix, Malnoe, 1978]. Затем интроны нашли в хлоропластных генах мно-

гих растений, как высших, так и низших. Так, в пластоме табака выявлено 18 генов, несущих интроны, из них 6 — гены тРНК, 12 — белок-кодирующие гены, причем в двух из них — *clpP* и *irf168(ycf3)* — содержится по 2 интрона в каждом. Таким образом, в пластоме табака содержится 20 интронов. Длина интронов у хпДНК табака колеблется от 503 до 2526 п.н. (табл. 3.3) [Sugiura, 1992].

Большинство генов высших растений содержат единичные интроны, в то время как у водорослей *(Euglena, Chlamydomonas)* интроны множественные [Sugiura, 1992; Sugita, Sugiura, 1996]. Пластидная ДНК *Euglena* отличается обилием интронов: 155 — это гораздо больше, чем во всех других исследованных пластомах. Суммарная длина интронов *Euglena* составляет 56092 п.н., или 39,2% всей ее хпДНК [Hagemann et al., 1996]. Интересно, что из трех других пластомов водорослей, секвенированных в последние годы (см. главу 2), два совсем не содержат интронов — *Porphyra purpurea* и *Odontella sinensis,* а *Cyanophora paradoxa* содержит один-единственный интрон (см. табл. 2.3).

Хлоропластные гены содержат интроны четырех типов. Интроны хлоропластных генов разделяют на несколько групп на основе последовательностей, находящихся на их границах (именно они будут определять сплайсинг), и особенностей вторичной структуры самой интронной цепочки.

Группа I — интроны этой группы имеют характерные концевые последовательности и складываются во вторичную структуру, типичную также для интронов группы I митохондриальных генов грибов. Интрон группы I *trnL* гена эволюционно консервативен и сохранился идентичным таковому у цианелл и цианобактерий [Sugiura, 1992].

Группа II и *группа III* – интроны этих групп сходны по вторичной структуре между собой и с интронами группы II митохондриальных генов грибов, но концевые последовательности у группы II отличаются от таковых группы III [Sugiura, 1992]. Часто эти две группы не разделяют, относя все интроны этих двух типов к группе II [Hagemann et al., 1996]. Пограничные последовательности экзон-интронов 18 генов табака представлены на рис. 3.7.

Группа IV (III) — это интроны, описанные для ряда генов *Euglena,* они имеют почти идентичную длину (95 — 109 п.н.), сходны по последовательности и структуре, отличаются от первых трех (двух) групп интронов [Christopher, Hallick, 1989].

Двойной интрон — твинтрон. У пластидных генов *Euglena* был обнаружен еще один тип интронов — ***твинтрон.*** Такое название получил интрон, включающий внутри своей последовательности еще один или более интронов. Так, в *atpE* гене *Euglena gracilis* в интрон группы II размером 463 п.н. встроен еще один интрон той же группы размером 320 п.н., а в гене *psbD*

Таблица 3.3

Хлоропластные гены, содержащие интроны [по Sugiura, 1992]

Ген	Количество интронов			Примечания
	высшие растения	*Euglena*	*Chlamydomonas*	
23S rDNA	0	0	1	ORF, интрон у *Chlorella*
			6	У *C. eugametos*
16S rDNA	0	0	1	У *C. moewusii*
trnL-UAA	1	0	0	
trnI-GAU	1	0	0	
trnA-UGC	1	0	0	
trnV-UAC	1	0	0	
trnG-UCC	1	0	0	
trnK-UUU	1	0		ORF
rps2	0	4		
rps3	0	2	0	
rps8	0	3		
rps11	0	2	0	
rps12	3 экзона	0	0	Транс-сплайсинг
rps14	0	1		
rps16	1			
rps19	0	2		
rpl2	1	0	0	Нет интрона у шпината
rpl14	0	1	0	
rpl16	1	3	0	
rpl22	0	1		
rpl23	0	3		Псевдоген у шпината
rpoB	0	8		
rpoC1	1	11		Нет интрона у риса и кукурузы
rpoC2	0	2		
tufA	Нет гена	3	0	
clpP	2			Нет интрона у пшеницы и риса
rbcL	0	9	0	
psaA	0	3	3 экзона	Транс-сплайсинг
psaB	0	6	0	
psbA	0	4	4	2 интрона у *C. moewusii*
psbB	0	4		
psbC	0	1	0	ORF
psbE	0	2		
psbF	0	1		Интрон в интроне
petB	1	1	0	Нет интрона у *Chlorella*
petD	1		0	Нет интрона у *Chlorella*
			1	3,5т.п.н. интрон у водоросли KS3/2
atpF	1	3		
ndhA	1			
ndhB	1			
Irf167-170	2			

Группа	Ген	5′ экзон	Интрон	3′ экзон	Длина (п.н.)
I	*trnL*-UAA	-GACTT	AATTGGATTG---------TATCGTAAGAGG	AAAAT-	503
II	*trnI*-GAU	-GATAA	TTGCGTCGTT---------GATTTACTTCAC	GGGCG-	707
	trnA-UGC	-TGCAA	TTGGGTCGTT---------GGTTTACCCTGC	GGCGG-	709
	clpP(I-2)	- ACGCT	TGGCGCCAAT---------TGTTATATCATC	AGGGT-	637
III	*trnV*-UAC	-TACAC	GCGCGCCAAT---------ACCTGTTTT AC	CGAGA-	571
	trnG-UCC	-TAAAA	GTGTGATTCG---------GTCGACTATAAC	CCCTA-	691
	trnK-UUU	-TTTAA	GTGCGGCTAG---------ATCTACTCC AT	CCGAC-	2526
	rpl2	-TTTGA	GTGCGGTTTG---------ATCTACTTC AA	CCGAT-	666
	rpl16	-TTAGT	GTGTGACTCC---------ATCAACTATAAC	CCCAA-	1020
	rps12(trans)	-TGTAT	GTGCGTTGTA---------GTCAACTTTTCC	ACTAT-	
	rps12(cis)	-TTCTA	GTGCGTTGTA---------ATCCACCCT AC	AATAT-	536
	rps16	- GCAAC	GTGCGACTTG---------ATCAATCCCAAT	GAGCC-	860
	rpoC1	-CCCAT	GTGTGATTTG---------TCCTATCCCAAT	TTTTC-	825
	petB	-TGAGT	GTGTGACTTG---------GCCTATCTCAAT	AAAGT-	753
	petD	- GGAGT	GTGTGACTTG---------ACCTATCCCAAT	AACAA-	742
	ndhA	-TCTAC	GTGTGATTCG---------ATCGACTATGAT	TATCT-	1148
	ndhB	-AAGGA	GTGCGGTTCG---------TTCGACTCTGAC	TCTCC-	679
	clpP(I-1)	-GTATA	GTGCGACTTG---------TTTTACCCTAAT	CAACC-	807
	atpF	-AGTGT	GTGCGATTTG---------ATCTACTTTCAT	TAAGT-	695
	irf168(I-1)	-AGATG	GTGCGATTTG---------GACGACCGTAAC	GGATG-	738
	irf168(I-2)	-ATTAC	GTGCGACTAT---------ACCTATTCCGGC	CGGGG-	783

Рис. 3.7. Пограничные экзон-интронные последовательности 18 генов табака, имеющих интроны. Выделены повторяющиеся в каждой группе интронов нуклеотиды [по Sugita, Sugiura, 1996]

последовательность интрона размером 635 п.н. прерывается интроном длиной 463 п.н. [Thompson et al.,1997].

Интрон, граничащий с экзонами, получил название *внешний интрон,* а тот, который с обоих концов граничит с интроном, назвали *внутренний интрон.* Твинтроны могут состоять из интронов, относящихся к разным группам. Так, описаны следующие комбинации: 1) интрон группы II в интроне группы II, 2) интрон группы III в интроне группы III, 3) интрон группы II в интроне группы III, 4) интрон группы III в интроне группы II (рис. 3.8) [Thompson et al.,1997]. Твинтрон группы III вместе с несущим его psbK опероном недавно был передан из пластома *E.stellata* в пластом *E.gracilis* методом биолистной трансформации (см. главу 13) [Doetsch et al., 2001].

Описанные впервые у *Euglena* твинтроны недавно обнаружены у других водорослей — *Cryptoglena pigra, Lepocinclis beutschlii, Eutreptia* [Doetsch et al.,1998]. Высказываются предположения, что твинтроны могут также встречаться в митохондриальных и даже в ядерных генах, хотя функция их пока не выяснена [Hagemann et al., 1996].

Впервые белок-кодирующий ген (509 кодонов) был описан внутри самого протяженного интрона (2529 п.н.) в гене *trnK* пластома табака. Оказа-

лось, что этот "интронный ген" весьма консервативен и содержится во многих высших растениях. Более того, подобные интрон-кодируемые ферменты матуразы (maturases) были описаны в митохондриях грибов. Предположительно они участвуют в сплайсинге "своих" и некоторых других (например, *rpl2)* органельных генов [Sugita, Sugiura, 1996; Vogel et al., 1997].

Рис. 3.8. Схематическая структура двойных интронов — твинтронов четырех типов, обнаруженных в пластоме

У *Chlamydomonas* интрон гена *23S рДНК* кодирует белок — эндонуклеазу, расщепляющий двунитчатые молекулы ДНК. Как было показано, этот фермент участвует во встраивании интронов в аллельные родственные гены, не содержащие интронов, и таким образом превращает интроны в своеобразные мобильные генетические элементы [Dujon, 1989; Dürrenberger, Rochaix, 1991; Stephens et al., 1997]. Интересно, что у высших растений интрона в *23S рДНК* гене не обнаружено, равно как и не найдено расщепляющих двунитчатую ДНК эндонуклеаз [Sugita, Sugiura, 1996].

В гене *psbC* фотосистемы II хлоропластов *Euglena gracilis* в твинтроне протяженностью 1605 п.н. обнаружен ген *mat1,* кодирующий полипептид 458 аа. Ген расположен во внутреннем интроне группы III (рис. 3.8, *2*) и кодирует полипептидный мотив, аналогичный уже упомянутым матуразам. Поскольку такие полипептиды кодируются генами, встроенными как в интроны группы II, так и группы III, высказывается предположение о происхождении двух этих групп интронов от некоего общего предка [Doetsch et al.,1998].

Существование открытых рамок считывания в интронах — удивительный феномен, значение которого еще до конца не ясно. Необходимы прямые биохимические доказательства высказываемых предположений об их роли в регуляции экспрессии хлоропластных генов.

Разделенные гены. Гены, контролирующие некоторые пластидные рибосомальные РНК и белки, иногда состоят из нескольких частей, т.е. являются разделенными (*divided genes*) [Shinozaki et al.,1986].

У табака ген рибосомального белка CS12 разделен на две части и содержит одну копию 5′-*rps12* сегмента и две копии 3′-*rps12*.

5′-*rps12* сегмент гена представляет собой экзон 1 длиной 38 кодонов. В состав 3′-*rps12* сегмента входит экзон 2 (78 кодонов), затем длинный интрон (536 п.н.) и экзон 3 (7 кодонов). Обе части гена отстоят друг от друга на расстояние 28 000 п.н. и транскрибируются независимо. Только в процессе сплайсинга (рис. 3.9) они объединяются в одну молекулу мРНК.

Ген *psaA* у *Chlamydomonas* разделен на три части. Первый экзон размером 30 кодонов отстоит на 50 т.п.н. от второго экзона размером 60 кодонов, еще через 90 т. п.н. находится третий экзон (661 кодон). Все три части транскрибируются независимо, и синтез зрелой *psbA* мРНК включает в себя объединение трех молекул транскриптов путем транс-сплайсинга (см. рис. 3.11) [Sugiura, 1992].

Сплайсинг

РНК-сплайсинг — универсальный процесс для всех генов, как ядерных, так и органельных, содержащих интроны (рис. 3.9). Сплайсинг был открыт при изучении синтеза РНК аденовирусов. Обычно сплайсинг РНК — посттранскрипционный процесс, но в случае длинных транскриптов с несколькими экзонами иногда сплайсинг может начаться еще до завершения транскрипции [Lodish, Baltimore, Berk et al., 1995].

Механизм сплайсинга. Известно, что при сплайсинге мРНК интроны не вырезаются как линейные молекулы, а происходит образование петлеобразной структуры, в которой гуанин 5′-конца интрона присоединяется с помощью необычной 2′, 5′-фосфодиэфирной связи к аденозину, находящемуся вблизи 3′-конца интрона (рис. 3.9).

Механизм сплайсинга подробно изучен для ядерных пре-мРНК. У последних в процессе вырезания интронов принимают участие не менее 100 различных белков, а сам сплайсинг по сложности сравнивают с синтезом белка на рибосомах. Белки в комплексе с низкомолекулярными РНК образуют особую надмолекулярную структуру — *сплайсеосому*, которая обеспечивает точность при удалении интронов [Lodish, Baltimore, Berk et al., 1995].

Последовательности нуклеотидов, ограничивающие хлоропластные интроны группы III, сходны с ядерными интронами белок-кодирующих генов. Это позволяет предполагать, что по крайней мере одна группа интронов подвергается сплайсингу по механизму, свойственному ядерным пре-мРНК [Sugiura, 1992].

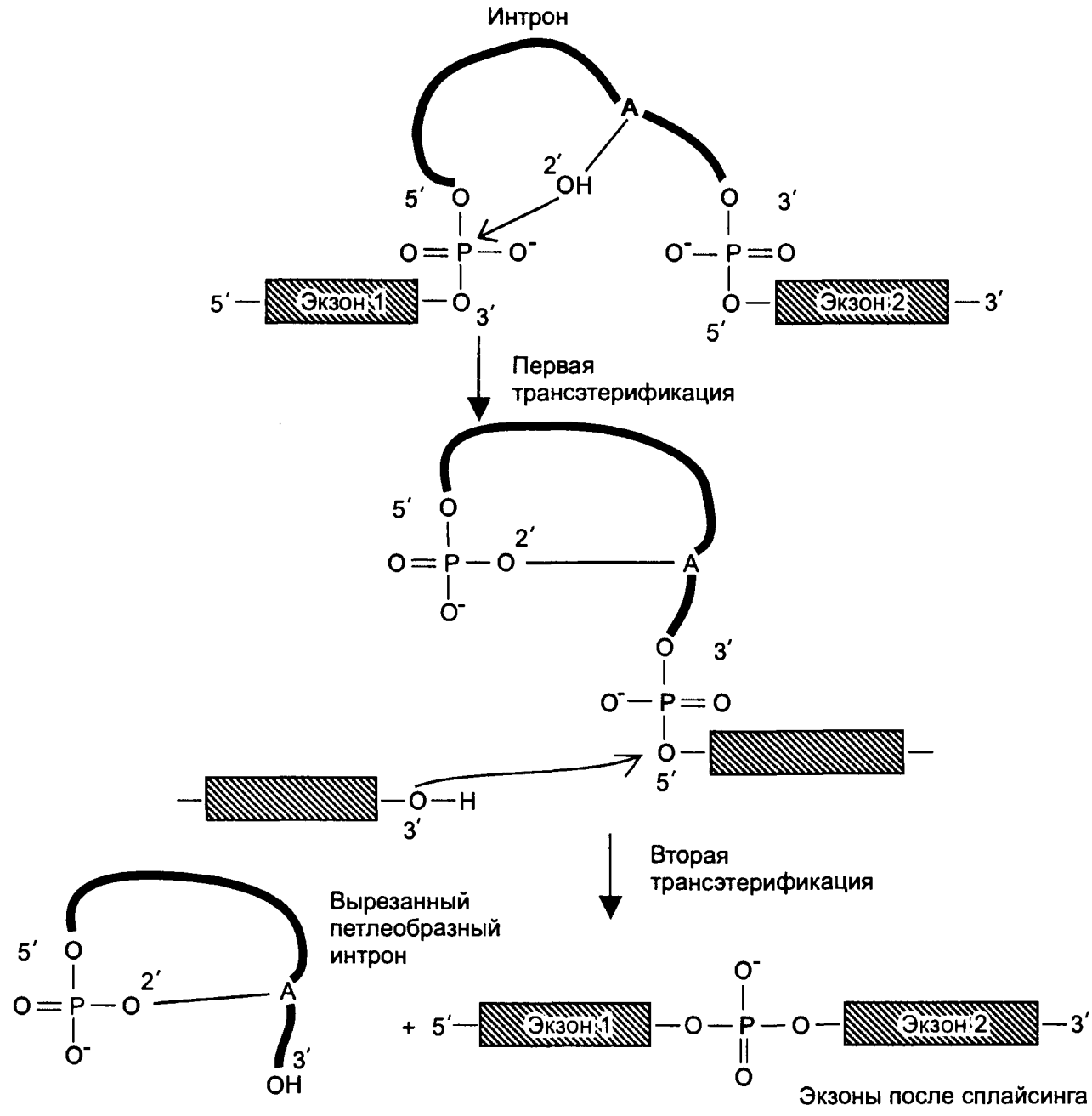


Рис. 3.9. Сплайсинг пре-мРНК происходит путем двух последовательных реакций трансэтерификации [по Lodish, Baltimore, Berk et al., 1995]

Для выяснения механизмов, регулирующих РНК-сплайсинг в хлоропластах высших растений, у кукурузы были проанализированы ядерные мутации, приводящие к дефектам сплайсинга. Были описаны две мутации, одна из которых — *crs1 (chloroplast RNA splicing)* — приводила к блокированию сплайсинга только в интроне гена *atpF*, тогда как другая — *crs2* — блокировала сплайсинг многих хлоропластных интронов кукурузы [Jenkins et al., 1997]. Наблюдалась корреляция между отсутствием пластидных рибосом и дефектом сплайсинга нескольких пластидных интронов. Авторы предполагают, что для успешного сплайсинга определенных групп интронов (например, интронов групп IIa и IIb) требуются различные ядерные факторы, кото-

рые либо узнают особенности структуры различных групп интронов, либо участвуют в каких-то специфических для разных групп реакциях. Из 12 интронов пластидного генома кукурузы только в одном нормально проходил сплайсинг как в мутантах *crs2,* так и в мутантах, лишенных пластидных рибосом [Jenkins et al., 1997].

Самосплайсинг интронов. Интроны пре-мРНК ряда примитивных организмов (ядерных рРНК генов ресничных *Tetrahymena,* бактериофага Т4) оказались способными к ***самосплайсингу:*** при этом сама РНК-интронная последовательность катализирует образование петлеобразной структуры и

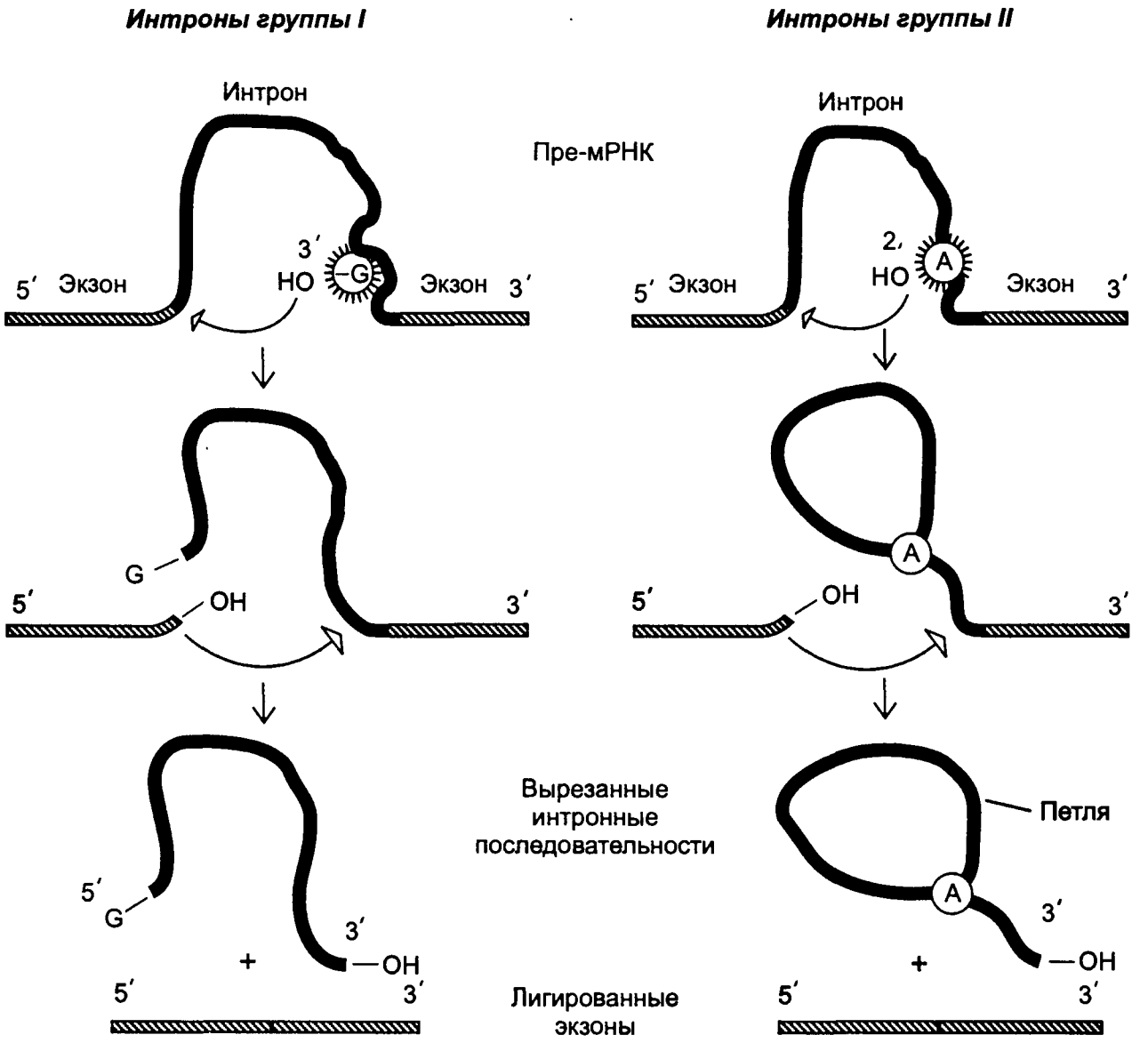


Рис. 3.10. Самосплайсинг интронных последовательностей. Интронные группы I связывают свободный гуанин со специфическим сайтом, тем самым инициируется сплайсинг на 5′-конце интрона. Интроны группы II используют реактивный аденин в интронной последовательности для формирования петли. Катализ осуществляет интронная РНК, хотя ряд вспомогательных белков ускоряют реакцию. В случае интронов группы II образуется петля, напоминающая структуру при ферментативном сплайсинге с образованием сплайсеосом [по Alberts, Bray, Lewis et al., 1994]

ее сплайсинг. Очевидно, это эволюционно наиболее древний механизм; на смену такому РНК-катализу пришел ферментный цис- и транс-сплайсинг. Самосплайсинг (self-splicing) описан для интронов групп I и II (рис. 3.10).

Интенсивный самосплайсинг пре-мРНК хлоропластных генов *Chlamydomonas* был показан для интронов группы I *in vitro* [Rochaix, цит. по Sugita, Sugiura, 1996]. У высших растений интрон группы I обнаружен пока только в *trnL* гене (см. рис. 3.7), однако попытки выявить самосплайсинг этого гена *in vitro* успехом не увенчались [Sugita, Sugiura, 1996]. Не выявлен самосплайсинг и интронов группы II хлоропластов высших растений. В связи с этим многие исследователи полагают, что *in vivo* сплайсинг хлоропластных генов происходит только при участии специфических белков [Dujon, 1989; Gruissem, Tonkyn, 1993].

В регуляции сплайсинга участвуют низкомолекулярные РНК. Детальное изучение сплайсинга хлоропластного *psaA* гена у *Chlamydomonas* позволило выявить один хлоропластный ген *(tscA)* и 14 ядерных локусов, необходимых для точного сплайсинга [Rochaix, 1992]. Участие такого значительного количества ядерных генов в процессинге пластидной мРНК — еще один пример тесного ядерно-плазменного взаимодействия.

Интересно, что пластидный *tscA* ген кодирует не белок, а низкомолекулярную РНК (430 п.н.), которая необходима в транс-сплайсинге [Sugiura, 1992].

У млекопитающих при изучении сплайсинга интронов ядерных пре-мРНК было обнаружено шесть низкомолекулярных уридин-богатых молекул РНК, формирующих вместе с белками сплайсеосому [см. Lodish, Baltimore, Berk et al., 1995]. Сплайсинг хлоропластных интронов изучен пока недостаточно, однако низкомолекулярная РНК *tscA* гена скорее всего не единственная, участвующая в этом процессе.

Пластидный ген *sprA* табака также кодирует малую РНК (218 п.н.), однако она задействована скорее всего не в сплайсинге, а в биогенезе хлоропластных рибосом, так как ковалентно связывается в клетке с пре-*16S* РНК [Vera, Sugiura, 1995]. Возможно, последовательности, кодирующие малые РНК молекулы, будут в дальнейшем обнаружены в длинных спейсерных участках пластома, функция которых пока неясна (так, у табака длина этих участков более 1000 п.н.) [Sugita, Sugiura, 1996].

Транс-сплайсинг разделенных генов. Описан для двух генов пластома, а также для ряда генов трипаносом, эвглен и круглых червей *Caenorhabditis elegans* [Lodish, Baltimore, Berk et al., 1995]. В этом случае в отличие от обычного цис-сплайсинга после вырезания интронов соединяются вместе не части одной пре-мРНК, а отдельные РНК молекулы. На рис. 3.11 приведена схема транс-сплайсинга двух разделенных генов: *rps12* и *psaA*.

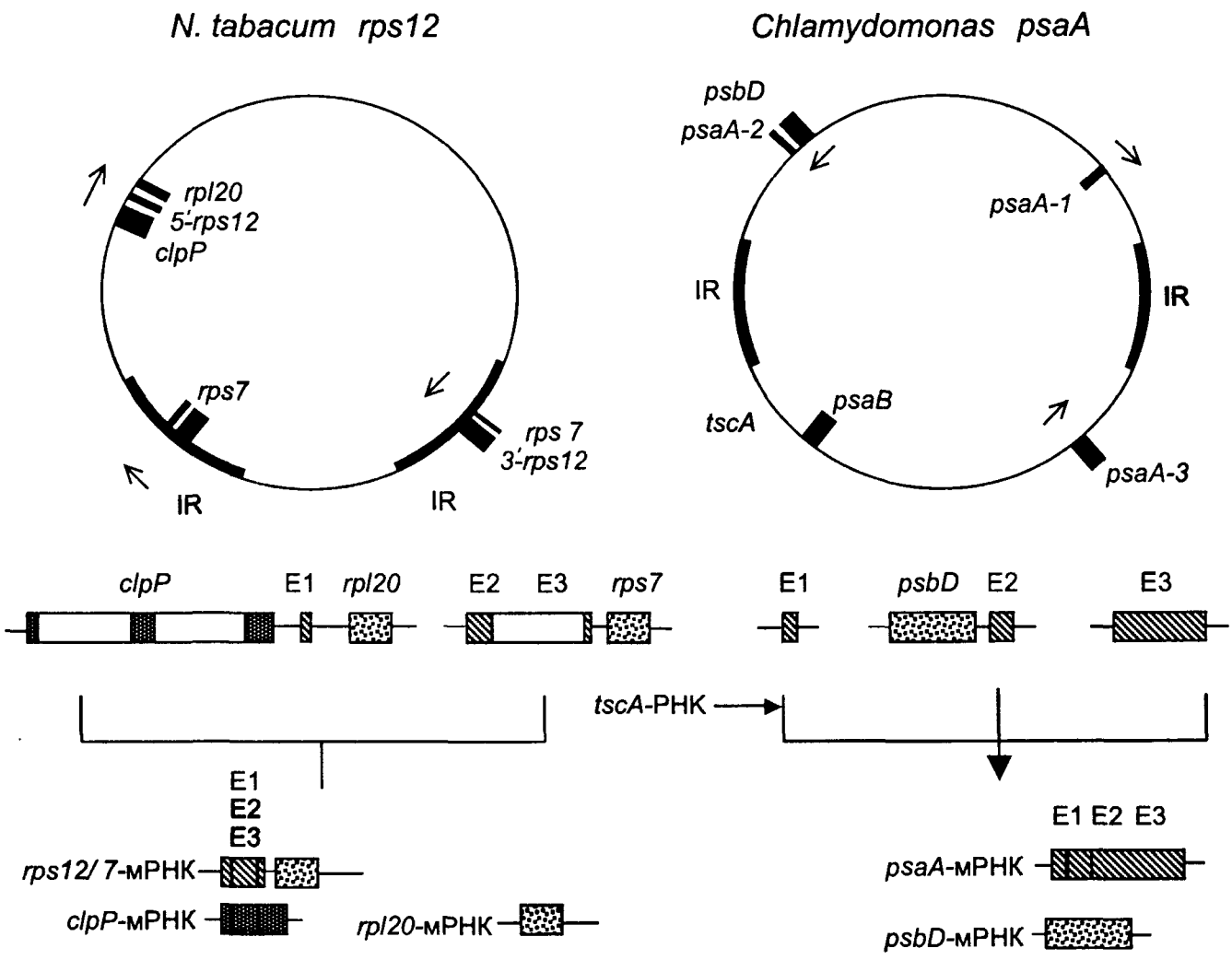


Рис. 3.11. Схема сплайсинга разделенных генов *rps12* и *psaA* мРНК из отдельных пре-мРНК. На карте вверху показано расположение генов и направление транскрипции. Жирными линиями обозначены инвертированные повторы. У табака *5'-rps12* содержит экзон E1, а *3'-rps12* — экзон(E2)-интрон-экзон(E3). У *Chlamydomonas psaA-1, -2,-3* содержит экзоны E1, E2 и E3 соответственно. Заштрихованные прямоугольники — экзоны, открытые — интроны [по Sugiura, 1992]

Транс-сплайсинг *rps12* гена изучали в пластидах ячменя с дефектными рибосомами. Обнаружено, что цис-интрон, разделяющий экзоны 2 и 3 (см. "Разделенные гены" и рис. 3.11), остается несплайсированным, а транс-сплайсинг интронов между экзонами 1 и 2 происходит, хотя в значительно меньшей степени. Это доказывает, что для цис-сплайсинга необходим(ы) фактор(ы), кодируемый(ые) хлоропластным геномом, который в данном случае отсутствует у мутантного ячменя [Sugita, Sugiura, 1996]. Транс-сплайсинг же частично происходит, что указывает на вероятный контроль со стороны ядерного генома. Как уже упоминалось, транс-сплайсинг другого гена — *psaA* — контролируют как минимум 14 ядерных генов.

Сплайсинг интронов — процесс, который только начинает изучаться для пластидных мРНК. Показано, что РНК-сплайсинг может модулировать

пространственную и временную активность ядерных генов [Bingham et al., 1988], а также, по-видимому, регулировать накопление трансляционно компетентной мРНК интрон-содержащих пластидных генов в корнях и меристемных тканях растений [Gruissem, Tonkyn, 1993]. К сожалению, не разработаны *in vitro* системы РНК-сплайсинга, что затрудняет анализ отдельных этапов сплайсинга и определение роли вовлеченных в него факторов [Sugita, Sugiura, 1996]. Несколько лет назад с помощью метода направленной ДНК-трансформации пластома была создана система изучения сплайсинга *in vivo* у табака [Bock, Maliga, 1995], которая, несомненно, ускорит исследование этого посттранскрипционного этапа экспрессии пластидных генов.

Изучение структуры и функционирования транскрипционного аппарата, а также процессов созревания мРНК пластид находится на начальном этапе. Остается много неясных моментов, имеются противоречия в данных, полученных различными методами и на различных объектах. Кроме процессов, связанных с созреванием пре-мРНК, последняя может подвергаться редактированию (РНК-эдитинг). Это явление рассмотрено в главе 10. Процессы модификации мРНК находятся под контролем как ядерных, так и цитоплазматических генов, поэтому их изучение открывает большие перспективы для понимания механизмов взаимодействия ядерных и цитоплазматических генетических систем, которые мы постараемся осветить в главе 8.

Экспрессия пластидных генов — трансляционный и посттрансляционный контроль

Трансляция — завершающий этап экспрессии генов, контроль на трансляционном уровне позволяет организму быстро адаптироваться к изменяющимся внешним условиям. К сожалению, трансляционный и посттрансляционный контроль экспрессии пластидных генов исследован недостаточно и потому содержит множество неясных моментов. Однако те факты, которые удалось установить, свидетельствуют, что трансляция является основным этапом регуляции экспрессии пластидных генов [Wollman et al., 1999].

Регуляция трансляции

В трансляции пластидных генов участвуют гомологичные прокариотическим 70S рибосомы, около 30 видов тРНК, аминоацил-тРНК синтетазы и ряд инициирующих факторов. Известно сходство хлоропластных рибосом с бактериальными [Sugiura,1992]. Тем не менее компоненты трансляционной системы хлоропластов имеют ряд уникальных особенностей (см. главу 2).

Инициирующие кодоны. Из 79 изученных у табака белок-кодирующих генов только две мРНК имеют инициирующий кодон GUG (*rps19* и *psbC*). Трансляция 75 генов начинается с кодона AUG, для двух мРНК стартовые кодоны не определены [Sugiura et al.,1998].

Направленная трансформация инициирующих кодонов ряда мРНК в хлоропластах *Chlamydomonas* вызывала полное либо частичное подавление трансляции. Замена AUG-кодона *petA* мРНК на AUU привела к подавлению трансляции цитохрома *f* до 10—20%, на ACG — до 2—5, на ACC и ACU — до 1% от нормального уровня. Наконец, мутации в двух (первом и третьем) нуклеотидах кодона UUC вызвали полное подавление трансляции [Chen et al., 1997].

Замена в нескольких мРНК табака кодона AUG на кодон GUG приводила к 90%-ному подавлению трансляции. Таким образом, инициирующий кодон определяет не сайт инициации транскрипции (поскольку он может быть заменен на другой кодон), а эффективность инициации трансляции [Sugiura et al.,1998].

Последовательности Shine-Dalgarno. У прокариот инициирует трансляцию образование комплекса между мРНК и малой субъединицей рибосомы, а точнее, ее 16S рРНК. Инициирующему кодону AUG предшествует последовательность Shine-Dalgarno (SD), обычно удаленная от него на -7 ± 2 нуклеотидов — именно она связывает мРНК с рРНК рибосомальной 30S субъединицы [McCarthy, Brimacombe, 1994].

Более половины хлоропластных генов высших растений также содержат SD-последовательности, хотя расстояние между ними и инициирующим кодоном более вариабельно, чем у бактерий: от –2 до –29 с пиком от –7 до –9 [Ruf, Kössel, 1988; Gillham et al., 1994]. SD-последовательность в пластидах, как правило, имеет вид GGAGG, однако встречаются редуцированные варианты (GGA, AGG, GAGG, GGAG).

У табака 30 из 79 пластидных генов, кодирующих полипептиды, не имеют SD-мотива на расстоянии 20 нуклеотидов до инициирующего кодона, а остальные 49 имеют эту последовательность, но на различном расстоянии от точки начала трансляции [Hirose, Sugiura, 1996; Sugiura et al.,1998].

Так, ген *rbcL* содержит SD-последовательность за 4—12 нуклеотидов до инициирующего кодона, что типично для прокариот. В отличие от него у гена *psbA* SD-подобная последовательность расположена на расстоянии 33—43 нуклеотида от инициирующего кодона и, как было показано, не является критической для инициации трансляции. Если исключить те гены, у которых SD-последовательность удалена от инициирующего кодона на большое расстояние, то, вероятно, лишь у 38 из 79 исследованных генов табака инициация трансляции происходит с помощью SD [Sugiura et al.,1998].

SD-последовательности у водорослей *Chlamydomonas* или *Euglena* редко располагаются рядом с инициирующим кодоном. У *Chlamydomonas* вызывали мутации SD-подобных последовательностей в *psbA* и *petD* генах, при этом были получены противоположные результаты. В случае *psbA* мутация вызывала резкое подавление синтеза белка D, при этом также значительно уменьшилось количество соответствующих мРНК. Мутация SD-последовательности второго гена не повлияла ни на стабильность мРНК *petD*, ни на уровень трансляции белка с данной матрицы [Stern et al., 1997]. Результаты исследования трансляции в хлоропластах *Euglena in vitro* свидетельствуют о том, что вторичная структура 5′UTR-участков важнее для инициации трансляции, чем SD-элементы [Betts, Spremulli, 1994]. 5′UTR-участки мРНК *Euglena*, как правило, богаты AU-нуклеотидами, что, предположительно, изменяет вторичную структуру мРНК и тем самым облегчает доступ рибосомной 30S субъединицы к стартовым кодонам [Stern et al., 1997]. По-видимому, такая структура характерна и для других водорослей. Прилегающие к точке инициации трансляции (5′UTR) последовательности высших растений и водоросли *Chlamydomonas* приведены на рис. 3.12.

	-12 +1 +5
Сосудистые растения	**GGGG**AGAUC**AUUAUGGC**
Chlamydomonas	AAAUUAUU**AUUUAUGGC**

Рис. 3.12. Консенсусные последовательности хлоропластных зон инициации трансляции. Выделены наиболее часто встречающиеся в данных позициях нуклеотиды. Инициирующий кодон AUG подчеркнут [по Stern et al., 1997]

Зависимость инициации трансляции от SD-последовательностей варьирует для разных видов растений и даже для разных пластидных генов одного и того же вида. Вероятно, более половины всех мРНК в хлоропластах водорослей инициируют трансляцию независимо от SD-элементов. Похоже, что роль этих прокариотических элементов постепенно замещается другими клеточными компонентами. Это, конечно, не исключает комплементарного взаимодействия нуклеотидов рРНК и мРНК при инициации трансляции, причем такие взаимодействия могут затрагивать более широкую область, а не только участок вблизи стартового кодона мРНК [Stern et al., 1997].

Другие цис-факторы, инициирующие трансляцию. В случае отсутствия функционально расположенных вблизи инициирующего кодона SD-последовательностей связывание мРНК с рибосомой происходит с помощью других факторов.

Как известно, у прокариот существуют три фактора инициации трансляции: IF1, IF2 и IF3 [McCarthy, Brimacombe, 1994]. Хлоропластно кодируе-

мый IF1-фактор обнаружен у шпината, а в хлоропластах *Euglena* — эквивалентные прокариотическим факторы инициации трансляции IF2 и IF3 [Gillham et al.,1994]. Следует отметить, что при гомологии центральных доменов IF3 у *Euglena* и *E.coli* N- и C-концы у водоросли уникальны, функция их пока неясна [Lin et al.,1996].

Благодаря изучению разработанной на пластидах табака системы трансляции *in vitro* идентифицировали также три цис-элемента, участвующих в связывании *psbA* мРНК с рибосомальной 30S субъединицей [Hirose, Sugiura, 1996]:

1) RBS1 (AAG, –11 –9),

2) RBS2 (UGAU, –22 –25) ,

3) AU-богатый мотив (AU-бокс), расположенный между ними (–21 –14).

RBS1- и RBS2-факторы комплементарны участкам 3′-конца 16S рибосомальной РНК. Дальнейшие исследования *in vitro* показали также, что в трансляции участвуют транс-факторы, очевидно, ядерного кодирования, взаимодействующие с AU-боксом. На основании этого была разработана модель инициации трансляции матричной РНК *psbA* гена [Hirose, Sugiura, 1996] (рис. 3.13).

В инициации трансляции *atpB* мРНК табака, не имеющей SD-последовательности, участвуют U-богатые участки, расположенные в 5′UTR вблизи точки начала трансляции. По-видимому, мРНК различных хлоропластных генов могут включаться в трансляцию различными путями [Sugiura et al.,1998] (рис. 3.14). Благодаря разработке методов направленной трансформации хлоропластной ДНК удалось установить важность в процессе трансляции последовательностей, следующих за инициирующим кодоном (см. главу 13).

Транс-факторы инициации трансляции кодируются ядром

Одним из независимых от SD механизмов активации трансляции является взаимодействие 5′UTR мРНК с ядерно кодируемыми факторами. Значительное количество таких факторов обнаружено как у водорослей, так и у высших растений. В одних случаях они сайт-специфичны, в других активируют трансляцию многих мРНК (табл. 3.4).

Изучение мРНК компонентов фотосистемы II *Chlamydomonas* позволило выявить множество белков, связывающихся с 5′UTR данных транскриптов. Детально исследован *psbD*-специфичный белок ядерного кодирования 47 кД. Ядерная мутация, снижающая количество белка 47 кД, подавляет также накопление мРНК *psbD*. Очевидно, указанный белок контролирует стабильность *psbD* матрицы. Выявлена специальная последова-

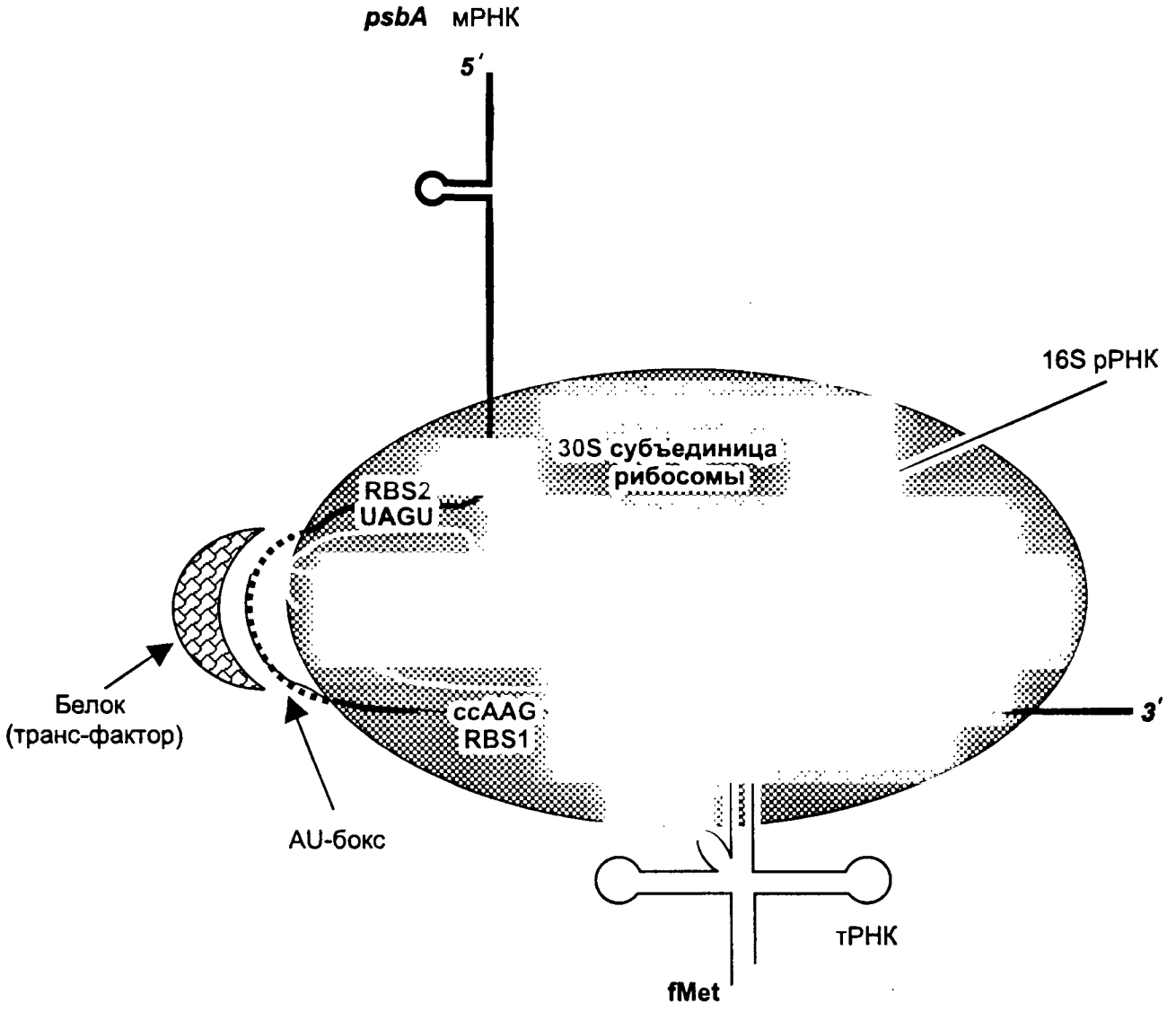


Рис. 3.13. Гипотетическая модель взаимодействия между тремя цис-факторами активации (RBS1, AU-бокс, RBS2), белковым транс-фактором и 16S рРНК при трансляции *psbA* мРНК табака [по Hirose, Sugiura, 1996]

тельность (chloroplast import signal), благодаря которой названный белок можно импортировать в пластиды даже *in vitro*. Секвенирование показало гомологию данного белка с другими поли(А)-связывающимися белками [Bruick, Mayfield, 1999].

Корреляция между количеством и/или активностью поли(А)-связывающихся белков и трансляцией хлоропластных мРНК показана также для *psbA* матриц *Chlamydomonas*. У ядерного мутанта F35 90%-ное снижение количества поли(А)-связывающихся белков приводит к подавлению инициации трансляции *psbA* мРНК. У другого ядерного мутанта hf149, полностью утратившего поли(А)-связывающийся белок, на 95% подавлена способность *psbA* мРНК ассоциироваться с рибосомами в полисомный комплекс и отсутствует продукт трансляции — белок D1. Ряд других ядерных мутантов, также утративших способность синтезировать D1, сочетают снижение концен-

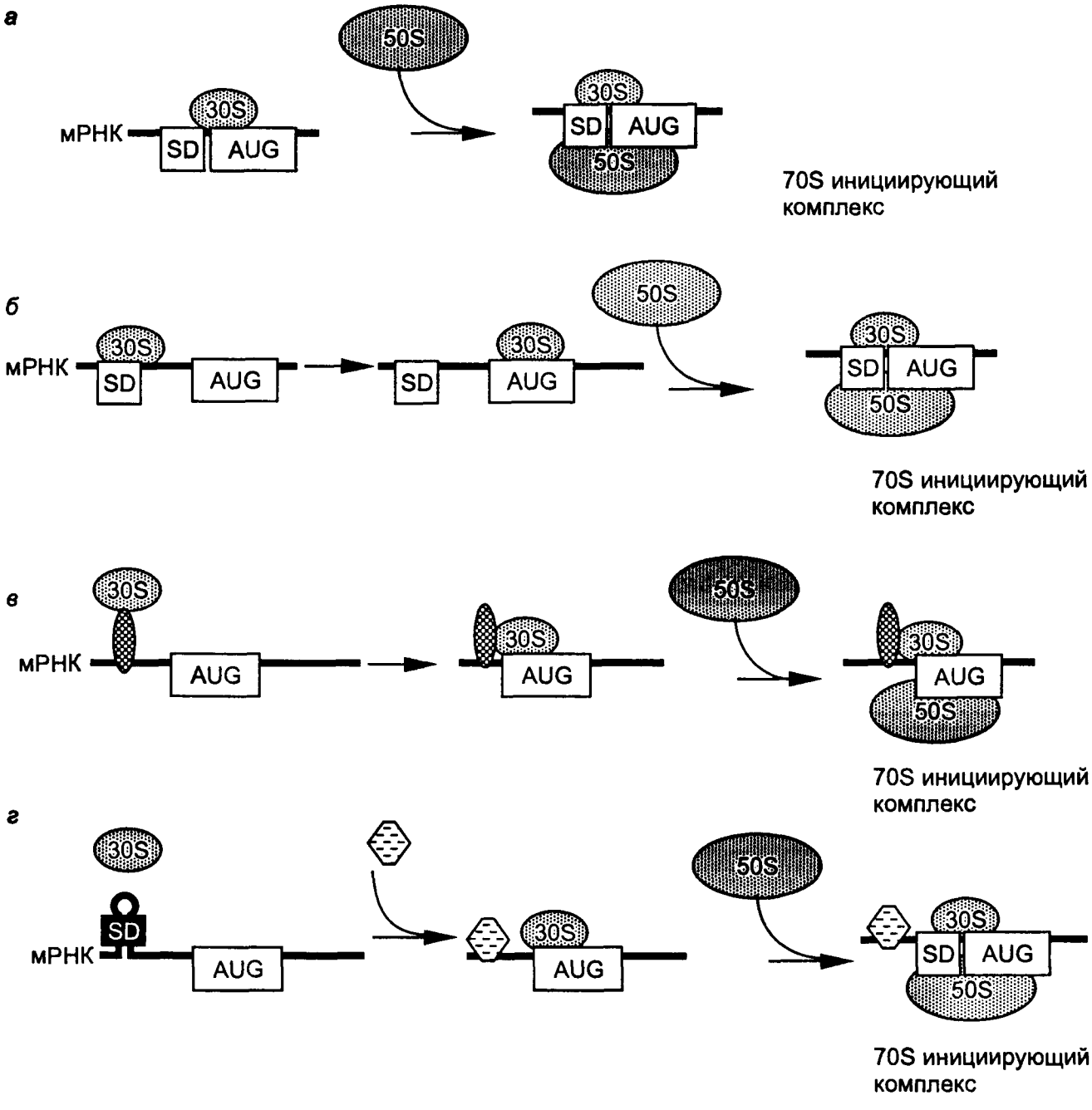


Рис. 3.14. Четыре модели инициации трансляции в хлоропластах: *а* — элемент Shine-Dalgarno (SD) находится рядом с инициирующим кодоном (AUG). Связывание с 30S субъединицей рибосомы предшествует присоединению 50S субъединицы. Аналог классического бактериального механизма трансляции (пример — трансляция *rbcL* у ячменя); *б* — SD-последовательность удалена от инициирующего кодона. После присоединения 30S субъединицы к SD следует "сканирование" до встречи с инициирующим кодоном (пример — трансляция *psbA* у ячменя); *в* — инициация, не зависящая от SD-последовательности. Для инициации требуется участие активатора трансляции (овал), который связывается с 5′UTR и 30S субъединицей (пример — трансляция *psbC* у *Chlamydomonas*); *г* — инициация, требующая как SD-последовательности, так и активатора трансляции. Вторичная структура, образующаяся в 5′UTR и содержащая элемент SD, препятствует связыванию мРНК с 30S субъединицей рибосомы. Активатор трансляции (шестиугольник) разрушает вторичную структуру, 30S субъединица связывается с SD-последовательностью, образуя 70S инициирующий комплекс (пример — трансляция *psbA* у *Chlamydomonas*) [по Stern et al., 1997]

Таблица 3.4

Кодируемые ядерным геномом активаторы трансляции хлоропластных мРНК [Stern, 1997, с дополнениями из Wostrikoff, 2001]

Активируемые мРНК[1]	Кодируемый белок[2]	Ядерный ген[3]	Организм	Доказательство предполагаемой функции[4]
Неспецифичные	Множественные	*cps1*	Кукуруза	Ядерная мутация
Неспецифичные	Множественные	*cps2*	Кукуруза	Ядерная мутация
Неспецифичные	Множественные	Не определен	*Chlamydomonas*	Определение РНК-связывания *in vitro*
atpA	α-субъединица	F54	*Chlamydomonas*	Ядерная мутация
psaB	PsaB	F15(TAB1)	*Chlamydomonas*	Ядерная мутация
psbA	D1	F35	*Chlamydomonas*	Ядерная мутация; определение РНК-связывания *in vitro*
psbC	P6(CP34)	F34, F64	*Chlamydomonas*	Ядерная мутация; определение РНК-связывания *in vitro*; ядерная супрессия
psbD	D2	NAC1, AC115	*Chlamydomonas*	Ядерная мутация
petD	SUIV	D503sup	*Chlamydomonas*	Ядерная мутация
petA	Cyt*f*	TCA1	*Chlamydomonas*	Ядерная мутация

[1] Активаторы связываются неспецифически со многими хлоропластными мРНК или специфически с указанными мРНК.

[2] Трансляция мРНК-кодируемого хлоропластного белка зависит от активатора трансляции.

[3] Генетически определенные ядерные гены, кодирующие активаторы хлоропластной трансляции.

[4] Активаторы трансляции определены с помощью: 1) ядерных мутаций; 2) как ядерные супрессоры дефектов 5′UTR, блокирующих трансляцию; 3) анализа РНК-связывания *in vitro*.

трации или утрату поли(А)-связывающегося белка с потерей способности *psbA* мРНК ассоциироваться в полисомный комплекс [Bruick, Mayfield, 1999].

Пять белков — 30, 32, 40, 46 и 80 кД — связываются с 5′UTR *psbC* мРНК *Chlamydomonas*. Интересно, что ассоциация одного из них (46 кД) с мРНК светозависима и может подавляться АДФ [Zerges, Rochaix, 1998; Bruick, Mayfield, 1999].

Изучение семи аллельных ядерных мутаций *Chlamydomonas,* приводя-

щих к специфическому блокированию трансляции пластидного гена *petA*, позволило описать еще один регуляторный ядерный ген *TCA1*. Данный ген имеет 21(!) аллель и специфически активирует трансляцию хлоропластного гена *petA*, кодирующего цитохром *f* — компонент комплекса b_6f [Wostrikoff et al., 2001].

Хотя структура хлоропластных активаторов трансляции, кодируемых ядром, до сих пор не известна, возможно, они являются мостом между специфическими узнающими последовательностями в 5'UTR-областях мРНК и рибосомальными субъединицами (рис. 3.14). Данные белки, вероятно, обладают способностью модифицировать вторичную структуру мРНК, облегчая ассоциацию рибосомы с SD или иными участвующими в инициации трансляции последовательностями [Gruissem, Tonkyn, 1993; Stern et al., 1997].

Несмотря на то что у *Chlamydomonas* путем генетического анализа идентифицированы ядерные гены, необходимые для трансляции пластидных генов *psbA, psbC, psaB, atpA*, и показана их специфичность для каждой пластидной мРНК, до сих пор не удалось клонировать эти гены [McCormac, Barkan, 1999].

Следует отметить, что в отличие от *Chlamydomonas* 5'UTR большинства мРНК высших растений сравнительно короткие, поэтому маловероятно образование ими развитых вторичных структур, что, однако, не исключает роли этих последовательностей в контроле трансляции [Gruissem, Tonkyn, 1993].

Ядерные гены — регуляторы трансляции пластидных матриц — у высших растений почти не изучены. Имеются сведения лишь о двух таких генах — *crp1* и *atp1* у кукурузы [Barkan et al., 1994; McCormac, Barkan, 1999]. Мутация *atp1-1* ингибирует трансляцию *atpB/E* мРНК, а именно приводит к нарушению связывания указанной матричной РНК с пластидными рибосомами. При этом не изменяется структура *atpB/E* мРНК молекул [McCormac, Barkan, 1999].

В случае мутации *crp1* нарушаются процессинг *petD* мРНК и трансляция хлоропластных *petA* и *petD* мРНК, кодирующих субъединицы пластидного комплекса b_6/f тилакоидных мембран [Barkan et al., 1994]. Интересно, что механизмы действия гена *TCA1 Chlamydomonas* и *crp1* кукурузы, активирующих один и тот же пластидный ген *petA*, различаются по своей специфичности [Wostrikoff et al., 2001].

Ген *crp1* недавно был клонирован [Fisk et al., 1999], гомолог данного гена был описан у *Chlamydomonas* — это ген *Tbc2*, контролирующий совсем другой участок пластидного генома — ген *psbC* [Zerges, 2000].

Кроме того, ген *crp1*, как было показано, подобен ядерным генам грибов (*PET309, cya5*), играющим сходную роль в регуляции трансляции митохонд-

риальных генов [Fisk et al., 1999]. Пока не ясно, сходным ли образом регулируется ядерными генами трансляция митохондриальных и хлоропластных матричных РНК.

Свет активирует трансляцию фотосинтетических белков пластид

Давно показано, что пластидная мРНК фотосинтетических белков может накапливаться в значительных количествах даже при содержании растений в темноте [см. обзоры: Boschetti et al., 1990; Gruissem, Tonkyn, 1993]. При этом трансляция либо вообще не происходит, либо уровень продукта составляет сотые доли нормального. Более того, иногда мРНК соответствующих белков даже обнаруживается ассоциированной в полисомы, однако накопления белка не происходит [Berry et al., 1988; Klein et al.,1988].

Освещение этиолированных проростков ячменя вызывает увеличение ассоциации *psbA* мРНК в полисомы, образуется множество 70S инициирующих комплексов [Kim, Mullet, 1994]. Установлено, что индуцированная светом трансляция *psbA* мРНК у табака регулируется с помощью ее 5'UTR [Maliga, 1994]. Белок D1 фотосистемы II, кодируемый *psbA* геном, не синтезировался в темноте *in organello* в системе изолированных хлоропластов гороха, однако при этом накапливались промежуточные продукты трансляции [Taniguchi et al., 1993]. Вероятно, свет регулирует в данной системе стадию элонгации трансляции.

В темноте в хлоропластах *in vivo* отмечается высокий уровень АДФ и связанной с этим АДФ-киназной активности; при этих условиях трансляция *psbA* мРНК подавляется. Вероятно, в этой инактивации участвуют белковые транс-факторы, рассмотренные выше. Показано, что связывание *psbA* мРНК с этими активаторами можно модулировать *in vitro:* при окислительных условиях комплекс разрушается, при восстановительных — восстанавливается. Очевидно, можно предполагать, что *in vivo* хлоропластный редокс-потенциал, отражающий фотосинтетическую активность, вызывает изменение связывания белков — активаторов трансляции с матрицей и таким образом регулируется процесс трансляции данной мРНК [Bruick, Mayfield, 1999] (рис. 3.15).

Посттрансляционный контроль экспрессии пластидных генов

Ряд белков в хлоропластах, как и в других клеточных органеллах, собран в сложные мультимерные комплексы, выполняющие определенную функцию. Как осуществляется регуляция трансляции отдельных компонентов таких комплексов? Как известно, большинство неассоциированных в мак-

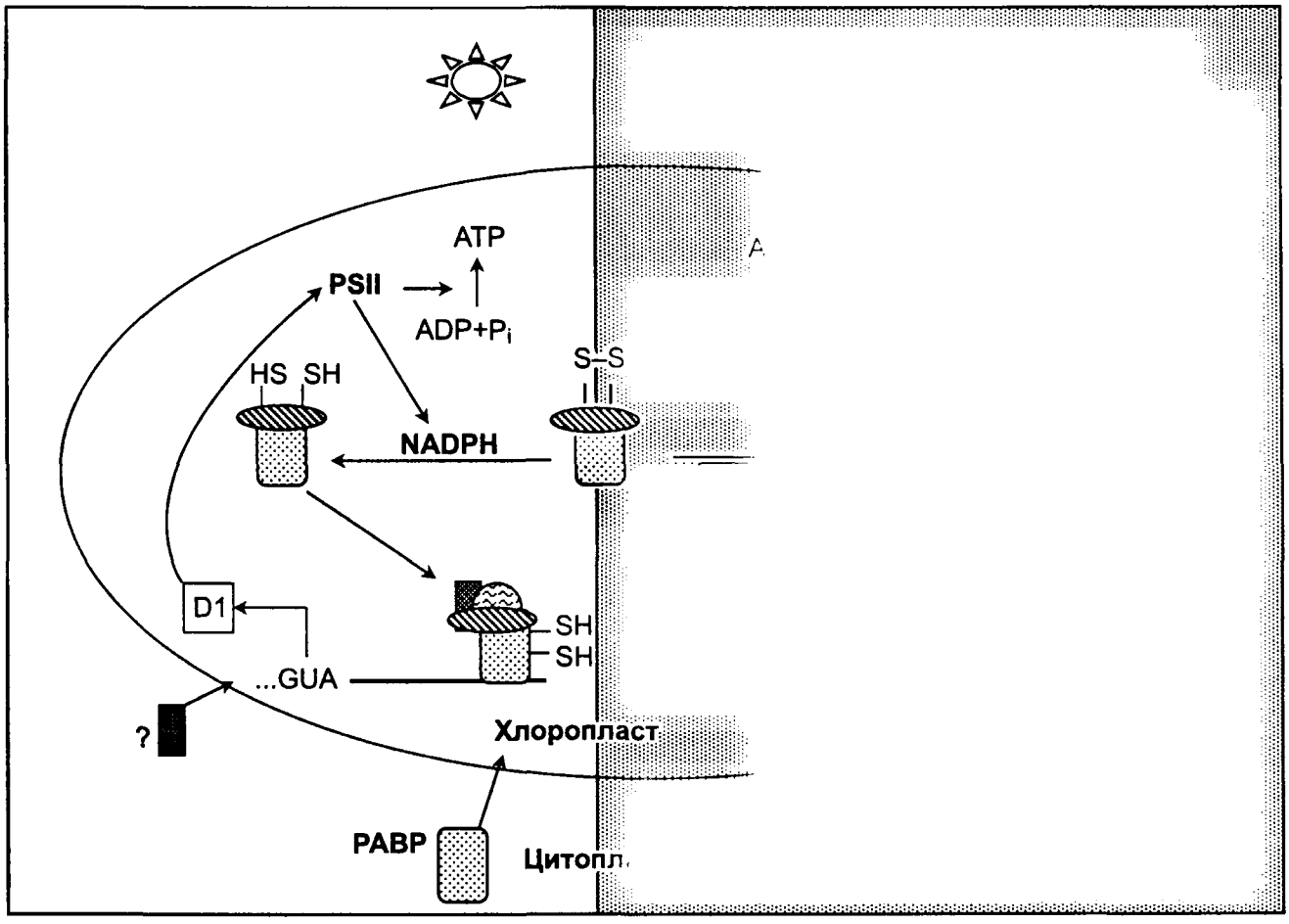


Рис. 3.15. Модель активации трансляции мРНК под действием света. Активаторы трансляции, кодируемые ядерным геномом, включая хлоропластный гомолог белковых дисульфидизомераз (cPDI) и хлоропластный поли(А)-связывающий белок (PABP), а также другие, пока не охарактеризованные белки, транслируются в цитоплазме и импортируются в хлоропласт. Уровень фотосинтетической активности хлоропласта связан с cPDI, переносчиком (transducer) хлоропластного редокс-потенциала. Активность cPDI может ингибироваться ADP-зависимой киназой, когда фотосинтез, а значит, и отношение ATP/ADP малы. Белковый комплекс, связываясь с 5′UTR участком мРНК, инициирует присоединение рибосом и трансляцию. Два не изученных пока активатора трансляции представляют собой белки 55 и 38 кД [Bruick, Mayfield, 1999]

ромолекулярные комплексы субъединиц подвергается в растении быстрой протеолитической деградации [Stern et al., 1997]. Оказалось, что на уровне трансляции также может происходить координация накопления отдельных субъединиц.

Наиболее подробно исследован комплекс цитохром b_6/f, который состоит их трех компонентов: цитохрома *f*, цитохрома b_6 и субъединицы IV, кодируемых соответственно тремя генами: *petA, petB* и *petD*. Комплекс изучался у *Chlamydomonas*. Было показано, что делеция любого из трех генов приводила к нарушению образования комплекса. Однако неожиданным оказалось то, что цитохром *f* стабилен в двух мутантах с делециями генов *petB* или *petD* (рис. 3.16). При этом синтез цитохрома *f* был замедлен, хотя из-

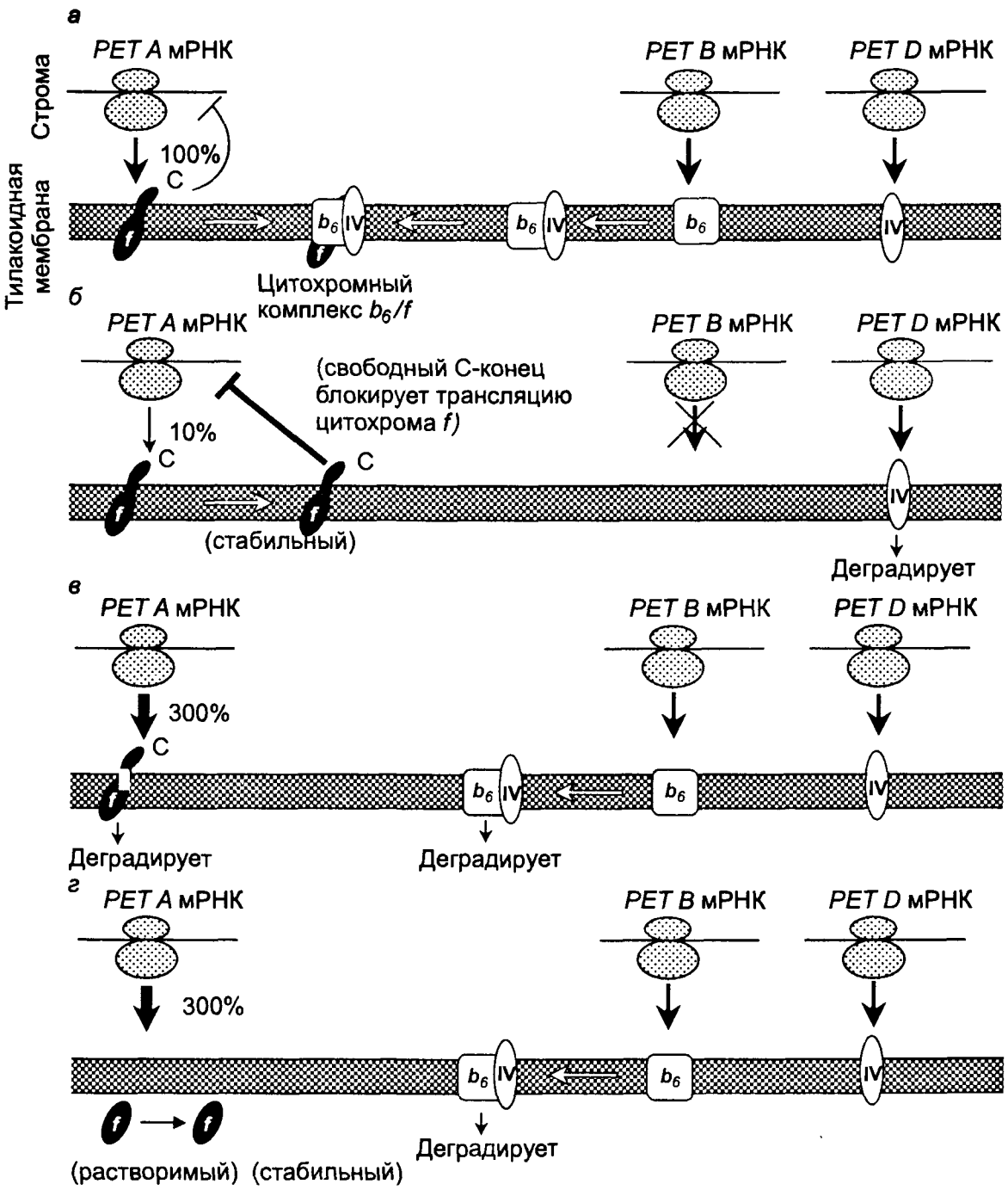


Рис. 3.16. Модель авторегуляции трансляции цитохрома *f* в хлоропластах *Chlamydomonas* [Stern et al., 1997]. Трансляция трех основных белков комплекса b_6/f изображена в виде мРНК, связанной с рибосомами. Размеры вертикальных стрелок отражают относительную интенсивность трансляции. *а* — нормальный фенотип: большинство молекул цитохрома *f* собирается в стабильный цитохром b_6/f комплекс, небольшое количество свободных С-концов цитохрома *f* регулирует трансляцию — 100%; *б* — мутант *PET B* с блокированным синтезом цитохрома b_6; комплекс b_6/f не образуется. Накапливаются молекулы цитохрома *f*, и неблокированные С-концы молекул резко подавляют собственную трансляцию — 10%; *в* — сайт-направленный мутант цитохрома *f* с нестабильной молекулой. Усиленная трансляция (300%) цитохрома *f* вызвана деградацией мутантных молекул. Цитохром b_6 и субъединица IV нестабильны, поскольку не образуется нормальный трехкомпонентный комплекс; *г* — мутант с делецией С-конца цитохрома *f*. Отсутствие домена, связывающего белок с мембраной, переводит его в растворимую форму. Делеция С-конца препятствует репрессии трансляции конечным продуктом, и синтез мутантного цитохрома *f* усиливается — 300%

менений концентрации *petA* мРНК либо стабильности самого продукта трансляции не обнаруживалось (рис. 3.16, *б*). Исследования показали, что причиной ослабления трансляции *petA* мРНК при отсутствии одного из трех компонентов комплекса b_6/f является С-конец молекул цитохрома *f*. Синтез цитохрома *f* исследовался в клетках *Chlamydomonas,* содержащих мутантные гены данного белка [Kuras et al., 1995]. При делеции С-конца (рис. 3.16, *г*) или при дестабилизации цитохрома *f* мутацией в гем-связывающем домене (рис. 3.16, *в*) скорость синтеза мутантного белка втрое превосходит нормальную [Kuras, Wollman, 1994].

Такой механизм зависимости скорости трансляции определенного хлоропласт-кодируемого белка от присутствия других полипептидов, образующих комплекс с этим белком, но являющихся как бы доминантными по отношению к нему, был назван CES-контролем (control by epistasy of synthesis) [Wollman, 1999]. CES-контроль является скорее всего универсальным регуляторным механизмом в биогенезе фотосинтетических белков пластид *Chlamydomonas.* CES-субъединицы описаны для каждого белка тилакоидной мембраны: α-субъединица АТФ-синтазного комплекса [Drapier et al.,1992], psaA-субъединица реакционного центра фотосистемы I [Girard-Bascou et al., 1987; Stampacchia et al., 1997], субъединицы D1 и CP47 фотосистемы II [Bennoun et al., 1986; Erickson et al., 1986; Jensen et al., 1986].

Чрезвычайно важным представляется участие подобного механизма регуляции при сборке ключевого фотосинтетического белка — рибулозодифосфаткарбоксилазы, в процессе которой координируется экспрессия генов уже двух клеточных компартментов — ядра и хлоропластов [Rodermel et al., 1996; Khrebtunkova, Spreitzer, 1996].

Регуляция трансляции у высших растений, очевидно, является основным уровнем контроля экспрессии генов фотосинтетических белков, кодируемых пластомом. Информационные РНК большинства данных белков стабильны и аккумулируются как в темноте, так и в нефотосинтетических тканях, при этом соответствующие белки не образуются (в редких случаях возможна регуляция некоторых генов фотосинтеза и на уровне транскрипции). Исследования показывают, что свет вызывает инициацию трансляции мРНК фотосинтетических белков, изменяя редокс-показатель в хлоропластах и, как результат, обеспечивая связь белков-активаторов трансляции с матрицей [Danon, Mayfield, 1994; Bruick, Mayfield, 1999]. Таким образом, хлоропласт имеет эффективную систему адаптации к изменяющимся условиям освещения. Предотвращая возможное неконтролируемое генерирование электронов и свободных радикалов при фотосинтезе, происходит быстрое переключение неактивного пула мРНК на синтез фотосинтетических белков, осуществляющих ассимиляцию углерода [Hagemann et al.,1999].

* * *

Завершая данную главу, отметим, что первоначально предполагавшаяся гомология между экспрессией генов прокариот и пластид оказалась весьма ограниченной. Действительно, ряд компонентов (рибосомальные РНК, часть рибосомальных белков, тРНК, хлоропластная РНК-полимераза, некоторые промоторы, белки-активаторы трансляции) обладают значительной гомологией с соответствующими компонентами бактерий. Однако система регуляции экспрессии хлоропластных генов оказалась значительно сложнее, чем предполагалось. Были обнаружены множественные промоторы и РНК-полимеразы как пластидного, так и ядерного кодирования, описан многоступенчатый процесс созревания мРНК, исследованы процессы инициации трансляции. В экспрессию пластидных генов вовлечено большое количество белков, кодируемых ядром. Такое усложнение регуляции генной активности этих органелл связано с фотосинтетической активностью хлоропластов, а также с координацией работы трех клеточных геномов — ядерного, пластидного и митохондриального.

Литература

Allison L.A., Simon L.D., Maliga P. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 2802—2809.

Barkan A. Proteins encoded by a complex chloropast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs // EMBO J. 1988. Vol.7. P. 437—445.

Barkan A., Walker M., Nolasco M., Jonson D. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 3170—3181.

Barras F., Marius M.G. The great GATC: DNA methylation in *E.coli* // Trends Genet. 1989. Vol. 5. P. 139—143.

Bennet D.C., Rogers S.A., Chen L.J., Orozco E.M. A primary transcript in spinach chloroplasts that completely lacks a 5′ untranslated leader region // Plant Mol. Biol. 1990. Vol. 15. P. 111—115.

Bennoun M., Spierer-Herz M., Erickson J. et al. Characterization of photosystem II mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the *psbA* gene // Plant Mol. Biol. 1986. Vol. 6. P. 151—160.

Berry J.O., Carr J.P., Klessig D.F. mRNA encoding ribulose 1,5-biphosphate carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 4190—4194.

Betts L., Spremulli L.L. Analysis of the role of of the Shine-Dalgarno sequences and mRNA secondary structure on the efficiency of translational initiation in the *Euglena gracilis* chloroplast *atpH* mRNA // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 26456—26463.

Bingham P.M., Chou T.-B., Mims I., Zachar Z. On/off regulation of gene expression at the level of splicing // Trends Genet. 1988 Vol. 4. P. 134—140.

Bock R., Maliga P. Correct splicing of a group II intron from a chimeric reporter gene transcript in tobacco plastids // Nucl. Acids Res. 1995. Vol. 23. P. 2544—2547.

Boschetti A., Breidenbach E., Blatter R. Control of protein formation in chloroplasts // Plant Sci. 1990. Vol.68, No. 2. P. 131—137.

Bradley D., Gatenby A.A. Mutational analysis of the maize chloroplast ATPase β-subunit gene promoter: the isolation pf promoter mutants in *E.coli* and their characterization in a chloroplast *in vitro* transcriptional system // EMBO J. 1985. Vol. 4. P. 3641—3644.

Bruick R.K., Mayfield S.P. Light-activated translation of chloropast mRNAs // Trends in Plant Science. 1999. Vol. 4. P. 190—195.

Burkard W.P., Keller H.H. Poly(A) polymerase and poly(G) polymerase in wheat chloroplast // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1974. Vol. 71. P. 389—393.

Bülow S., Link G. Sigma-like activity from mustard (*Sinapis alba*) chloroplasts conferring DNA-binding and transcriptional specificity to *E. coli* core RNA polymerase // Plant Mol. Biol. 1988. Vol.10. P. 394—399.

Chen X., Simpson C.L., Kindle K.L., Stern D. A dominant mutation in the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear gene *Sim30* supresses translational defects caused by initiation codon mutations in chloroplast genes // Genetics. 1997. Vol. 145. P. 935—943.

Chiba T., Harada T., Goto S. et al. Transcription of tRNA genes from a large-scale plastid DNA deletion clearly reveals the action of nuclear-encoded RNA polymerase in the plastid // J. Plant Physiol. 1996. Vol. 148. P. 652—656.

Chory J., Peto C.A. Mutations in the *DET1* gene affect cell-type specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1990. Vol. 87. P. 8776—8780.

Christopher D.A., Hallick R.B. Euglena gracilis chloroplast ribosomal protein operon: a new chloroplast gene for ribosomal protein L5 and description of a novel organelle intron category designated group III // Nucl. Acids Res. 1989. Vol.17. P. 7591—7607.

Danon A., Mayfield S.P. Light-dependent translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential // Science. 1994. Vol. 266. P. 1717—1719.

Day A., Ellis T.H.N. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts // Cell. 1984. Vol. 39. P. 359—368.

Deng X.W., Gruissem W. Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants // EMBO J. 1988. Vol. 7. P. 3301—3305.

Doetsch N.A., Thompson M.D., Hallick R.B. A maturase-encoding group III twintron is conserved in deeply rooted euglenoid species: are group III introns the chicken or the egg? // Mol. Biol. Evol. 1998. Vol. 15, No.1. P. 76—86.

Doetsch N.A., Favreau M.R., Kuscuoglu N. et al. Chloroplast transformation in *Euglena gracilis:* splicing of a group III twintron transcribed from a transgenic psbK operon // Curr. Genet. 2001. Vol. 39, No 1. P. 49—60.

Drapier D., Girard-Bascou J., Wollman F.A. Evidence for nuclear control of the expression of the atpA and atpB chloroplast genes in *Chlamydomonas* // The Plant Cell. 1992. Vol. 4, No 3. P. 283—295.

Dujon B. Group I introns and mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations — a review // Gene. 1989. Vol. 82. P. 91—96.

Dürrenberger F., Rochaix J.D. Chloroplast ribosomal intron of *Chlamydomonas reinhardtii: in vitro* self-splicing, DNA endonuclease activity and *in vivo* mobility // EMBO J. 1991. Vol. 10, No. 11. P. 3495—3499.

Dynan W.S. Understanding the molecular mechanisms by which methylation influences gene expression // Trends Genet. 1989. Vol. 5. P. 35—39.

Erickson J.M., Rahire M., Malnoe P. et al. Lack of the D2 protein in a *Chlamydomonas reinhardtii psbD* mutant affects photosystem II stability and DI expression // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 1745—1754.

Fisk D.G., Walker M.B., Barkan A. Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 2621—2630.

Gauly A., Kössel H. Evidence for tissue-specific cytosine — methylation of plastid DNA from *Zea mays* // Curr. Genet. 1989. Vol. 15. P. 371—374.

Gillham N.W., Boynton J.E., Hauser C.R. Translational regulation of gene expression in chloroplast and mitochondria // Annu. Rev. Genet. 1994. Vol. 28. P.71—93.

Girard-Bascou J., Choquet Y., Schneider M. et al. Characterization of a chloroplast mutation in the *psaA2* gene of *Chlamydomonas reinhardtii* // Curr. Genet. 1987. Vol. 12. P. 489—495.

Gruissem W., Tonkyn J.C. Control Mechanisms of Plastid Gene Expression // Critical Reviews in Plant Sciences. 1993. Vol.12. P. 19—55.

Hagemann R., Bock R., Hagemann M. Extranuclear Inheritance: Plastid Genetics // Progress in Botany. 1996. Vol. 57. P. 197—217.

Hagemann R., Hagemann M., Bock R. Extranuclear Inheritance: Plastid Genetics // Progress in Botany. 2000. Vol. 61. P.76—90.

Haley J., Bogorad L. Alternative promoters are used for genes within maize chloroplast polycistronic transcription units // Plant Cell. 1990. Vol. 2. P. 323—326.

Hallick R.B., Lipper C., Richards O.D., Rutter W.J. Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis* // Biochem. 1976. Vol. 15. P. 3039—3045.

Haugel-Nielsen J., Hainsdorf E., Regnier P. The *rpsO* mRNA of *Escherichia coli* is polyadenylated at multiple sites resulting from endonucleolytic processing and exonucleolytic degradation // EMBO J. 1996. Vol.15. P. 3144—3152.

Hawley D.K., McClure W.R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences // Nucl. Acids Res. 1983. Vol. 11. P. 2237—2242.

Hayes R., Kudla J., Schuster G. et al. Chloroplast mRNA 32-end processing by a high molecular-weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins // EMBO J. 1996. Vol.15. P. 1132—1141.

Helmann J.D., Chamberlin M. J. Structure and function of bacterial sigma factors // Annu. Rev. Biochem. 1988. Vol. 57. P. 839—853.

Hess W.R., Prombona A., Fieder B. et al. Chloroplast *rps15* and *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase // EMBO J. 1993. Vol. 12. P. 563—571.

Higgs D.C., Shapiro R.S., Kindle K.L., Stern D.B. Small *cis*-acting sequences that specify secondary structures in a chloroplast mRNA are essential for RNA stability and translation // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol.19, No.12. P. 8479—8491.

Hirose T., Sugiura M. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts // EMBO J. 1996. Vol.15. P.1687—1695.

Hirose T., Sugiura M. Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes // EMBO J. 1997. Vol.16. P. 6804—6811.

Howe C.J. RNA polymerases and plastid evolution // Trends Plant Sci. 1996. Vol.1. P. 323—324.

Huff A. Sugar regulation of plastid interconversions in epicarp of citrus fruit // Plant Physiol. 1984. Vol. 76. P. 307—312.

Igloi G.L., Kössel H. The transcriptional apparatus of chloroplasts // Critical Reviews in Plant Sciences. 1992. Vol.10. P. 525—558.

Iratni R., Baeza R., Andreeva A. et al. Regulation of the rRNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by a constitutive repression // Genes Dev. 1994. Vol. 8. P. 2928—2938.

Jackson R.J., Standart N. Do the poly(A) tail and 3′ untranslated region control mRNA translation? // Cell. 1990. Vol. 62. P.15—24.

Jenkins B.D., Kulhanek D.J., Barkan A. Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors // Plant Cell. 1997. Vol. 9. P. 283—296.

Jensen K.H., Herrin D.L., Plumley F.G., Schmidt G.W. Biogenesis of photosystem II complexes: transcriptional, translational and posttranslational regulation // J. Cell Biol. 1986. Vol. 103. P. 1315—1325.

Khrebtunkova I., Spreitzer R.J. Elimination of the Chlamydomonas gene family that encodes the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 13689—13693.

Kim M.Y., Mullet J.E. Ribosome-binding sites on chloroplast *rbcL* and *psbA* mRNAs and light-induced initiation of D1 translation // Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 25. P. 437—448.

Kim M.Y., Mullet J.E. Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1445—1457.

Kirk J.T.O., Tilney-Bassett R.A.E. The plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance. 2nd ed. Amsterdam; NewYork: Elsevier /North-Holland Biomedical Press, 1978. 650 p.

Klein R.R., Mason H.S., Mullet J.E. Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB, psbA* and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings // J. Cell Biol. 1988. Vol.106. P. 289—295.

Kobayashi H., Ngernprasirtsiri J., Akazawa T. Transcriptional regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts // EMBO J. 1990. Vol. 9. P. 307—311.

Kudla J., Hayes R., Gruissem W. Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 7137—7146.

Kuras R., Wollman F.-A. The assembly of cytochrome b_6/f complexes: an approach using genetic transformation of green alga *Chlamydomonas reinhardtii*// EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 1019—1027.

Kuras R., Buschlen S., Wollman F.-A. Maturation of pre-apocytochrome *in vivo*. A site-directed mutagenesis study in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 27797—27803.

Lahiri S.D., Allison L.A. Complementary expression of two plastid-localised σ-like factors in maize // Plant Physiol. 2000. Vol. 123. P. 883—894.

Leon P., Arroyo A., Mackenzie S. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. Vol.49. P. 453—480.

Lerbs-Mache S. The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA-polymerase: Single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1993. Vol. 90. P. 5509—5513.

Lin Q., Yu N.J., Spremulli L.L. Expression and functional analysis of *Euglena gracilis* chloroplast initiation factor 3 // Plant. Mol. Biol. 1996. Vol. 32. P. 937—945.

Link G. DNA sequence requirements for the accurate transcription of a protein-coding plastid gene in a plastid *in vitro* system from mustard (*Sinapis alba* L.) // EMBO J. 1984. Vol. 3. P. 1697—1700.

Link G. Plastid differentiation: organelle promoters and transcription factors // Plant promoters and transcription factors. Heidelberg: Springer-Verlag, 1994. P. 63—83.

Link G. Green life: control of chloroplast gene transcription // BioEssays. 1996. Vol. 18. P. 465—471.

Lisitsky I., Klaff P., Shuster G. Addition of poly(A) rich sequences to endonucleolytic cleavage

sites in the degradation of spinach chloroplast RNA // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 13398—13403.

Liu B., Troxler R.F. Molecular characterization of a positively photoregulated nuclear gene for a chloroplast RNA polymerase σ-factor in *Cyanidium caldarium* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 3313—3318.

Lodish H., Baltimore D., Berk A. et al. Molecular Cell Biology. 3rd ed. Sci Amer. Books, 1995. 1344 p.

Marano M.R., Carillo N. Chromoplast formation during tomato fruit ripening. No evidence for plastid DNA methylation // Plant Mol. Biol. 1991. Vol.16. P.11—15.

McCarthy J.E.G., Brimacombe R. Procaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation // Trends Genet. 1994. Vol. 10. P. 402—407.

McCormac D.J., Barkan A. A nuclear gene in maize required for the translation of the chloroplast *atpB/E* mRNA // Plant Cell. 1999. Vol.11. P. 1709—1716.

McCourt P., Kunst L., Browse J., Somerville C.R. The effects of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* // Plant Physiol. 1987. Vol. 84. P. 353—360.

Miyagishima S.-Y., Takahara M., Kuroiwa T. Novel filaments 5 nm in diameter constitute the cytosolic ring of the plastid division apparatus // Plant Cell. 2001a. Vol.13. P. 707—721.

Miyagishima S.-Y., Takahara M., Mori T. et al. Plastid division is driven by a complex mechanism that involves differential transition of the bacterial and eukaryotic division rings // Plant Cell. 2001b. Vol. 13. P. 2257—2268.

Mordon C.W., Wolfe K.H., dePamphilis C.W., Palmer J.D. Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes // EMBO J. 1991. Vol. 10. P. 3281—3288.

Mori T., Kuroiwa H., Takahara M. et al. Visualization of an FtsZ ring in chloroplasts of *Lilium longifolium* leaves // Plant Cell Physiol. 2001. Vol. 42. P. 555—559.

Mullet J.E. Chloroplast development and gene expression // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1988. Vol. 39. P. 475—502.

Ngernprasirtsiri J., Kobayashi H., Akazawa T. DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 4750—4754.

Ngernprasirtsiri J., Kobayashi H., Akazawa T. Expression of photosynthetic genes is distinctly different between chloroplasts and amyloplasts in the liquid-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) // Cell Struct. Funct. 1990. Vol. 15, No. 5. P. 273—283.

Oelmüller R., Mohr H. Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes // Planta. 1986. Vol. 168. P. 482—487.

Osteryoung K.W., Vierling E. Conserved cell and organelle division // Nature. 1995. Vol. 376. P. 473—474.

Osteryoung K.W. Organelle fission. Crossing the evolutionary divide // Plant Physiol. 2000. Vol. 123. P. 1213—1216.

Osteryuong K.W., McAndrew R.S. The plastid division machine// Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2001. Vol. 52. P. 315—333.

Pfannschmidt T., Link G. Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba*) seedlings // Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 25. P. 69—81.

Polya G.M., Iagendorf A.T. Wheat leaf RNA polymerases. I. Partial purification and characterization of nuclear, chloroplast and soluble DNA-dependent enzymes // Arch. Biochem. Biophys. 1971. Vol. 146. P. 635—643.

Pyke K.A. The genetic control of plastid division in higher plants // Am. J. Bot. 1997. Vol. 84. P. 1017—1027.

Rapp J.C., Baumgartner B.J., Mullet J. Quantitative analysis of transcription and RNA levels of fifteen chloroplast genes //J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 21404—21411.

Reddy M.K., Choudhury N.R., Kumar D. et al. Characterization and mode of replication of pea chloroplast *OriA* sequences // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 220. P. 933—941.

Reinbothe S., Reinbothe C., Heintzen C. et al. A methyl jasmonate — induced shift in the length of 5'untranslated region impairs translation of the plastid *rbcL* transcript in barley // EMBO J. 1993. Vol. 12. P. 1505—1512.

Rochaix J.-D. Post- transcriptional steps in the expression of the chloroplast genes // Annu. Rev. Cell Biol. 1992. Vol. 8. P. 1—28.

Rochaix J.-D. Chlamydomonas reinhardtii as the photosynthetic yeast // Annu. Rev. Genet. 1995. Vol. 29. P. 209—230.

Rochaix J.-D., Malnoe P. Anatomy of the chloroplast ribosomal DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* // Cell. 1978. Vol. 15. P. 661—670.

Rodermel S., Haley J., Jiang C.Z. et al. A mechanism for the intergenomic integration: abundance of ribulose bisphoshate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 3881—3885.

Ruf S., Kössel H. Occurence and spacing of ribosome recognition sites in mRNA of chloroplasts of higher plants // FEBS Lett. 1988. Vol. 240. P. 41—44.

Sager R., Sano H., Grabowy C.T. Control of maternal inheritance by DNA methylation in *Chlamydomonas* // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1984. Vol. 108. P. 157—162.

Schrubar H., Wanner G., Westhoff P. Transcriptional control of plastid gene expression in greening *Sorghum* seedlings // Planta. 1990. Vol. 183. P.101—106.

Schuster G., Bock R. Editing, polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast // Regulatory Aspects of Photosynthesis (in press).

Sears B.B., Stoike L., Chiu W.-L. Proliferation of direct repeats near the *Oenothera* chloroplast DNA origin of replication // Mol. Biol. Evol. 1996. Vol. 13, No. 6. P. 850—863.

Shen Y., Danon A., Christopher D.A. RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast psbA mRNA 52 untranslated region in a redox-dependent manner // Plant Cell Physiol. 2001. Vol. 42, No. 10. P. 1071—1078.

Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M. et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 2043—2049.

Silhavy D., Maliga P. Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the iojap maize mutant // Curr. Genet. 1998. Vol. 33. P. 340—344.

Smart C.J., Moneger F., Leaver C.J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower // Plant Cell. 1994. Vol. 6. P. 811—825.

Stampacchia O., Girard-Bascou J., Zanasco J.L. et al. A nuclear-encoded function essential for translation of the chloroplast *psaB* mRNA in *Chlamydomonas* // Plant Cell. 1997. Vol. 9. P.773—782.

Staub J.M., Maliga P. Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids // Plant J. 1994. Vol. 6. P. 547—553.

Staub J.M., Maliga P. Expression of the chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNA are efficiently translated in tobacco plastids // Plant J. 1995. Vol.7. P. 845—848.

Stern D.B., Higgs D.C., Yang J. Transcription and translation in chloroplasts // Trends Plant Sci. 1997. Vol. 2. P. 308—315.

Sugita M., Sugiura M. Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants // Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 32. P. 315—326.

Sugiura M. The chloroplast genome // Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 19. P. 149—168.

Tan S., Troxler R.F. Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays:* photoregulation and differential expression // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96, No.9. P. 5316—5321.

Tanaka K., Oikawa K., Ohta N. et al. Nuclear encoding of a chloroplast RNA polymerase sigma subunit in a red alga // Science. 1996. Vol. 272. P. 1932—1935.

Taniguchi M., Kuroda H., Satoh K. ATP-dependent protein synthesis in isolated pea chloroplasts // FEBS Lett. 1993. Vol. 317. P. 57—61.

Tewari K.K. Replication of plant organelle DNA // DNA replication in plants. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1988. P. 69—116.

Thompson J.A. Apparent identity of chromoplast and chloroplast DNA in the daffodil *Narcissus pseudonarcissis* // Z. Naturforch. 1980. Vol. 356. P. 1101—1103.

Thompson M.D., Zhang L., Hong L., Hallick R.B. Two new group-II twintrons in the *Euglena gracilis* chloroplast are absent in basally branching Euglena species // Curr. Genet. 1997. Vol. 31, No. 1. P. 89—95.

Thomson W.W., Whatley J.M. Development of non-green plastids // Annu. Rev. Plant Physiol. 1980. Vol. 31. P. 375—394.

Tiller K., Eiserman A., Link G. The chloroplast transcription apparatus from mustard (*Sinapsis alba* L.). Evidence for three different translation factors which resemble bacterial σ factors // Eur. J. Biochem. 1991. Vol. 198. P. 93—99.

Vera A., Sugiura M. Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter // Curr. Genet. 1995. Vol. 27. P. 280—284.

Vogel J., Hubschmann T., Borner T., Hess W.R. Splicing and intron-internal RNA editing of trnK-matK transcripts in barley plastids: support for MatK as an essential splice factor // J. Mol. Biol. 1997. Vol. 270, No. 2. P. 179—187.

Wada T., Tunoyama Y., Shiina T., Toyoshima Y. In vitro analysis of light-induced transcription in the wheat psbD/C gene cluster using plastid extracts from dark-grown and short-termilluminated seedlings // Plant Physiol. 1994. Vol. 104. P. 1259—1267.

Westhoff P., Herrmann R.G. Complex RNA maturation in chloroplasts: the *psbB* operon from spinach // Eur. J. Biochem. 1988. Vol. 171. P. 551—564.

Wollman F.A., Minai L., Nechushtai R. The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1411. P. 21—85.

Wostrikoff K., Choquet Y., Wollman F.-A., Girard-Bascou J. TCA1, a single nuclear-encoded translational activator specific for *petA* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast // Genetics. 2001. Vol. 159. P. 119—132.

Zerges W. Translation of mRNAs encoded by chloroplast genomes // Biochimie. 2000. Vol. 82. P. 583—601.

Zerges W., Rochaix J.D. Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Cell Biol. 1998. Vol. 140. P. 101—110.

Глава 4

Митохондриальный геном растений — организация и экспрессия

ВПЕРВЫЕ генетические структуры в митохондриях были обнаружены в начале 60-х годов: удалось увидеть нити, дающие окрашивание с ДНК-красителями [Naas, Naas, 1963a], которые разрушались нуклеазами [Naas, Naas, 1963b]. ДНК была также выявлена в митохондриях *Neurospora* [Luck, Riech, 1964]. Дальнейшие исследования показали, что мтДНК основных систематических групп эукариот — простейших, растений, грибов и животных, несмотря на ряд общих свойств, значительно отличаются друг от друга. Митохондриальные геномы животных и высших растений различаются не только по размеру, но и по своей организации. Тем не менее указанные геномы почти идентичны по информационной емкости. В настоящее время расшифрованы ДНК-последовательности ряда митохондриальных геномов водорослей и наземных растений — низшего *Marchantia polymorpha* [Oda et al., 1992] и высших — *Arabidopsis* [Unseld et al.,1997] и *Beta vulgaris* [Kubo et al., 2000]. В данной главе мы рассмотрим структуру и функционирование митохондриального генома растений.

Организация молекул митохондриальной ДНК растений

Митохондриальная ДНК высших растений составляет чаще всего менее 1% тотальной ДНК, однако в исключительных случаях (например, клетки гипокотиля дыни) достигает 15% [Leaver, Gray, 1982].

Изучение митохондриальной ДНК растений проводилось первоначально физическими методами — центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия и анализом кинетики ренатурации. Плавучая плотность мтДНК оказалась примерно одинакова у самых разных видов: 1,705—1,707 г/см^3, что соответствовало 48% содержания ГЦ-пар [Wells, Ingle, 1970; Kolodner, Tewari, 1972; Vedel, Quetier, 1974]. Несмотря на сходство ГЦ-состава митохондриальных геномов, кинетические характеристики их весьма изменчивы. Так, в одном и том же семействе *Cucurbitaceae* обнаружены виды, различающиеся по размеру молекул более чем в 7 раз: от 330 т.п.н. у арбуза до 2500 т.п.н. у дыни [Ward et al.,1981]. Вообще размер митохондриального генома растений колеблется от 180 до 2500 т.п.н. [Ward et al., 1981; Newton, 1988; Levings, Brown, 1989; Hanson, Folkerts, 1992; Lonsdale, Grienberger, 1992].

Электронномикроскопические исследования митохондриальной ДНК, проведенные в 70—80-е годы, выявили как кольцевые, так и линейные мо-

лекулы в различных соотношениях. Длина молекул митохондриальной ДНК у разных видов изменялась от 0,5 до 42 мкм [Quetier, Vedel, 1977; Levings et al., 1979; Brennicke, 1980]. У ряда видов были описаны дискретные размерные классы молекул ДНК [Kolodner, Tewari, 1972; Levings et al., 1979; Dale et al., 1981].

Первоначально предполагалось, что нативная ДНК митохондрий растений по аналогии с мтДНК животных представляет собой кольцевую молекулу, включающую весь комплекс генов, а обнаруживаемые более мелкие линейные молекулы — результат повреждения ДНК в процессе приготовления препарата для микроскопии. Правда, объяснить таким же образом наличие кольцевых молекул меньшего размера представляется затруднительным. Дальнейшее детальное электронномикроскопическое изучение ДНК выявило многообразную картину [Bailey-Serres et al., 1987]. Всего в двух случаях удалось обнаружить кольцевые молекулы митохондрий наземных растений, которые по размеру соответствуют полному геному: у *Marchantia polymorpha* [Oda et al., 1992] и *Vicia faba* [Negruk et al.,1986]. У кукурузы было найдено несколько крупных кольцевых субгеномных молекул [Levings et al., 1979]. Два класса крупных кольцевых молекул мтДНК — 128 и 140 т.п.н. выявлены у *Chenopodium album* [Backert et al.,1996]. Большинство исследователей находили значительное количество кольцевых молекул мтДНК намного меньшего размера, чем предполагаемый геном (табл. 4.1). В ряде случаев обнаруживались линейные молекулы различной длины, в том числе иногда превосходящие длину мтДНК данного вида, определенную другими методами [Backert et al., 1996, 1997].

Картина еще более усложнилась после обнаружения наряду с гетерогенными популяциями кольцевых и линейных молекул также молекул с взаимозамкнутыми кольцами (катенированных), линейных с одним или более разветвлением и сложных розеткообразных молекул [Dudareva et al., 1988; Wang et al., 1989; Backert et al.,1996, 1997]. Эти молекулы включают до 50 петель ДНК с одним или более центром. При мягком лизисе митохондрий *Beta vulgaris* такие розеткообразные молекулы составляют большинство [Dudareva et al., 1988]. Не исключено, что эти структуры представляют собой фрагменты митохондриального ДНК-мембранного комплекса, подобного нуклеоидам. Поскольку молекулярный вес некоторых из этих розеток превышал у *Chenopodium album* 750 т.п.н., возможно, они состоят более чем из двух копий гипотетической главной (master) хромосомы или различных субгеномных и линейных молекул, объединенных в единую структуру в результате рекомбинаций. Такие розеткоподобные структуры, возможно, связанные с мембранами, могут обеспечивать успешную передачу митохондриального генома дочерним клеткам [Backert et al.,1997].

Таблица 4.1

Митохондриальные ДНК растений разных видов покрытосеменных, по данным электронномикроскопических исследований [по Backert et al., 1997]

Виды	Наблюдаемые размеры — диапазоны и классы (т.п.н.)[а]		Установленный размер (т.п.н.) основного кольца[б]	Источник
	кольцевые молекулы	линейные молекулы		
Beta vulgaris	0,06—0,16; 0,6—2,4; 3,1—31; 62—496	Не определены	386[в]	Dudareva et al., 1988
Brassica campestris	30—45	20—160 Три класса: 30, 60, 90	218[в]	Scissum-Gunn et al., не опубл.
B. hirta	30—45	20—160 Три класса: 30, 60, 90	208[в]	Scissum-Gunn et al., не опубл.
Chenopodium album	0,1—183 (также 1,3—18,7 т.п.н. однонитчатые кольца) Большие кольца: 128 и 140	0,1—783	270[г]	Backert et al., 1996, 1997
Citrus sinensis, C. reticulata	0,9—143,4 (в основном 0,9—62)	1—69,2	Не определен	Fontarnau, 1982
Datura inoxia	1—51	1,3—90	310[г]	Bailey-Serres et al., 1987
Соя	0,1—9,3	Не определены	392[г]	Synenki et al., 1978
Linum usitatissum	1—104	Не определены	339[г]	Bailey-Serres et al., 1987
Marchantia polymorpha	184,4	Не определены	186,6 (данные сиквенса)	Oda et al., 1992
Nicotiana plumbaginifolia	Не обнаружено	9,6; 22; 34,7; 43,7; 56,2; 71,8	Не определен	Manna et al., 1985
Табак	1,5—130 Классы: 6; 10; 29,5	Не определены	236[г]	Sparks, Dale, 1980
Табак	<3,1	Не определены	315[г]	Bailey-Serres et al., 1987
Oenothera berteriana	90—100	1—100	200[г]	Brennicke, 1980
Рис	1—96	1—156	300[г]	Wang et al., 1989
Pennisetum typhoides	Большие кольца: 39,4 и 51,8	5—130	Не определен	Kim et al., 1982

Продолжение табл.4.1

Виды	Наблюдаемые размеры — диапазоны и классы (т.п.н.)[а]		Установленный размер (т.п.н.) основного кольца[б]	Источник
	кольцевые молекулы	линейные молекулы		
Petunia hybrida	3—91	3—136	288[г]	Kool et al.,1985
P. hybrida	1—36	Не определены	267[г]	Bailey-Serres et al., 1987
Phaseolus aureus	1—126	Не определены	326[г]	Bailey-Serres et al., 1987
Горох	9,3—15,5 Большие кольца: 94 и 196	6,2—83,7	Не определен	Kolodner, Tewari, 1972
Vicia faba	3,5—12; 18—34; 37—80 Большие кольца: 135; 154;167; 184; 300	Не определены	290[г]	Negruk et al., 1986
V. faba	1—57	Не определены	260[г]	Bailey-Serres et al., 1987 Wahleithner et al., 1988
Кукуруза	12,4—31 Большие кольца: 46,5; 65; 93 и 127	Не определены	570[в]	Levings et al., 1979

[а] Диапазон изменения величины; большие кольца — наблюдаются единичные или несколько крупных молекул указанных размеров; сложные молекулы обычно не наблюдались, за исключением *Beta vulgaris* (розетки 403—496), *Chenopodium album* (разветвленные и розетки 4—750), *Citrus sinensis* и *C. reticulata* (розетки), *Oenothera berteriana* (90—100), *Pennisetum typhoides* (розетки); для *Marchantia polymorpha* определение не проводилось.

[б] Субгеномные кольца обычно не определялись, кроме *Beta vulgaris* (129, 145, 146, 241 и 366), *Brassica campestris* (83 и 135) и кукурузы (47, 67, 82, 94, 114, 129, 134, 250, 253, 456, 488 и 503); у *B. hirta* и *Marchantia polymorpha* субгеномные кольца не обнаружены.

[в] Данные геномного картирования. У кукурузы было описано несколько других сортов с различными размерами митохондриальных геномов.

[г] Данные вычислены на основании размеров рестриктных фрагментов. Для некоторых видов было описано несколько сортов со слегка различающимися размерами митохондриальных геномов.

Чрезвычайно информативным на определенной стадии изучения митохондриальных геномов оказался *метод эндонуклеазной рестрикции*, позволивший построить физические карты мтДНК для многих видов (табл. 4.1).

Митохондриальные ДНК, обработанные тем или иным ферментом эндонуклеазной рестрикции, подвергали электрофоретическому разделению в агарозном геле. Суммируя молекулярную массу отдельных фрагментов

мтДНК, можно определить предполагаемые размеры митохондриальных геномов [Quétier, Vedel, 1977]. При этом обнаружилось, что многие фрагменты митохондриального генома имели бóльшую интенсивность свечения в УФ при окрашивании этидий бромидом, что указывало на наличие дупликаций отдельных участков мтДНК. Эти факты в сочетании с анализом кинетики реассоциации и данными электронной микроскопии позволили создать первую модель структуры небольшого по размеру митохондриального генома *Brassica campestris* [Palmer, Shields, 1984]. МтДНК данного вида существует в виде кольцевых молекул трех типов: полного генома — 218 т.п.н. и двух субгеномных колец — 135 и 83 т.п.н. Субгеномные кольца образуются при рекомбинации по паре повторов размером 2 т.п.н., имеющихся в митохондриальном геноме *B. campestris* (рис. 4.1).

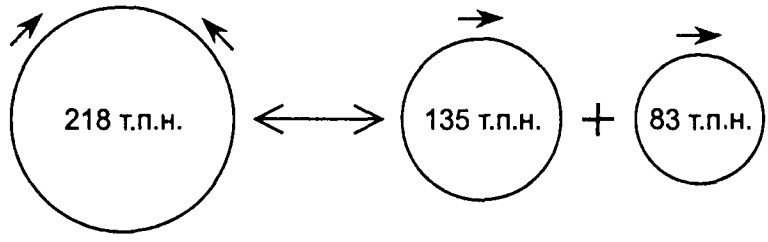


Рис. 4.1. Модель структуры митохондриального генома *Brassica campestris*, состоящего из трех колец: полный геном 218 т.п.н. и два малых кольца, возникающих при гомологичной рекомбинации по двум повторам главного кольца (указаны стрелками) [по Andre et al.,1992]

Большие рекомбинационные повторы. В дальнейшем рекомбинационные повторы, как прямые, так и инвертированные, были обнаружены практически во всех изученных митохондриальных геномах растений, за исключением *Brassica hirta* [Palmer, Herbon, 1987] и *Marchantia polymorpha* [Oda et al., 1992]. Две пары рекомбинационных повторов у *Arabidopsis* имеют размер соответственно 6,5 и 4,2 т.п.н. [Klein et al., 1994]. У кукурузы найдено пять прямых рекомбинационных повторов и один инвертированный размером 14 т.п.н. [Lonsdale et al., 1983]. Одним из наиболее сложных по структуре оказался митохондриальный геном пшеницы, содержащий 10 рекомбинационных повторов [Quétier et al., 1985]. Очевидно, что при таком количестве повторяющихся участков число возможных субгеномных колец в результате рекомбинаций теоретически может быть огромным. Естественно, это затруднило построение рестриктной карты мтДНК пшеницы, однако интенсивная работа группы исследователей все же привела к успеху [Quétier et al., 1985; Lejeune, Quétier, 1988]. Отметим, что кольцевую молекулу мтДНК размером в 430 т.п.н. (именно таков размер мтДНК пшеницы по данным Quétier и соавторов) при электронномикроскопических исследованиях никто не наблюдал; возможно, в таком виде она не существует *in vivo* [Bonen, 1995].

Большинство повторов имеют размер от 1 до 10 т.п.н., наименьший из известных — 266 п.н. [Hanson, Folkerts, 1992]. Два митохондриальных генома содержат необычно протяженные повторы — фертильный ревертант кукурузы с Т-типом ЦМС (165 т.п.н.) [Fauron et al., 1990] и ЦМС-форма петунии (252 т.п.н.) [Folkerts, Hanson, 1991].

Не все повторяющиеся последовательности в мтДНК способны рекомбинировать. Так, не удалось обнаружить рекомбинации с участием двух *atp9* генов у *Petunia hybrida* и *Raphanus sativa*, не рекомбинирует и ряд других повторов [Hanson, Folkerts, 1992]. Чем отличаются рекомбинационные повторы от нерекомбинационных, пока неясно. Секвенирование некоторых повторов, проведенное у кукурузы (5,27 т.п.н.) [Houchins et al.,1987] и гороха [Morikami, Nakamura, 1987], не выявило никаких доказательств кодирования этими повторами собственных рекомбиназ. Возможно существование каких-то особых последовательностей-мишеней в таких повторах, но и они до сих пор не найдены [Hanson, Folkerts, 1992]. В главе 9 продолжено обсуждение механизмов рекомбинации митохондриальных ДНК.

Малые повторы. При анализе секвенированных мтДНК наряду с большими обнаруживаются малые повторы. Их величина колеблется от 6—7 до нескольких сот нуклеотидов [Andre et al., 1992]. У пшеницы, например, короткие повторы разбросаны по всему митохондриальному геному. Предполагают, что некоторые из них могут возникать через РНК-посредников [Bonen, 1995]. Во множестве геномных сайтов были найдены последовательности, аналогичные участкам тРНК генов, так называемые "t-элементы"; локализация этих элементов около активно функционирующих генов привела к предположению об их роли в генной экспрессии [Joyce et al., 1988; Spencer et al., 1992]. тРНК-подобные структуры выявлены также в $O_н$ сайтах мтДНК у нескольких видов млекопитающих (см. главу 6).

Малые повторы, возможно, участвуют в редких рекомбинациях, приводящих к различиям в митохондриальных геномах близкородственных видов, к мутациям и образованию химерных генов [Hanson, Folkerts, 1992; Bonen, 1995, Backert et al., 1997]. На рис. 4.2 представлена модель, объясняющая появление с помощью малых повторов делеций, дупликаций и больших повторов [Small et al., 1989].

Редкими рекомбинациями с участием малых повторов скорее всего можно объяснить наличие так называемых "сублимонов" — класса молекул, встречающихся в митохондриях растений с чрезвычайно низкой частотой. Сублимоны рассматривают как возможный резерв для эволюционных преобразований митохондриальных геномов при изменении внешних условий [Small et al., 1989]. Интересно, что некоторые из сублимонов, обнаруженных в мтДНК растений *Brassica,* в культуре клеток *in vitro* встречаются уже с

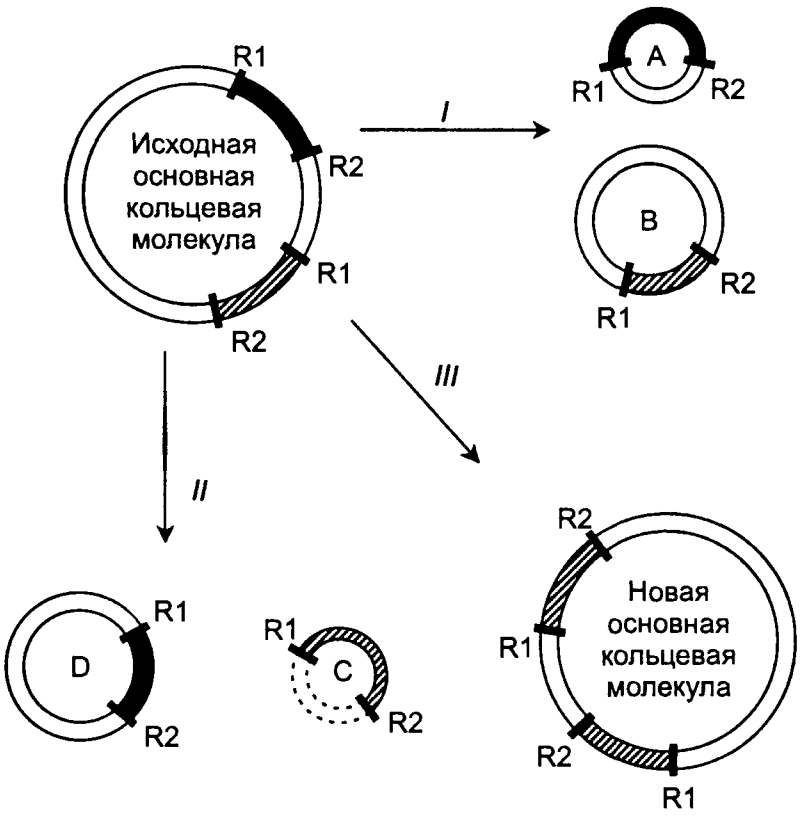


Рис. 4.2. Модель образования большого повтора с помощью малых повторов в мтДНК растений. Два независимых гомологичных рекомбинационных события (*I* и *II*) по двум парам малых повторов (R1 и R2) дают начало четырем субгеномным кольцевым молекулам (A,B,C,D). Две из этих молекул (B и C) могут рекомбинировать (*III*), используя общую последовательность (заштрихована), и дать начало новой основной кольцевой молекуле, имеющей большой повтор и большую делецию (зачерненная в исходной молекуле) [по Small et al., 1989]

гораздо большей частотой. Это говорит об их стабилизации и амплификации в измененных условиях [Shirzadegan et al., 1989].

Какова организация митохондриальной ДНК внутри органеллы? Если ее определяет процесс рекомбинации, тогда мтДНК должна представлять собой сеть молекул, удерживающихся вместе с помощью "Holliday" комплексов, как это происходит у дрожжей [Sena et al., 1986]. Вопрос этот мало изучен, даже количество молекул мтДНК, приходящихся на одну органеллу, у растений почти не исследовалось. Представляется загадкой, как в случае такой сложной многокомпонентной структуры она наследуется в дочерние клетки и сохраняется в течение многих поколений. Тем не менее наследование мтДНК в поколениях происходит, о чем говорят неизменные рестриктные спектры растений [Lonsdale, Grienenberger, 1992]. Однако при резком изменении условий, например в культуре тканей, может происходить дестабилизация митохондрий, в результате чего может утрачиваться или преобразовываться значительная часть их генома [Rode et al., 1987; Grayburn, Bendich, 1987]. Возможно также, что реорганизация митохондриального генома при изменении внешних условий имеет некий адаптационный смысл.

Митохондриальные плазмиды

В митохондриях многих культурных растений — кукурузы, сорго, бобов и др. — были обнаружены малые линейные и кольцевые ДНК и/или РНК молекулы, не гомологичные геномной мтДНК и названные митохондриальными плазмидами [Kemble, Bedbrook, 1980; Dale et al., 1981; Palmer et al., 1983; Schardl et al., 1984]. Их отличительной особенностью является способность к автономной репликации, которая обусловливает весьма непостоянное количество таких плазмид. Размеры плазмид колеблются от 1 до 30 т.п.н. [Lonsdale, Grienenberger, 1992]. Их не следует путать с малыми субгеномными молекулами, которые при определенных условиях путем рекомбинации могут выщепляться из митохондриальной хромосомы или встраиваться в нее. Было показано, что кольцевые молекулы 10 т.п.н. в культуре клеток табака W38 появляются только при старении культуры и гомологичны участку митохондриального генома, т.е. являются субгеномными кольцами, а не плазмидами [Dale et al., 1983]. Даже активно реплицирующиеся малые кольцевые молекулы, обнаруженные в митохондриях *Oenothera in planta* [Brennicke, Blanz, 1982], не являются плазмидами, поскольку возникли путем рекомбинации с геномной молекулой мтДНК.

Обладая уникальной ДНК- или РНК-последовательностью, митохондриальные плазмиды, вероятно, произошли из других клеточных геномов, а возможно, и из других организмов. Плазмиды крайне редко содержат какие-либо органельные гены [Brown, Zhang, 1995]. Значение этих ДНК-структур во многом остается спорным, их иногда относят к так называемой общей (promiscuous) ДНК и делят на три основные категории: кольцевые ДНК-плазмиды, линейные ДНК-плазмиды, РНК-плазмиды [Lonsdale, Grienenberger, 1992].

Кольцевые ДНК-плазмиды. Небольшие кольцевые двунитчатые молекулы ДНК обнаружены у кукурузы, свеклы, фасоли, подсолнечника, сорго, риса и некоторых других растений [Lonsdale, Grienenberger, 1992]. Иногда в митохондриях обнаруживается более одного типа плазмид, при этом разные плазмиды могут не иметь гомологичных последовательностей. Так, у риса плазмида B4 (969 п.н.) не имеет гомологии с плазмидами B1, B2 и B3 [Shikanai et al., 1989]. В других случаях плазмиды могут обмениваться участками в результате кроссинговера, а также меньшая молекула может быть следствием делеции более крупной. Вероятно, именно таким образом плазмида 1540 т.п.н. в случае ЦМС-350 цитоплазмы *Vicia faba* образовалась из плазмиды 1740 т.п.н. [Wahleithner, Wolstenholme, 1987].

У плазмид не найдено ни длинных открытых рамок считывания, ни определенной вторичной структуры, что говорило бы в пользу каких-то регуляторных функций этих молекул [Lonsdale, Grienenberger, 1992].

Ни в одном из изученных случаев двунитчатые плазмиды не гомологичны ни высокомолекулярным мтРНК, ни хлоропластным ДНК. Для некоторых, но не всех плазмид была установлена их гомология с ядерными ДНК. Не исключено, что плазмиды могут иметь нерастительное происхождение [Lonsdale, Grienenberger, 1992].

Далеко не все плазмиды транскрибируются, для тех же, которые подвергаются транскрипции, не показано связи их мРНК с какими-либо длинными ORF. Наконец, плазмиды могут утрачиваться без каких-то видимых последствий для растений [Hallden et al.,1989]. Все эти факты свидетельствуют о том, что кольцевые плазмиды не являются необходимым компонентом митохондрий растительной клетки.

Линейные ДНК-плазмиды. Цитоплазматические линейные ДНК-плазмиды представляют уникальную группу репликонов. Они обычно локализуются в митохондриях, имеют высокий процент АТ-пар и терминальные инвертированные повторы (TIR). 5′-фосфат TIR, как правило, ковалентно связывается с аминокислотными остатками — серином, треонином или тирозином. Гидроксильные группы этих аминокислот участвуют затем в 3′-гидроксил прайминге (priming) ДНК-полимеразой, что делает возможным замену ДНК-нитей во время репликации по механизму, аналогичному аденовирусному [Salas, 1983].

Линейные ДНК-плазмиды S и R кукурузы и D-элементы *Zea diploperennis* способны интегрироваться в митохондриальный геном, в котором имеются последовательности, гомологичные TIR. Хотя структура митохондриальной ДНК при этом нарушается, последствия не выражены [Schardl et al., 1984; Lonsdale, Grienenberger,1992].

Полный сиквенс ряда плазмид выявил гомологию некоторых последовательностей с вирусными РНК-полимеразами [Oeser, 1988].

РНК-плазмиды. Данный тип плазмид является наименее изученным. РНК-плазмиды обнаружены в митохондриях сахарной свеклы [Powling, 1981], кукурузы [Sisco et al., 1984], *Brassica* [Kemble et al., 1986] и риса [Wang et al.,1989]. Они имеют ограниченное распространение и встречаются только в определенных цитоплазмах. Самые крупные РНК-плазмиды обнаружены у риса — 18 т.п.н. [Lonsdale, Grienenberger, 1992].

Четыре типа РНК молекул найдены у кукурузы — два вида двунитчатых (2850 и 900 п.н.) и два однонитчатых такой же протяженности. Соотношение одно- и двунитчатых молекул варьировало в различных цитоплазмах: в LBN встречались преимущественно двунитчатые, а в S- и RU-цитоплазмах — в основном однонитчатые. Ряд данных указывает на то, что однонитчатые РНК-плазмиды в данном случае являются транскриптами или промежуточными репликативными формами двунитчатых: они гибридизуются с

двунитчатыми и комигрируют в геле с денатурированными при высокой температуре двунитчатыми молекулами [Finnegan, Brown, 1986]. РНК-плазмиды не выявляли гомологии ни с митохондриальной ДНК, ни с S1- либо S2-плазмидами кукурузы; их репликация и транскрипция в изолированных митохондриях не угнеталась при добавлении актиномицина D [Finnegan, Brown, 1986], что указывало на участие в этих процессах РНК-зависимой РНК-полимеразы вирусного типа [Reisner, Gross, 1985].

РНК-плазмиды остальных видов изучены значительно хуже. Происхождение РНК-плазмид неясно. Возможно, они являются криптическими вирусами или реликтами прошлых инфекций, в результате которых сохранился весь РНК геном патогена или его часть [Dodds et al., 1984].

Репликация митохондриального генома растений

Репликация митохондриального генома достаточно хорошо изучена у дрожжей и позвоночных животных (см. далее главы 5 и 6), чего нельзя сказать в отношении растений, у которых этот процесс почти не исследован. Это связано как с рядом методических трудностей при выделении мтДНК растений, так и с большой изменчивостью размера митохондриального генома у растений, иногда на два порядка превышающего таковой у позвоночных [Backert et al., 1996].

В исследованиях *in vitro* была показана частичная структурная гомология участков мтДНК петунии с точками начала репликации H- и L-цепей мтДНК млекопитающих (см. главу 6) [de Haas et al., 1991], однако не доказано, что эти участки действительно являются точками начала репликации *in organello*.

Митохондриальную ДНК культуры клеток табака метили [^{3}H]-тимидином и разделяли при пульс-электрофорезе, при этом метка обнаруживалась преимущественно в мембранно-связанной фракции и лишь позднее появлялась во фракции высокоподвижных линейных ДНК-молекул [Oldenburg, Bendich, 1996].

Из очищенных митохондрий зародышей пшеницы удалось выделить связанный с мембранами высокомолекулярный комплекс, участвующий в синтезе мтДНК. Этот комплекс включает в себя ДНК- и РНК-полимеразы и топоизомеразу типа 1. Изотопные исследования выявили участок митохондриального генома, вовлеченный в связывание мтДНК с мембраной при ДНК-синтезе [Echeverria et al., 1991], вероятно, аналогично тому, как происходит инициация репликации у бактерий [Bonen, 1995].

Теоретически возможны два способа репликации мтДНК растений: либо реплицируется основное геномное кольцо, а субгеномные молекулы обра-

зуются затем путем рекомбинаций, либо субгеномные молекулы могут содержать точки начала репликации и реплицироваться самостоятельно [Backert et al., 1996].

При электронномикроскопическом исследовании мтДНК суспензионной культуры и целых растений *Chenopodium album* обнаружена гетерогенная популяция, включающая линейные молекулы (56 — 80% общего числа молекул), линейные молекулы с ответвлениями (0,2 — 1,5 %), розеткоподобные структуры (4 — 16%) и открытые кольца (субгеномные молекулы 13 — 26%), среди которых были кольца с линейными хвостами, так называемые сигмоподобные молекулы [Backert et al., 1995]. Анализ 20 тысяч индивидуальных молекул ДНК показал, что наиболее вероятным способом репликации мтДНК *Chenopodium,* по мнению авторов, является репликация по типу катящегося кольца. Поскольку сигмоподобные молекулы обнаружены также в препаратах мтДНК других видов, логично предположить, что такой тип репликации может быть характерен для митохондрий высших растений [Backert et al., 1996].

Гены митохондрий

Исследования митохондриального генома растений, проведенные первоначально методом гибридизации, показали, что большая часть геномных последовательностей изменчива, не кодирует никаких белков и часто уникальна для определенного вида. Другая часть генома — консервативные, или основные, последовательности — содержит набор митохондриальных генов (табл. 4.2, 4.3).

Первый секвенированный растительный митохондриальный геном — печеночника *Marchantia polymorpha* — содержит по крайней мере 94 открытые рамки считывания. Функция 66 из них в настоящее время установлена

Таблица 4.2

Набор митохондриальных тРНК у разных видов растений*
[по Marienfeld et al., 1999]

Источник	*Arabidopsis thaliana*	*Marchantia polymorpha*	*Solanum tuberosum*	*Vicia faba*	*Helianthus annuus*	*Petunia hybrida*	*Triticum aestivum*	*Zea mays*
Митохондрии	12	29	25	н.о.	11	12	9	10
Хлоропласт	6	0	5	н.о.	6	5	6	6
Ядро	13	2	11	>8	н.о.	н.о.	>3	н.о.

Примечание. н.о. — не определялось.

* Около трети митохондриально кодируемых тРНК генов в действительности произошли из хлоропластных генов, интегрированных в митохондриальный геном.

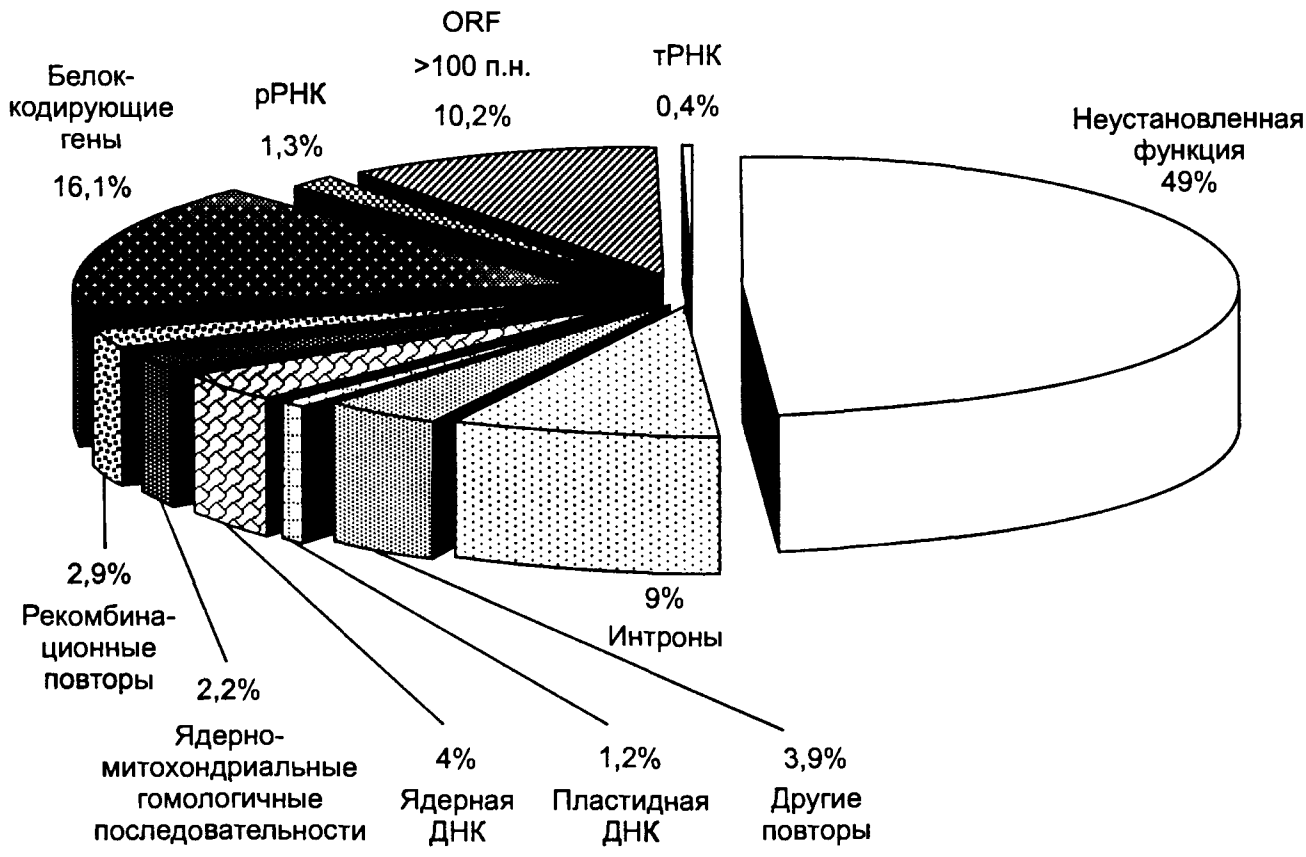


Рис. 4.3. Митохондриальный геном *Arabidopsis* [по Marienfeld et al., 1999]. Некоторые ядерно-митохондриальные гомологии, вероятно, являются результатом переноса из мтДНК в ядро. Интроны — исключительно группы II. Неустановленные последовательности не имеют явного сходства ни с одной идентифицированной последовательностью в базах данных (GenBank release 111.0; PIR-Protein release 60.0; SWISS-PROT release 37.0)

[Oda et al.,1992]. Секвенированный через семь лет митохондриальный геном покрытосеменного растения *Arabidopsis* имеет размер 367 т.п.н. и содержит 58 генов; для 49% последовательностей мтДНК функция не установлена (рис. 4.3) [Unseld et al.,1997].

Митохондриальный геном сахарной свеклы состоит из 368,799 т.п.н., в его составе выявлено 59 генов; в то же время функция более 55% последовательностей в геноме *Beta vulgaris* неясна [Kubo et al., 2000]. Несколько большее число генов, чем у высших растений, обнаружено в митохондриальной ДНК зеленой водоросли *Prototheca wickerhamii* — 63 гена [Wolff et al., 1994].

Все найденные у растений митохондриальные гены относятся к нескольким группам: гены рибосомальные, гены тРНК, гены комплексов I — IV. До 7% всего митохондриального генома у *Arabidopsis* и до 10% у *B.vulgaris* составляют повторяющиеся последовательности [Marienfeld et al., 1999; Kubo et al., 2000].

Гены митохондриальных белков рибосом. Большинство генов этой группы идентифицировано благодаря их сходству с соответствующими бакте-

риальными генами, что указывает на прокариотическое происхождение митохондрий и подробнее обсуждается в главе 7.

У *Marchantia polymorpha* 16 митохондриальных генов кодируют рибосомальные белки, тогда как у *Arabidopsis* — только 8. Гены *rps1, rps2, rps8, rps10, rps11, rps13, rps19* и *rpl16* у *Arabidopsis* отсутствуют [Marienfeld et al., 1999]. У других покрытосеменных, таких, как *Zea mays, Petunia hybrida, Oenothera berteriana,* три гена — *rps19, rps3* и *rpl16* — образуют кластер, гены которого котранскрибируются [Schuster, Brennicke, 1994]. Из этого кластера только центральный ген, *rps3,* сохранился у *Arabidopsis.* Оказалось, что ген, кодирующий RPS19, транслоцирован в ядерный геном. Митохондриальная последовательность, кодирующая RPS13, также отсутствует у *Arabidopsis,* при этом у локализованного в ядре гена *rps19* на N-конце появился РНК-связывающий мотив, который, вероятно, выполняет функцию утерянного *rps13* [Marienfeld et al., 1999]. Отсутствующий у *Arabidopsis* ген *rps13* обнаружен в мтДНК *Beta vulgaris* [Kubo et al., 2000].

ДНК-последовательность, кодирующая белок RPS14, переместилась у *Arabidopsis* в ядерный геном [Aubert et al., 1992]. В митохондриальном геноме *Arabidopsis* также отсутствует фрагмент гена *rpl2.* Вероятно, после разделения гена на фрагменты отсутствующая часть была перенесена в ядро. Интересно, что у других видов ген *rpl2* также разделен на две части, однако обе они находятся в митохондриальном геноме в виде отдельных ORF [Schuster, Brennicke, 1994].

Гены транспортных РНК митохондрий. Митохондриальный геном растений не содержит достаточного количества тРНК для синтеза белков — часть тРНК экспортируется из ядра [Lonsdale, Grienenberger, 1992].

У *Arabidopsis* при анализе секвенированного генома выявили 22 классические структуры "клеверный лист", характерные для тРНК. Из них 18 оказались различными тРНК и 4 — дуплицированными копиями [Marienfeld et al., 1999]. Дальнейший анализ показал, что 12 тРНК генов являются исконно митохондриальными последовательностями, а 6 тРНК генов у *Arabidopsis* имеют пластидное происхождение. Следует отметить, что из всех пластидных последовательностей, которых достаточно много в митохондриях, только тРНК гены успешно транскрибируются [Brennicke et al., 1993].

Имеющихся в митохондриальном геноме *Arabidopsis* и других растений генов недостаточно — тРНК для ряда необходимых аминокислот импортируются из цитоплазмы. тРНК Ala, Arg, Leu, Thr и Val кодируются вне митохондрий у всех высших растений; у *Arabidopsis,* кроме них, отсутствует еще тРНК Phe [Marienfeld et al., 1999]. Группа типичных тРНК генов в мтДНК высших растений обычно состоит из шести: Asp, Gln, Glu, Ile, Met, Tyr, однако у *Arabidopsis* тРНК Asp имеет пластидное происхождение [Marienfeld

et al., 1999]. Обычно кодируемые у покрытосеменных митохондриальными ДНК две сериновые тРНК (GCU и UGA) у подсолнечника импортируются из цитоплазмы [Kumar et al., 1996].

Данные, приведенные в табл. 4.2, показывают, что в отличие от низшего растения *Marchantia polymorpha,* в митохондрии которого импортируются всего 2 кодируемые ядром тРНК, у картофеля их уже 11, а у *Arabidopsis* 13 — больше, чем истинно митохондриальных тРНК генов. 5 или 6 генов тРНК, как правило, изначально были локализованы в пластидном геноме, а затем перенесены в мтДНК. В целом представляется удивительным, насколько резко различаются наборы тРНК, кодируемых митохондриальной ДНК и импортируемых из других компартментов клетки, у разных видов растений [Kumar et al., 1996]. В митохондриальном геноме *Beta vulgaris* всего было найдено 25 генов тРНК, причем один из них, *мРНК^{Cys} (trnC2-GCA)*, не имеет гомологии по первичной структуре ни с одним из тРНК-цистеиновых генов, обнаруженных до сих пор у высших растений [Kubo et al., 2000].

Механизм импорта тРНК в митохондрии мало изучен. Неясно, как отличаются ядерно кодируемые тРНК, предназначаемые для митохондрий, от цитоплазматических тРНК. Поскольку у разных видов набор импортируемых тРНК может различаться, в каждом конкретном случае ядерно кодируемая тРНК, чтобы попасть внутрь митохондрий, должна связываться со строго специфичным фактором. Такими специфическими митохондриальными носителями могут, вероятно, быть аминоацил-тРНК-синтетазы. Участие аланиновой тРНК-синтетазы было косвенно подтверждено в экспериментах с трансгенными растениями, несущими мутантную тРНК^{Ala}: точечная мутация в этой тРНК не только блокирует аминоацилирование, но и препятствует импорту этой тРНК в митохондрии [Hoffmann et al., 2001].

Гены рибосомальных РНК. Митохондриальные ДНК растений кодируют три вида рибосомальных РНК: 26S, 18S и 5S [Lonsdale, Grienenberger, 1992]. Некоторые виды растений, например кукуруза, содержат в митохондриальном геноме еще один ген рибосомальной РНК — 4,5S, сходный с бактериальным и вовлеченный, по-видимому, каким-то образом в секрецию белков [Yang, Mulligan, 1996]. Отсутствие 4,5S РНК гена в секвенированной мтДНК *Arabidopsis* означает либо ненужность продукта, либо перенос гена в ядро [Marienfeld et al., 1999].

У всех исследованных видов растений гены *18S* и *5S* сцеплены в один кластер и удалены от гена *26S*. Это одни из немногих сцепленных генов в митохондриальном геноме растений, для которого, как уже обсуждалось, характерна чрезвычайная структурная вариабельность. Ген *5S* рРНК только у растений локализован в митохондриальном геноме, у грибов и животных он отсутствует [Bonen, 1995].

Митохондриальные рибосомы растений крупнее хлоропластных, они имеют константу седиментации 78S, состоят из субъединиц 60S и 44S [Levings, Brown, 1989].

Гены субъединиц комплексов дыхательной цепи. В секвенированном митохондриальном геноме *Arabidopsis* обнаружены все основные субъединицы четырех комплексов дыхательной цепи и АТФ-синтетазного комплекса (табл. 4.3) — всего 18 белок-кодирующих генов. У некоторых водорослей мтДНК кодирует также еще одну субъединицу комплекса I — белок nad10, однако у *Arabidopsis* и других исследованных высших растений данный ген обнаруживается в ядре [Marienfeld et al., 1999].

Таблица 4.3

Гены, идентифицированные в митохондриальных геномах растений[1] [по Schuster, Brennicke, 1994; с дополнениями из Marienfeld et al., 1999]

Трансляционный аппарат	
Рибосомальная РНК	*rrn5, rrn18, rrn26*
Рибосомальные белки малая субъединица большая субъединица	 *rps1*, ***rps3, rps4, rps7***, *rps8*, ***rps12***, *rps13, rps14, rps19* ***rpl2, rpl5***, *rpl6*, ***rpl16***
Транспортные РНК	Не менее 16
Субъединицы комплекса дыхательной цепи	
NADH-дегидрогеназа (комплекс I)	***nad1, nad2, nad3, nad4, nad4l, nad5, nad6***, *nad7, nad9*
Сукцинатдегидрогеназа (комплекс II)	*sdh2*[2], *sdh3*[3], ***sdh4***
Цитохром *b* (комплекс III)	***cytb***
Цитохром *c* оксидаза (комплекс IV)	***cox1, cox2, cox3***
АТФ-синтаза	***atp1, atp6, atp 8, atp9***
Биогенез цитохрома *c*	*ccb206, ccb256, ccb453*, ***ccb382, ccb203***
Постоянные по составу открытые рамки считывания	***orf25***, *mat-r*[4]

Примечание. Выделенные жирным шрифтом гены найдены и у *Marchantia*, и у *Arabidopsis*.

[1] Количество генов в определенных видах растений может варьировать, один или более митохондриальных генов могут быть перенесены в ядро.

[2] Данный ген обнаружен только у красной водоросли *Chondrus*.

[3] Ген обнаружен у красной водоросли *Chondrus* и *Marchantia*, у высших пока не найден.

[4] Интрон-кодируемая открытая рамка считывания дистального интрона гена *nad1*.

Гены белков биогенеза цитохрома *c*. Четыре гена, участвующих в биогенезе цитохрома *c*, обнаружены в митохондриальной ДНК *Arabidopsis* на основе их гомологии с соответствующими бактериальными полипептидами. Как в бактериальной клетке, так и в митохондриях растений функционирует ABC-транспортная система, перемещающая гем в положение, в котором он взаимодействует с нижележащим мембранно-связанным белком CCL1 [Kranz et al., 1998]. Две субъединицы ABC-системы *Arabidopsis* кодируются митохондриальным геномом, две другие — предположительно ядерным геномом. У *Marchantia polymorpha* ген *orf453*, кодирующий одну из субъединиц, разделен на две части без потери функции [Marienfeld et al., 1999]. Мембранно-связанный белок CCLI у *Marchantia* кодируется одним геном (*orf509),* тогда как у *Arabidopsis* — двумя: *orf382* и *orf202*, которые кодируют соответственно N- и C-концы белка. Ген, кодирующий данный белок, разделен на две ORF также у масличной редьки [Handa et al., 1997], но представлен одной рамкой считывания у пшеницы и *Oenothera* [Shuster, Brennicke, 1994]. Эти данные говорят о том, что в семействе *Brassicaceae* в процессе эволюции рекомбинации митохондриального генома привели к разделению данного гена на две части без потери его функции. У *Arabidopsis* расстояние между ними составляет 24 т.п.н., и С-терминальная часть кодируется перед (upstream) N-терминальной, подтверждая, что два этих участка транскрибируются независимо [Marienfeld et al., 1999].

Другие гены митохондрий. В середине 90-х годов в митохондриях растений была обнаружена новая открытая рамка считывания (*orfx,* названная затем *mttB*), имевшая сходство с двумя перекрывающимися бактериальными генами *E.coli* [Sünkel et al.,1994]. Потеря данных генов у бактерий снижает их жизнеспособность. Изучение функции *orfx* привело к обнаружению нового транспортного пути для белков, содержащих кофакторы: связывания с мембраной и секреции (Fe-S-содержащих кластеров). Ген *mttB* кодирует одну из субъединиц такого кластера [Weiner et al., 1998]. Вероятно, гомологичный путь используется для точной локализации и сборки таких Fe-S-содержащих белковых комплексов во внутренней мембране митохондрий [Marienfeld et al., 1999].

В митохондриальном геноме *Arabidopsis,* других высших растений, а также водорослей и некоторых простейших обнаружен ген *orf25*, функция которого пока неизвестна [Leblanc et al., 1997; Gray et al., 1998].

В митохондриальной ДНК *Arabidopsis* обнаружено более 150 *orf,* состоящих из 100 и более пар нуклеотидов (см. рис. 4.3). Около 10 из них являются дупликациями и расширениями фрагментов "классических" генов митохондрий, которые находятся в интактном виде в этом же геноме. Вероятно, часть рамок считывания не несут никакой функциональной нагрузки и яв-

ляются случайными образованиями. Другие представляют собой полноценные гены, функция которых пока неясна, так как они не имеют сходства ни с одной из последовательностей мтДНК, имеющихся в банках данных [Marienfeld et al., 1999]. Для определения их роли в митохондриях необходим детальный анализ продуктов транскрипции и трансляции.

Псевдогены. Два типа псевдогенов найдено в митохондриальном геноме растений:

• дегенерировавшие копии генов, не имеющие интактной копии в мтДНК (например, *rps14* и *tRNA Phe* псевдогены);

• дегенерировавшие копии генов, имеющие полноценные аналоги в самом митохондриальном геноме (химерные гены, образованные объединением дупликации 300 нуклеотидов гена *cox2* со 180 нуклеотидами дуплицированного *rps12* и 90 нуклеотидами амплифицированного *nad6* гена [Marienfeld et al., 1999].

В первом случае отсутствие интактной копии в мтДНК может быть связано либо с переносом соответствующего гена в ядро, либо с заменой митохондриальной матрицы на соответствующую ядерную, что делает ненужным митохондриальный ген. Такая передача гена *rps14* в ядерный геном описана у *Arabidopsis*, в митохондриальном геноме остался псевдоген [Aubert et al., 1992]. У *Oenothera berteriana* мтДНК кодирует интактный ген *rps14* [Marienfeld et al., 1999].

Интроны митохондриальных генов

Первый интрон в митохондриальной ДНК растений был найден 20 лет назад в гене *cox2* кукурузы [Fox, Leaver, 1981]. МтДНК *Marchantia polymorpha* содержит 32 идентифицированных интрона, 7 из которых относятся к группе I, а 25 — к группе II, что составляет примерно 20% от всей геномной последовательности [Oda et al., 1992]. В митохондриальном геноме *Arabidopsis* обнаружено 23 интрона группы II, их размеры варьируют от 485 до 4000 нуклеотидов [Unseld et al., 1997].

Первый из открытых интронов *cox2* гена, относящийся к группе II [Michel et al., 1989], присутствует во всех мтДНК однодольных, исследованных к настоящему времени, но не во всех двудольных [Hanson, Folkerts, 1992]. Другие интроны не столь широко распространены. Два гена рибосомальных белков *rps3* и *rps10* содержат интроны группы II [Wolstenholme, Fauron, 1995].

Наибольшее количество интронов (все относятся к группе II) включают *nad* гены покрытосеменных, кодирующие субъединицы NADH-дегидроге-

назного комплекса, — так, только *nadI* ген несет 4 интрона, имеются интроны также в *nad2, nad4, nad5* и *nad7* генах. В целом, однако, интронные последовательности у высшего растения *Arabidopsis* составляют значительно меньшую часть генома, чем у низшего *Marchantia polymorpha,* — менее 9% (рис. 4.3).

Интроны группы II привлекли внимание благодаря способности осуществлять самосплайсинг (т.е. являться рибозимами), выполнять роль мобильных генетических элементов. Кроме того, они, возможно, являются предшественниками ядерных интронов. Эволюционные аспекты этой весьма изменчивой по структуре и поведению группы интронов рассмотрены в недавнем обзоре [Bonen, Vogel, 2001].

Самые маленькие из идентифицированных у растений митохондриальных интронов группы II найдены в *nad2* гене растений *Isoetes lacustris* — 389 п.н. [Malek, Knoop, 1998] и в *cox2* гене полуводного примитивного покрытосеменного растения *Acorus calamus* [Albertazzi et al.,1998].

В митохондриальных генах высших растений число интронов и их расположение обычно весьма консервативны. Однако, например, единственный интрон *cox2* гена отсутствует у крестоцветных, энотеры из семейства кипрейных, у бобовых и тыквенных [DeBenedetto et al., 1992]. *Nad4* ген большинства видов несет три интрона, но у шпината их всего два, а у подсолнечника и салата — только один [Gass et al., 1992].

Утрата интронов в геноме происходит, вероятно, с помощью обратной транскрипции зрелых матричных РНК, уже подвергшихся сплайсингу. Такая непрерывающаяся ДНК-последовательность затем встраивается в митохондриальную ДНК. Так, у *Marchantia* найдена дупликация *cob* гена, не содержащая интронов, при этом в интактной копии того же гена они имеются [Oda et al., 1992].

Новые интроны появляются в генах скорее всего путем дупликации существующих интронов и их интеграции в новые участки генома. Об этом свидетельствует сходство многих интронных последовательностей в разных генах — например, между вторым интроном *cox1* и первым интроном *cox3,* между вторым интроном *cox3* и *rrn26* в митохондриях *Marchantia* [Oda et al., 1992; Ohyama et al., 1993]. В процессе эволюции растений инвазия интронов иногда предшествовала разделению растений на сосудистые и низшие, т.е. происходила более 400 миллионов лет назад [Malek, Knoop, 1998].

Из семи интронов группы I, описанных у *Marchantia,* шесть локализованы в гене *cox1*, кодирующем одну из субъединиц цитохромоксидазы [Oda et al., 1992]. Оказалось, что у большинства высших растений в гене *cox1* интронов нет. Предполагали даже, что мтДНК высших растений содержат лишь интроны группы II [Shuster, Brennicke, 1994]. Однако уже через год

после этой публикации появилось сообщение о наличии интронов группы I у покрытосеменных *Peperomia* [Vaughn et al., 1995]. Недавно был проведен анализ 281 вида покрытосеменных на наличие интронов группы I в гене *cox1*. Было показано, что данный интрон многократно приобретался отдельными систематическими группами покрытосеменных путем горизонтального переноса, вероятнее всего, от грибов. Установлено 32 таких независимых переноса, всего же он присутствует в 48 из 281 исследованного вида [Palmer et al., 2000].

Гены митохондриальных интронов растений. К 2000 г. в митохондриальных геномах растений обнаружено приблизительно 100 интронов, примерно четверть из них содержат в своем составе открытую рамку считывания (ген).

Единственной интрон-кодируемой рамкой считывания в мтДНК *Arabidopsis,* а также большинства цветковых растений является *mat-r.* Он находится в дистальном интроне *nad1* гена и, вероятно, кодирует фермент матуразу [Marienfeld et al., 1999]. Обнаружив данный ген в митохондриальном геноме пшеницы, исследователи, однако, не могли объяснить, каким образом он экспрессируется, поскольку им не удалось выявить инициирующего кодона ATG [Bonen, 1995]. В дальнейшем было показано, что для матуразных генов характерен неканонический старт-кодон GGG. Функцией матураз, как известно, является вырезание интрона из пре-мРНК молекулы [Marienfeld et al., 1999].

Ядерные последовательности в митохондриальном геноме. Значительное увеличение размера генома митохондрий растений (по сравнению с животными и грибами) происходит за счет интегрирования последовательностей ядерного генома — у *Arabidopsis* они составляют 5%, или 15 т.п.н., что почти равно размеру митохондриального генома человека (см. рис. 4.3). Большая часть этих последовательностей является мобильными генетическими элементами, в основном ретротранспозонами. Найдены также последовательности, сходные с транспозонами бактерий и животных, для объяснения этого феномена необходимо допустить наличие межвидового переноса генетических элементов. К сожалению, пока невозможно более детально проанализировать сходство ядерного и митохондриального геномов из-за отсутствия секвенированных ядерных геномов растений [Marienfeld et al., 1999].

Пластидные последовательности в митохондриальном геноме. Они составляют значительно меньшую часть, чем ядерные, — у *Arabidopsis* всего 1,23%, или 4,5 т.п.н. [Marienfeld et al., 1999]. У кукурузы в митохондриальный геном интегрирован фрагмент пластидной ДНК размером 12 т.п.н. [Stern, Lonsdale, 1982]. Очевидно, эти переносы произошли сравнительно

недавно и уникальны у разных систематических групп. В пользу такого представления говорят данные о чрезвычайном сходстве последовательностей даже в нефункционирующих областях митохондриального генома, например между фрагментами гена *psbD* или *ndhB* экзона. В тех же случаях, когда перенесенные гены функционируют в митохондриях, например тРНК Asp, His, Trp, Met, Ser, сходство это еще выше и достигает 94% [Marienfeld et al., 1999].

Вирусные последовательности в митохондриальном геноме. В митохондриальном геноме *Arabidopsis* две открытые рамки считывания весьма подобны РНК-зависимым РНК-полимеразам, типичным для РНК-вирусов. Особенно большое сходство наблюдается между этими *orf* и РНК-полимеразами грибов, патогенных для растений: *Cryptonectria parasitica (blight fungus* каштана*),* паразитом картофеля *Rhizoctonia solani* и патогенным грибом вязов *Ophiostoma novo-ulmi* [Hong et al.,1998]. Аналогичный фрагмент обнаружен также в мтДНК *Vicia faba.* Все это говорит в пользу переноса вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы от вирусов к патогенным грибам и растениям — их хозяевам. В растениях РНК-вирус или его фрагменты подвергаются обратной транскрипции и в форме ДНК интегрируются в геном. Происходит ли это за счет последовательностей обратной транскриптазы, перенесенных из ядерного генома ретротранспозонами, остается пока не выясненным [Marienfeld et al., 1999].

* * *

Таким образом, митохондриальный геном растений представляет собой крайне изменчивую по структуре, но достаточно стабильную по числу находящихся в нем генов систему. На рис. 4.4 изображен полностью секвенированный недавно митохондриальный геном сахарной свеклы [Kubo et al., 2000]. В отличие от чрезвычайно компактного хлоропластного генома в митохондриальном геноме растений белок-кодирующие и РНКгены составляют менее 20%. Значительное увеличение размера генома происходит за счет интронов, различных повторяющихся последовательностей, ядерных и пластидных ДНК, встроившихся в мтДНК. Наконец, функция более 50% митохондриального генома пока не выяснена. Набор генов, входящих в митохондриальную генетическую систему, состоит из ряда генов транспортных и рибосомальных РНК, структурных рибосомальных белков и около 20 компонентов дыхательной цепи. Теоретически рассчитанное расстояние между генами в митохондриальном геноме *Arabidopsis* составляет в среднем 6,5 т.п.н., реально же наблюдаются некодирующие участки длиной до 57 т.п.н. [Hoffmann et al., 2001]. Очевидно, что гены, кодирующие ферменты транскрипции, процессинга и трансляции митохондриальных генов, лока-

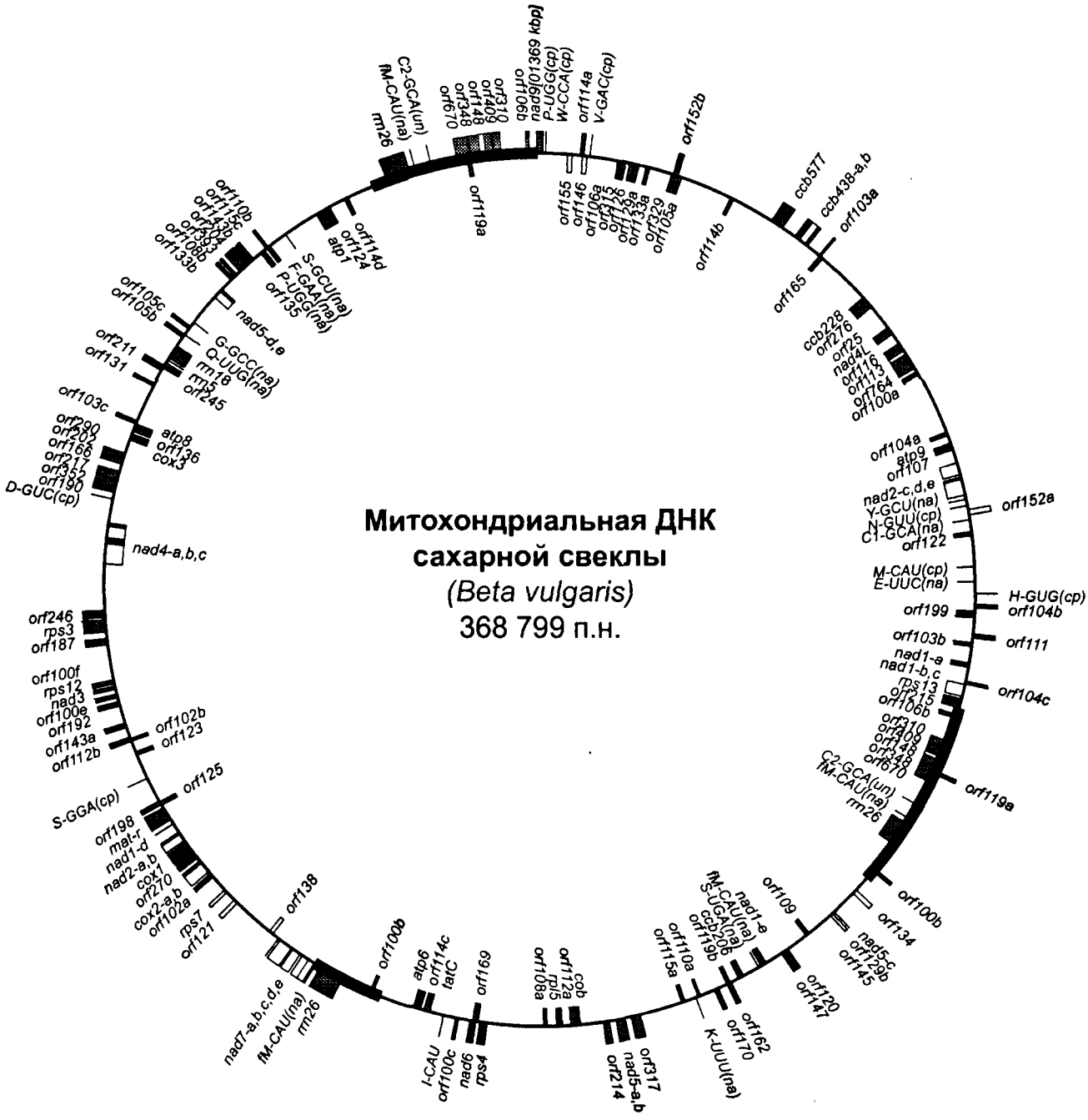


Рис. 4.4. Генетическая карта митохондриального генома сахарной свеклы. Заштрихованными прямоугольниками обозначены гены и ORF протяженностью более 100 аминокислот. Интроны показаны тонкой линией. Гены вне круга транскрибируются по часовой стрелке, а гены внутри круга — против часовой стрелки. Сокращения для трех классов генов тРНК: *na* — собственно митохондриальные; *ср* — хлоропластного типа; *ип* — неизвестного происхождения. Трехкопийные рекомбинационно активные повторяющиеся последовательности обозначены жирными линиями. Нулевой координатой обозначен первый нуклеотид *nad9* ORF, нумерация продолжается по часовой стрелке [по Kubo et al., 2000]

лизованы в ядерном геноме. Как и в случае хлоропластов, мы можем говорить лишь о частичной автономности генетической системы митохондрий, ибо для экспрессии даже тех генов, которые содержит мтДНК, необходима теснейшая кооперация с генетической системой ядра.

Экспрессия митохондриальных генов

Экспрессия генов в митохондриях растений необычна прежде всего образованием множественных транскриптов с одного участка генома. Такая вариабельность размеров мРНК вызывается: множественностью сайтов инициации транскрипции [Mulligan et al., 1988a; Lupold et al.,1999]; множественностью сайтов терминации транскрипции [Hoffmann et al., 2001]; наличием посттранскрипционного расщепления (cleavage) и сплайсинга [Gray et al., 1992; Hoffmann et al., 2001].

Еще одной особенностью транскрипции митохондриальных генов является то, что осуществляет ее ядерная РНК-полимераза, чрезвычайно похожая на РНК-полимеразу бактериофагов T7, T4 и SP6 [Hedtke et al., 1997].

И наконец, трансляционные синтезы в митохондриях происходят при участии третьего клеточного генома — хлоропластного, а именно необходим экспорт ряда пластидных тРНК, не кодируемых митохондриальными генами (см. табл. 4.2).

Транскрипция митохондриальных генов растений и ее регуляция

Митохондриальные гены транскрибируются как индивидуально, так и в составе полицистронных мРНК молекул. Так, у *Arabidopsis* около 40 из 58 митохондриальных генов находятся в составе кластеров. Примерно такое же соотношение генов в кластерах наблюдается для мтДНК сахарной свеклы, хотя порядок генов резко отличается от мтДНК *Arabidopsis* [Kubo et al., 2000; Hoffmann et al., 2001]. Обнаружен ряд кластеров, включающих по три гена: *18S-5SrRNA-nad5* [Wissinger et al.,1988]; *rpl5-rps14-cob* [Hoffmann et al., 1999]; *nad3-rps12-ccb206* [Itani, Handa, 1998]; *orf87-nad3-nad1/A* [Gutierres et al., 1999] и некоторые другие. Как видно из состава двух последних кластеров, гены, сцепленные в транскрипционные единицы, различаются у разных видов. У *Arabidopsis,* например, ген *ccb206* транскрибируется независимо от *nad3-rps12* кластера [Itani, Handa, 1998]. Вследствие значительных рекомбинационных перестроек мтДНК у растений некоторые кластеры при определенных условиях разрушаются. Так, у мужски стерильной линии табака CMSII мутантная мтДНК несет большую делецию, в результате которой от кластера *orf87-nad3-nad1/A* остается только ген *nad1/A* [Gutierres et al., 1999]. У разных видов растений цитоплазматическая мужская стерильность связана с формированием новых кластеров, нетипичных для нормальных митохондриальных транскриптов (см. главу 11).

Промоторы

Митохондриальные промоторы растений состоят обычно из 17—18 нуклеотидов (–14 +4), при этом выделяется центральный домен (расположен обычно на участке от –7 до +5) и 2—3-нуклеотидный вышележащий домен (–11 –12) [Rapp et al., 1993; Dombrowski et al., 1999] (табл. 4.4).

Таблица 4.4

Гомология промоторных последовательностей [по Lonsdale, Grienenberger, 1992]

Митохондриальный ген	Участок промоторной последовательности
26S рРНК кукурузы	ATAAA*A*ATCAA * * * * * **
18S рРНК кукурузы	TAGAT*A*AATCT * * * * **
Cox1 сайт 2 кукурузы	TCATAAGTA*A*TCCAA * * * *
26S рРНК *Oenothera*	TTAGT*A*AGGTT * * * *
atp9 9-2 сайт 3 петунии	CTCGT*A*AGAGA * * * *
S-плазмиды кукурузы	CTACAT*A*AAGAT

Примечание. Инициация транскрипции происходит с выделенных курсивом нуклеотидов.

Подробное изучение промоторов позволило установить консенсусные промоторные основные (*core)* последовательности. Они оказались разными у одно- и двудольных растений. Из 46 видов однодольных у 24 имелся CRTA-мотив, у 4 — TRTA, у 9 — YYTA и у 4 — RRTA (где R=A или G ; Y=C или T). Из секвенированных промоторных областей 21 вида двудольных у 13 имелся CRTA и у 1 — RRTA-мотив [Gray et al., 1992; Rapp et al., 1993].

У двудольных основная часть промоторного участка часто состоит из девяти нуклеотидов: CRTAAGAGA, расположенных ($5'^{(-7)}$ — $3'^{(+2)}$), т.е. перекрывает два нуклеотида инициирующего кодона [Fey, Maréchal-Drouard, 1999a; Dombrowski et al., 1999]. Три нуклеотида из 9 наиболее консервативны: –2(G), +1(G) и +2(A); у всех исследованных двудольных выявлена 100-процентная гомология этого участка. Основной консенсусной последовательности предшествует АТ-бокс ($5'^{(-10)}$ — $3'^{(-13)}$). Наименее консервативен самый удаленный (–14) нуклеотид, его замена лишь в незначительной степени отрицательно сказывается на инициации транскрипции. Как правило, и у однодольных, и у двудольных на расстоянии 5 нуклеотидов до и 9 нуклеотидов после CRTA отсутствуют цитозины [Dombrowski et al., 1999; McCabe

et al., 2000]. Вероятно, *core*-промоторные последовательности являются ведущими в связывании с РНК-полимеразой, тогда как более разнообразные предшествующие (upstream) последовательности промотора модулируют его активность [Schuster, Brennicke, 1994].

Участок, следующий за инициирующим кодоном, также имеет чаще всего хотя бы один пурин в положениях +3 и +4 [Dombrowski et al., 1999].

Показано, что в отличие от высококонсервативных промоторов митохондрий дрожжей у однодольных (кукуруза) замены нуклеотидов внутри промоторной области снижают инициацию транскрипции не очень значительно — на 10—40% [Rapp et al., 1993]. Напротив, у двудольных замена G в положении +1 на A приводит к потере 70% активности промотора дикого типа [Hoffmann et al., 2001].

В целом промоторы у двудольных несут более протяженные консервативные последовательности, чем у однодольных, — 18 нуклеотидов составляют почти два полных витка спирали ДНК. Искусственное встраивание промотора в транскрипционной системе *in vitro* показало, что весь промоторный участок действует как единый элемент, инициируя транскрипцию взаимодействием с РНК-полимеразой и/или со специфическими дополнительными факторами [Dombrowski et al., 1999].

Многие митохондриальные гены растений несут множественные промоторы — от двух до шести. Два промотора выявлено у митохондриального *cob* гена кукурузы, три — у *cox3* и у *atp9* гороха, четыре — у *atp1* гороха [Mulligan et al., 1988b; Hoffmann et al., 2001]. Для *cox2* гена кукурузы показано наличие четырех промоторов в так называемой главной хромосоме. Кроме того, этот ген расположен непосредственно за 0,7 т.п.н. рекомбинационным повтором и имеет второй набор промоторов. В рекомбинантном субгеномном кольце выявлено еще два промотора *cox2* гена кукурузы. По данным анализа транскриптов *in vivo,* из шести промоторов *cox2* гена активными являются пять. Интересно, что один из промоторов оказался состоящим из семи перекрывающихся единиц, каждую из которых, как было показано с помощью точечного делеционного мутагенеза, независимо узнает РНК-полимераза [Lupold et al., 1999].

Как именно транскрипционный аппарат идентифицирует промоторную последовательность, до сих пор не ясно. Равная эффективность, с которой транскрипция инициируется в случае тандемно расположенных промоторов, свидетельствует против сканирования соответствующими белками ДНК молекулы от 5′- к 3′-концу, так как в этом случае преимущество получал бы первый с 5′-конца промотор [Dombrowski et al., 1999]. Параметры, определяющие силу промотора *in vivo,* неясны. В случае гена *cox2* кукурузы установлено, что кроме первичной структуры самого промотора определен-

ную роль в его активности играет геномный контекст, окружающий данный промотор [Hoffmann, 2001].

Выбор промотора может находиться под контролем ядерного генома. У одной из аллоплазматических линий кукурузы обнаружен ядерный ген *Mct (Modifer of cox transcript)*, влияющий на выбор промотора при транскрипции конкретного митохондриального гена — субъединицы *cox2* [Cooper et al., 1990]. Обычно у многолетнего теосинте *Zea perennis* и многих аллоплазматических форм кукурузы с цитоплазмой *Z. perennis* выявляется транскрипт размером 1,9 т.п.н., а у содержащих ядерный ген *Mct* количество копий этого транскрипта снижено, но доминирует транскрипт размером 1,5 т.п.н. В присутствии доминантного аллеля *Mct* гена у *Z. perennis* активным становится нетипичный промотор *cox2* гена, не имеющий CRTA-мотива [Newton et al., 1995; Auger et al., 2001].

На основании анализа секвенированного митохондриального генома *Arabidopsis* кажется весьма вероятным существование других типов промоторных последовательностей [Brennicke et al., 1999].

Отметим, что в отличие от хлоропластов прокариотическое происхождение митохондриальных промоторов не является очевидным [Hoffmann et al., 2001]. Скорее всего промоторы были эволюционно адаптированы к иному, чем у хлоропластов, типу РНК-полимеразы, чье происхождение будет обсуждаться далее в этой главе.

Как мы уже упоминали, ряд тРНК генов в митохондриальном геноме имеет пластидное происхождение. Интересным оказался вопрос о природе промоторов, определяющих экспрессию этих генов. Типичные для хлоропластных генов –10 и –35 промоторные области обнаружены перед рядом тРНК генов митохондрий, имеющих "хлоропластное происхождение"; однако такие мотивы отсутствуют у истинно митохондриальных тРНК генов [Joyce et al., 1988].

В митохондриях картофеля исследованы две хлоропластные копии одного и того же гена $тРНК^{Asn}$ — *trnN1* и *trnN2*, находящиеся в разном контексте: ген *trnN1* пребывал в типичном для других двудольных контексте мтДНК, тогда как ген *trnN2* фланкирован специфическими пластидными последовательностями [Fey, Maréchal-Drouard, 1999b].

Было показано, что обе копии — *tnrN1* и *trnN2* — транскрибируются с промоторов, находящихся вне пластидных вставок, т.е. с митохондриальных последовательностей. Так, *trnN1* котранскрибировался с двумя другими митохондриальными генами (*trnY* и *nad2*) с двух альтернативных промоторов, имеющих традиционный CRTA-мотив. Вторая копия гена $тРНК^{Asn}$ — *trnN2* транскрибировалась также с двух промоторов, причем оба они относятся к классу не-консенсусных [Fey, Maréchal-Drouard, 1999b].

Интересно, что NEP-промоторы хлоропластов (см. главу 3) гена *rpoB* у табака и кукурузы имеют такой же основной *YRTA*-мотив, критический для транскрипции, как и митохондриальные промоторы [Liere, Maliga, 1999]. Родственными оказались и гены РНК-полимеразы митохондрий и кодируемой ядром (NEP) РНК-полимеразы хлоропластов.

РНК-полимераза

Вопрос о локализации генов, кодирующих РНК-полимеразу митохондрий растений, долгое время оставался открытым. В секвенированных геномах митохондрий высших растений данный ген не был выявлен. Митохондриально кодируемые РНК-полимеразы обнаружены лишь у простейшего *Reclinomonas americana* и у бурой водоросли *Pylaiella littoralis* [Lang et al., 1997; Rousvoal et al.,1998].

В конце 90-х годов почти одновременно появились сообщения об идентификации и секвенировании РНК-полимеразных генов, подобных таковым у бактериофагов T3 и T7, в ядерном геноме *Chenopodium* [Weihe et al.,1997], *Arabidopsis* [Hedtke et al.,1997], пшеницы [Ikeda, Gray, 1999] и кукурузы [Chang et al., 1999], чуть позднее — в ядерном геноме табака [Hedtke et al., 2002].

У *Arabidopsis* обнаружено небольшое семейство из трех различных, но родственных генов фагоподобной РНК-полимеразы: два из них, как было показано, кодируют митохондриальную, а третий — пластидную РНК-полимеразу [Hess, Börner, 1999]. У пшеницы и кукурузы таких генов по одному на каждый тип органелл. Ген пшеницы *rpoTm* кодирует митохондриальную РНК-полимеразу — фермент массой 113 кД, состоящий из 1005 аминокислот. Родственный ему ген *rpoTp*, имеющий 45% идентичных аминокислот, контролирует пластидную РНК-полимеразу несколько меньшего размера — 107 кД (949 аминокислот). Молекулярная масса РНК-полимеразы *Chenopodium album* — 112 кД [Weihe et al.,1997].

Митохондриальные РНК-полимеразы пшеницы и кукурузы сходны по аминокислотному составу и дают кроссреакцию с антителами, полученными против одного из них [Ikeda, Gray, 1999]. Более того, показана значительная гомология *rpoTm* и *rpoTp* генов с тремя РНК-полимеразными генами *Arabidopsis, Chenopodium,* митохондриальной РНК-полимеразой дрожжей и фаговой РНК-полимеразой. У всех генов этого семейства найдено 11 высококонсервативных доменов [Chang et al., 1999]. Особенно высока гомология в каталитическом центре фермента и минимальна — в промоторной области, что приводит к выводу о возможной дивергенции промоторных последовательностей среди фагов, дрожжевых и растительных митохондриальных генов [Chang et al., 1999].

Изучение экспрессии РНК-полимеразных генов *rpoTp* и *rpoTm* у кукурузы показало, что, хотя оба они экспрессируются конститутивно, транскрипты митохондриальной РНК-полимеразы превалируют в нефотосинтетических тканях (корни и пестики), тогда как ген пластидной РНК-полимеразы более активно транскрибируется в молодых листьях параллельно с развитием хлоропластов [Chang et al., 1999] (см. главу 3, раздел "Ядерная РНК-полимераза пластид").

Происхождение митохондриальной РНК-полимеразы. Схема замены в процессе эволюции эукариот многокомпонентной митохондриальной РНК полимеразы эубактериального типа на фагоподобную РНК-полимеразу, кодируемую ядром, дана на рис. 4.5. Примечательно, что гены *RpoY* и *RpoZ* представлены каждый девятнадцатью экзонами (16 из которых идентичны по длине), при этом расположение всех 18 интронов в точности сохранено. Все это свидетельствует о сравнительно недавно произошедшей генной дупликации, хотя она и предшествовала эволюционному расхождению покрытосеменных на одно- и двудольные. Остается пока открытым вопрос о происхождении гена *RpoY* — когда и каким образом данный ген впервые появился в ядерном геноме [Gray, Lang, 1998]. Эволюция органельных геномов будет подробнее рассмотрена в главе 7.

ДНК-связывающиеся регуляторные белки в митохондриях растений

Для взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами мтДНК, как и в случае транскрипции пластидных генов, необходимы специфические ДНК-связывающиеся белки. Эта область регуляции экспрессии митохондриального генома только начинает исследоваться (рис. 4.6).

У гороха были выделены белки 32 и 44 кД, специфически связывающиеся с промотором гена *atp9* и усиливающие транскрипцию в тест-системе *in vitro*. По мнению авторов, возможно, в митохондриях гороха имеется не один, а группа белков весом 30—32 кД, обладающих специфической ДНК-связывающей активностью. Показано участие белков 32 и 44 кД в инициации транскрипции в митохондриях гороха [Hatzack et al., 1998]. Необходимы дальнейшие детальные исследования, которые смогут прояснить роль каждого из белков в специфическом связывании с промоторными областями мтДНК и в инициации транскрипции.

Белок массой 63 кД, способный усиливать специфическую и неспецифическую транскрипцию митохондриальных генов в системе *in vitro,* был выделен у пшеницы, гомологичные ему белки присутствуют также у двудольных (*Arabidopsis*) [Ikeda, Gray, 1999; Hoffmann et al., 2001]. Транскрипты p63

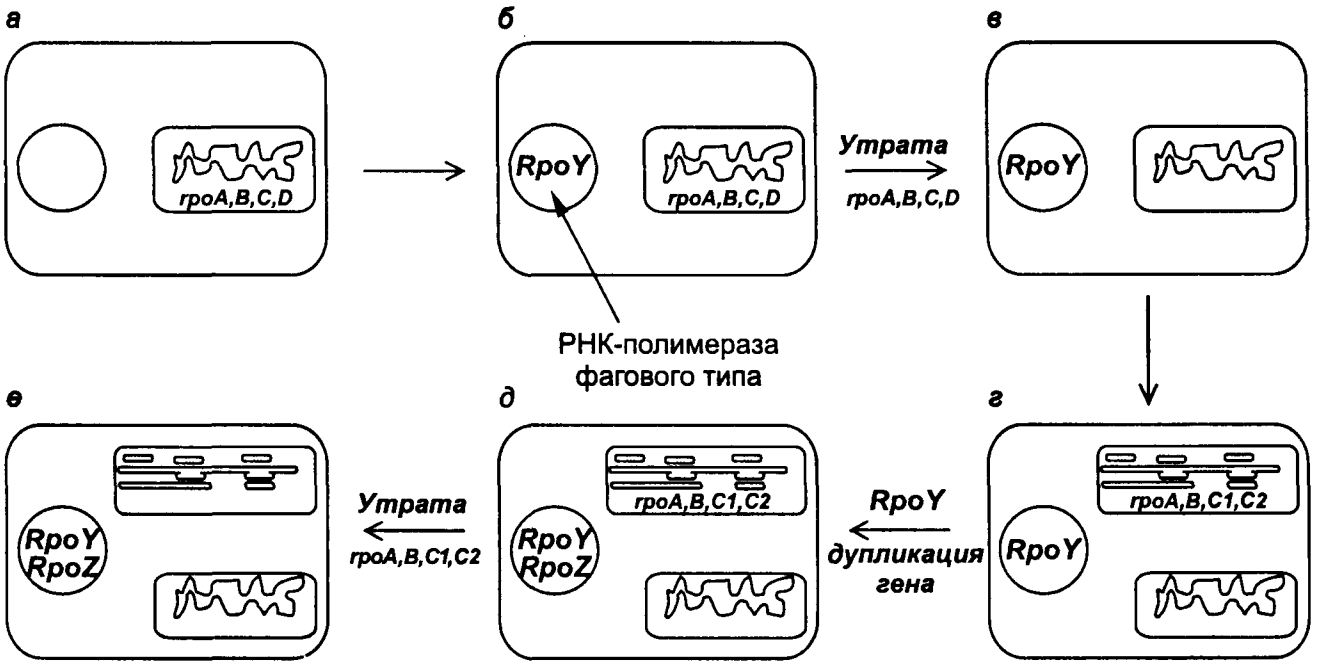


Рис. 4.5. Модель, иллюстрирующая замену в процессе эволюции органельной РНК-полимеразы бактериального типа на фагоподобные ферменты ядерного кодирования [по Gray, Lang, 1998]. *а* — мтДНК содержит активные гены ***rpoA,B,C,D*** протеобактериального предка митохондрий. *б* — яДНК приобретает гены фагоподобной РНК-полимеразы ***RpoY***; активны оба фермента , как ядерного, так и мтДНК кодирования. *в* — мтДНК гены ***rpoA,B,C,D*** становятся неактивными и со временем теряются, активна только РНК-полимераза ядерного кодирования; *г* — хлоропластная ДНК содержит гены ***rpoA,B,C1,C2*** от предков хлоропластов — цианобактерий; активна только хпДНК-кодируемая РНК-полимераза. *д* — ген ***RpoY*** дуплицируется с образованием ***RpoZ***, продукт которого становится активным в хлоропластной транскрипции; как ядерно-, так и хп-кодируемые РНК-полимеразы активны; *е* — *rpo* гены хпДНК кодирования становятся неактивными и со временем теряются; активна только ядерно кодируемая РНК-полимераза

Примечание. *а* — *Reclinomonas americana,* хотя отсутствие ядерного ***RpoY*** гена еще не доказано; *б* — ни один вид пока не найден; *в* — большинство эукариот; *г* — возможно, некоторые водоросли (пока не изученные); *д* —однодольные и двудольные растения; *е* — паразитическое растение *Epifagus virginiana.*

присутствуют в очень низкой концентрации в зародышах сухих семян пшеницы, но уже через пять часов после замачивания семян аккумулируются в значительном количестве. Аналогичная динамика наблюдается также для синтезируемых *de novo* транскриптов *cox2* гена, т.е. экпрессия ядерного гена *p63* коррелирует по времени с транскрипцией митохондриального гена *cox2* при прорастании семян [Ikeda, Gray, 1999]. Поиск аналогий в базах данных между белком p63 и какими-то другими белками, вовлеченными в митохондриальную транскрипцию у разных организмов, включая дрожжи и человека, пока не дал положительного результата. Названный белок имеет ряд последовательностей, отдаленно напоминающих эквивалентные области в сигма-факторах эубактерий, от которых, очевидно, произошли митохондрии. Для оценки функциональной значимости этого сходства требуются дальнейшие исследования [Ikeda, Gray, 1999].

Группа сигмоподобных белков ядерного кодирования исследована недавно у кукурузы. Установлено, что один из пяти белков связан не только с пластидами, но и с митохондриями и, вероятно, участвует в транскрипции митохондриального генома [Beardslee et al., 2002].

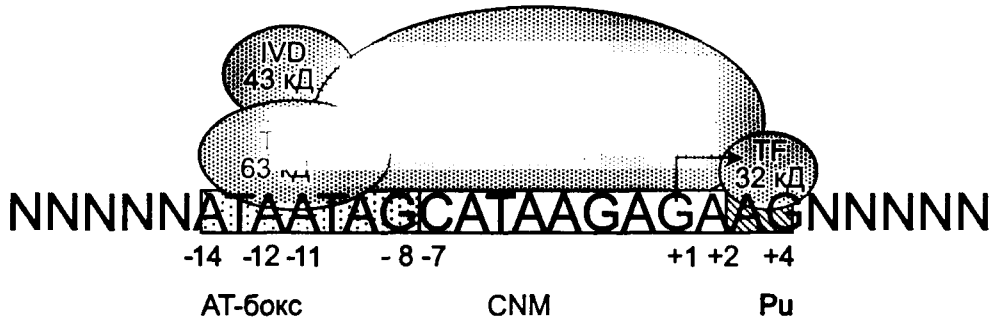


Рис. 4.6. Структура промотора в митохондриях двудольных растений и компоненты аппарата транскрипции. In vitro транскрипционный анализ промоторной области atp9 гороха выявил последовательность от -14 до +4, необходимую и достаточную для осуществления промоторной функции независимо от окружающих последовательностей. Точка начала транскрипции (+1) обозначена ломаной стрелкой. Хотя промотор функционирует как единый комплекс, в нем выделяются три составные части: высококонсервативный девятичленный мотив (-7 +2, CNM), AT-бокс, в котором чрезвычайно важны нуклеотиды в положениях -11 и -12 и два нуклеотида в позициях +3 и +4 (Pu), из которых хотя бы один должен быть пурином для нормальной работы промотора. Кроме обнаруженной в митохондриях РНК-полимеразы размером около 110 кД (см. текст), у пшеницы и гороха были очищены митохондриальные ДНК-связывающие белки 63, 43 и 32 кД; их функцию как транскрипционных факторов еще предстоит доказать.Один из белков, связывающийся с промотором гена *atp9*, был идентифицирован — это изовалерил-CoA дегидрогеназа (IVD), катализирующая один из этапов деградации лейцина; связь этого фермента с инициацией митохондриальной транскрипции остается пока неясной [по Hoffmann et al., 2001]

Регуляция транскрипции

Уровень отдельных митохондриальных мРНК изменяется в разных тканях, а также в онтогенезе. Так, в пыльниках подсолнечника количество митохондриальных транскриптов и соответствующих белков генов *atpA, atp9, cob* и *rrn26* было выше в молодых мейотических клетках, микроспорах и тапетуме, чем в окружающих тканях пыльника [Smart et al.,1994]. В проростках кукурузы митохондриальные транскрипты наблюдались в большем количестве в меристематических клетках. Уровень различных транскриптов изменялся в разных клетках, указывая скорее на специфическую регуляцию отдельных транскриптов в клетках, чем на общее изменение всех митохондриальных транскриптов [Li et al., 1996]. У кукурузы было показано, что из митохондриальных белковых генов наиболее интенсивно транскрибируется *atp1,* наименее интенсивно — *cox3.* По данным, полученным в начале 90-х годов, интенсивность транскрипции рибосомальных генов в митохонд-

риях кукурузы выше, чем генов ферментных комплексов [Finnegan, Brown, 1990; Mulligan et al., 1991]. Была обнаружена зависимость транскрипции от органа растений: так, в проростках кукурузы уровень *atp6* мРНК вдвое выше в листьях, чем в колеоптиле, а 26S РНК, напротив, вдвое выше в колеоптиле, чем в листьях [Li et al., 1996].

Скорость транскрипции — не единственный фактор, контролирующий уровень различных мРНК в клетке, этот показатель определяется в большей степени стабильностью мРНК молекул [Hoffmann et al., 2001]. Позднее были оценены транскрипционные активности нескольких генных семейств в митохондриях *Arabidopsis* и содержание (steady-state) этих транскриптов, позволившие определить роль посттранскрипционных процессов в регуляции генной экспрессии в митохондриях растений. В отличие от кукурузы в митохондриях *Arabidopsis* скорость транскрипции рРНК и генов рибосомальных белков невелика, что отчасти компенсируется их высокой стабильностью (рис. 4.6) [Giege et al., 2000].

Для ряда генов найдены "дополнительные" промоторы, позволяющие, вероятно, получать альтернативные мРНК транскрибируемых генов и тем самым увеличивать число транскриптов [McCabe et al., 2000].

Посттранскрипционная регуляция экспрессии генома митохондрий растений

Несмотря на факты регуляции транскрипции, изложенные в предыдущем разделе, общепризнанным остается предположение, что транскрипционный уровень не является ведущим в регуляции экспрессии митохондриальных генов растений. Большинство, если не все митохондриальные гены имеют основной конститутивный промотор [Leon et al., 1998; Mackenzie, McIntosh, 1999; McCabe et al., 2000]. Предполагается, что различные посттранскрипционные процессы, такие, как сплайсинг, РНК-редактирование и процессинг концов РНК-матриц с помощью эндо- и экзонуклеаз, в большей степени, чем транскрипция, контролируют количество транскриптов тех или иных генов в митохондриях (рис. 4.7) [Brown, 1998; Leon et al., 1998].

Сплайсинг митохондриальных интронов растений

Механизмы сплайсинга интронов рассмотрены нами в предыдущей главе. Как и в случае пластидных генов, митохондриальные транскрипты подвергаются цис- и транс-сплайсингу. До сих пор не обнаружено ни одного случая самосплайсинга интронов в митохондриях высших растений, что также аналогично сплайсингу пластидных транскриптов (см. главу 3, раздел "Самосплайсинг интронов") [Bonen, 1995].

В простейших случаях, как, например, у транскриптов *cox2* гена, происходит цис-сплайсинг. У *nad2*, содержащего четыре интрона группы II, три из них (между экзонами A/B, C/D и D/E) подвергаются цис-сплайсингу, после чего происходит транс-сплайсинг между B- и C-экзонами. Данная особенность сплайсинга *nad2* транскриптов чрезвычайно консервативна в митохондриях высших растений и наблюдается как у *Triticum* и *Oenothera*, так и в одном из самых маленьких митохондриальных геномов — у *Brassica napus* [Handa et al.,1997].

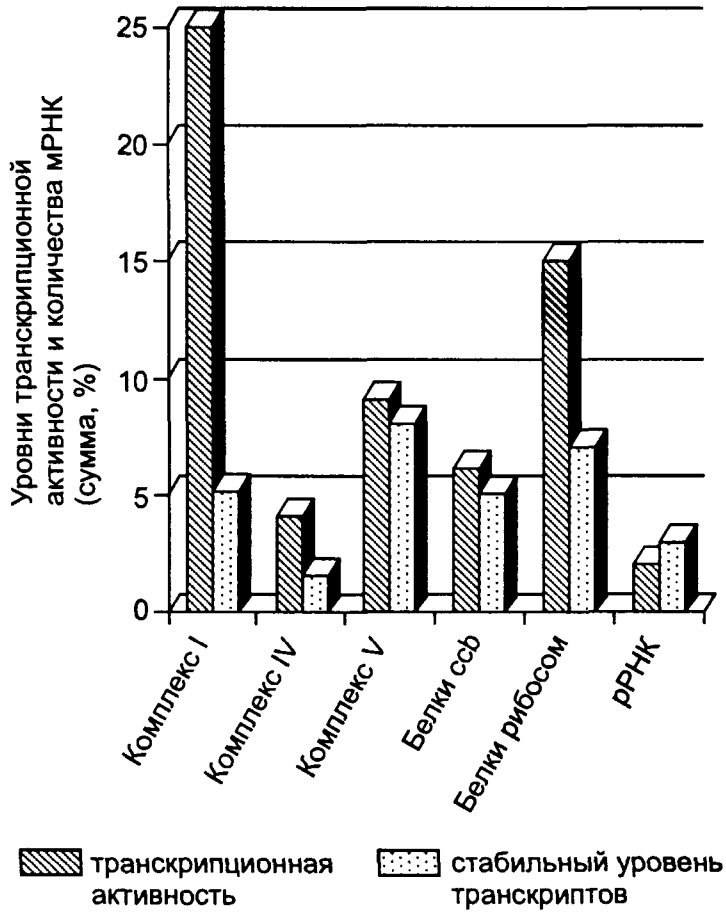


Рис. 4.7. Различия в транскрипционной активности между несколькими семействами генов в сравнении с различиями в стабильных уровнях этих транскриптов в митохондриях *Arabidopsis*. Диаграмма отражает влияние посттранскрипционных процессов на регуляцию генной экспрессии [по Giege et al., 2000]

В митохондриях с первичными транскриптами *nad1* и *nad5* генов наибольшему числу интронов соответствует наиболее сложный — множественный транс-сплайсинг. Из-за структурных реорганизаций на уровне ДНК кодирующие части этих генов оказались разделенными (см. главу 3). Тем не менее независимо транскрибирующиеся предшественники способны находить друг друга и принимать нужную конформацию для успешного транс-сплайсинга интронов (рис. 4.8). Необходимое для этого процесса комплементарное взаимодействие оснований разных цепочек достигается в

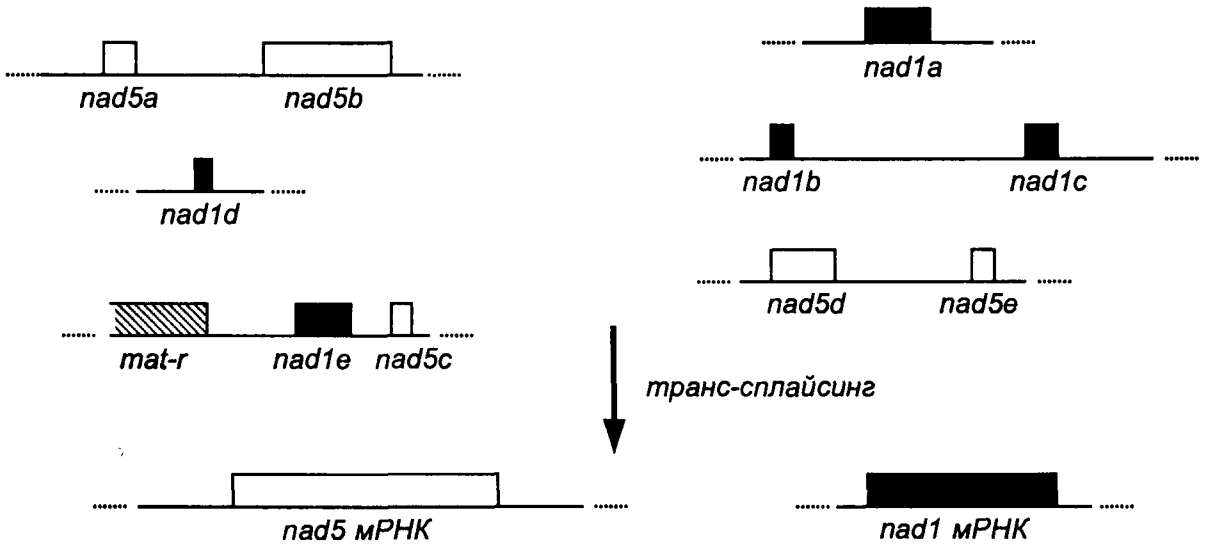


Рис. 4.8. Схема транс-сплайсинга митохондриальных транскриптов *nad1* и *nad5* пшеницы. Кодирующие сегменты *nad1* (черные блоки), *nad5* (белые) и матуразы (заштрихованный блок) фланкированы нетранслируемыми последовательностями, содержащими интроны группы II [по Bonen, 1995]

том числе с помощью эдитинга (см. главу 10). Большое количество интронов в *nad* генах и значительная их разбросанность по мтДНК, вероятно, требуют координированной регуляции экспрессии *nad* генов на уровне сплайсинга [Bonen, 1995]. В митохондриях *Arabidopsis* происходит пять актов транс-сплайсинга: в генах *nad1, nad2* и *nad5* [Giege, 2001].

Попытки выяснить происхождение транс-сплайсинга интронов группы II в митохондриях растений показали, что он произошел в результате рекомбинации цис-организованных гомологов, которые еще можно обнаружить у примитивных наземных растений [Malek, Knoop, 1998].

Интересно, что экспрессия матуразного интронного гена может происходить у пшеницы двумя путями. Первый — с неканонического промотора, который обеспечивает низкий уровень экспрессии, но при этом полностью транскрибируется *mat-r* последовательность матуразы — обратной транскриптазы. Второй промотор находится внутри *mat-r* гена — в этом случае мРНК содержат неполную — лишь карбокситерминальную часть *mat-r* и котранскрибирующиеся с ней экзон *e nad1* и экзон *c nad5* генов. Во втором случае промотор несет обычный канонический мотив, что обеспечивает активно протекающую транскрипцию экзонов *nad* генов, но при этом неполноценную *mat-r* матрицу [Farre, Araya, 1999]. Как в данной системе осуществляется выбор соответствующего промотора, пока неясно.

Изучение сплайсинга в митохондриях табака показало, что он зависит по крайней мере от одного гена ядра [Brangeon et al., 2000].

РНК-редактирование — один из обязательных этапов процессинга митохондриальных РНК — подробно рассматривается в главе 10.

3′-процессинг транскриптов

У ряда митохондриальных транскриптов на 3′-конце нетранслируемой области были обнаружены короткие инвертированные повторы, которые складываются в характерные вторичные структуры с петлей (stem-loop) [Schuster et al., 1986]. Структуры такого типа у бактерий и в митохондриях животных определяют терминацию транскрипции [Clayton, 1984; Cheng et al., 1991; Cohen, 1995]. У хлоропластов аналогичные повторы участвуют в стабилизации транскриптов (см. главу 3). В случае митохондриальных мРНК данные структуры не являются сигналами терминации, а участвуют в процессинге транскриптов и также стабилизируют молекулы (рис. 4.9) [Dombrowski et al., 1997; Giege et al., 2000]. Вероятно, на данных этапах в митохондриях задействована и недавно обнаруженная РНК-хеликаза [Gagliardi et al., 1999]. Молекулы мРНК, содержащие на 3′-конце инвертированные повторы, отличаются более продолжительным периодом полужизни (half-life), чем не имеющие таких структур [Hoffmann et al., 2001].

Полиаденилирование мРНК митохондрий, деградация митохондриальных РНК-матриц

В случае транскриптов пластидных генов присоединение поли(А)-концевой последовательности является сигналом к деградации РНК-матрицы (глава 3, раздел "Как контролируется стабильность мРНК пластид?"). Роль данного процесса в митохондриях растений почти не изучена. Лишь в конце 1999 г. появились первые публикации, посвященные полиаденилированию митохондриальных мРНК растений [Gagliardi, Leaver, 1999; Lupold et al., 1999; Kuhn et al., 2001]. У кукурузы было обнаружено интенсивное полиаденилирование транскриптов *cox2* в митохондриях. Присоединение поли(А) наблюдалось в различных местах матричной РНК гена *cox2*. Поли(А)-последовательность достигала в длину 52 нуклеотида, что близко к таковой в мтРНК человека (57 нуклеотидов), но длиннее, чем в мтРНК дрожжей [Lupold et al., 1999].

Какой-либо консервативной последовательности, определяющей сайт присоединения поли(А), выявить не удалось, что характерно также для хлоропластных матриц, прокариотических и фаговых транскриптов. Напротив, в случае ядерных мРНК животных, растений и дрожжей полиаденилирование происходит в строго фиксированных сайтах, определяемых специфической нуклеотидной последовательностью [Li, Hunt, 1992; Wahle, Keller, 1992]. Полагают, что, как и в случае с хлоропластными транскриптами, полиаденилирование митохондриальных матриц у растений связано с началом их деградации [Lupold et al., 1999].

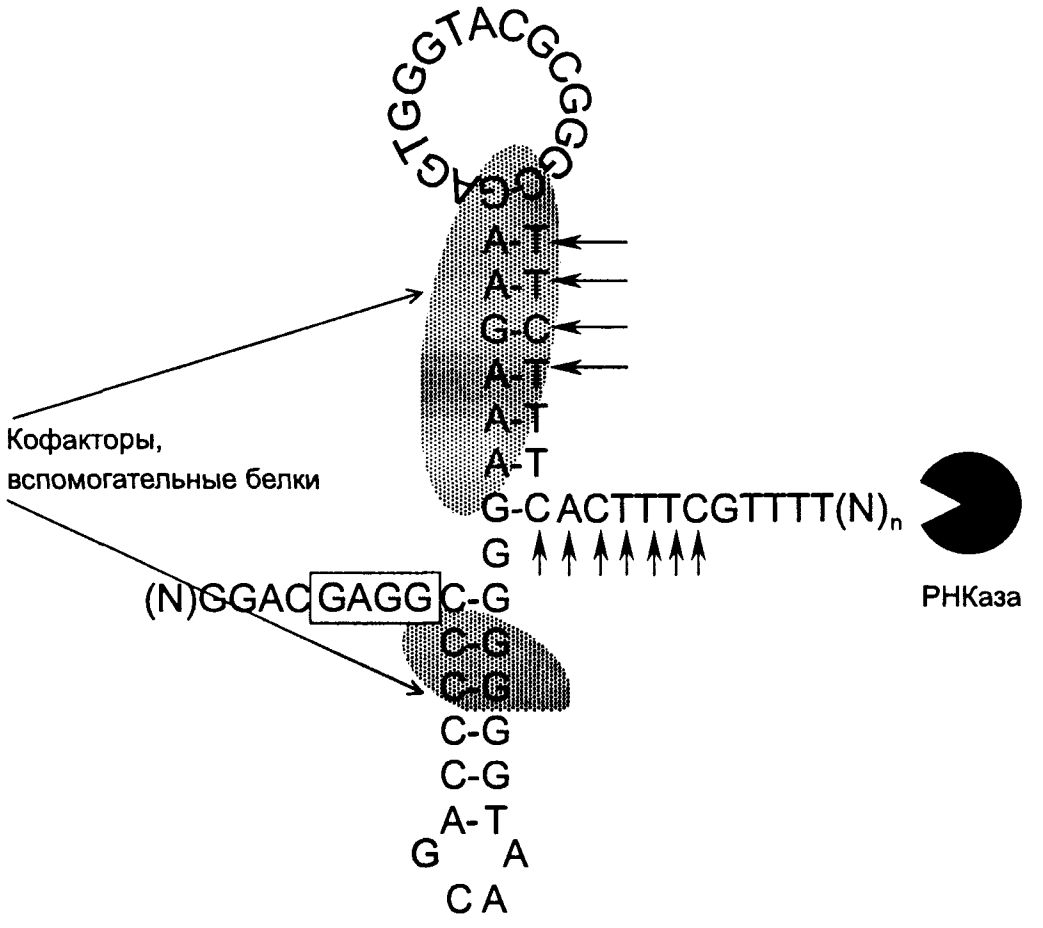
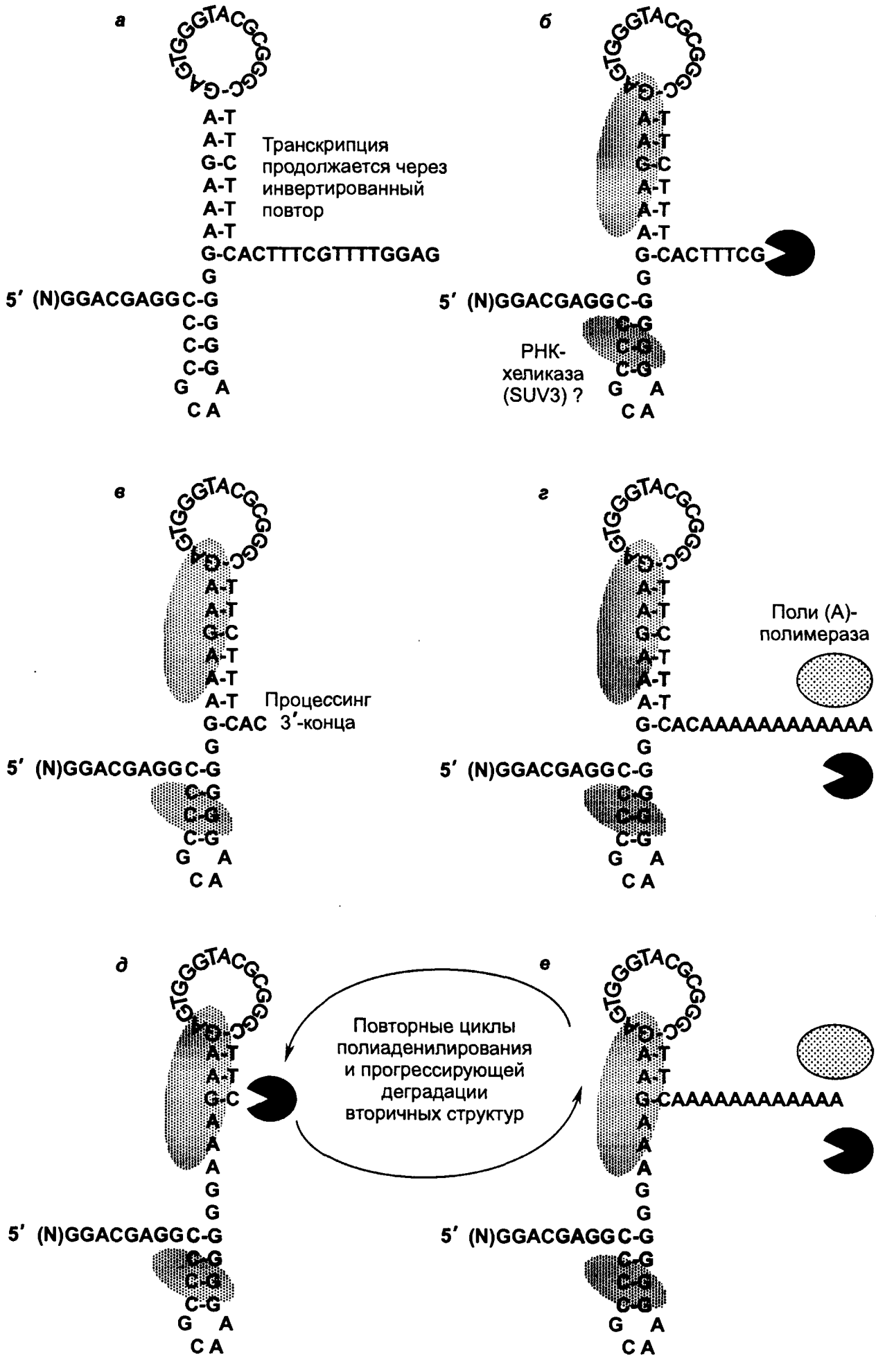


Рис. 4.9. Модель вторичной структуры 3′-инвертированных повторов *atp9* гороха как сигнала к процессингу в митохондриях растений. 3′-концы транскриптов (выявленные *in vitro* и *in vivo*) обозначены длинными стрелками и находятся на дистальном двуспиральном участке данной структуры. Короткие стрелки указывают на более длинные транскрипты, выявленные *in vivo*. Кофактор(ы) и/или вспомогательные белки одновременно защищают инвертированный повтор и вышележащие участки и направляют РНКазу (скорее всего экзонуклеазу) к 3′-району. 5′-GAGG-3′-мотив (в рамке) обнаружен в нескольких генах митохондрий растений в позиции, непосредственно предшествующей первому двуспиральному участку соответствующего инвертированного повтора [по Dombrowski et al., 1997]

Предварительные результаты, полученные при изучении РНК-матриц еще одного гена — *cox3* кукурузы, позволили обнаружить поли(А)-последовательность на расстоянии 56 нуклеотидов после стоп-кодона, ей предшествует UU-мотив [Lupold et al., 1999]. Насколько особенности полиаденилирования митохондриальных матриц *cox2* и *cox3* закономерны для других транскриптов в митохондриях растений, покажут дальнейшие исследования.

РНКазы, вероятнее всего экзонуклеазы, при процессинге укорачивают пре-мРНК молекулу, что приводит впоследствии к ее полному разрушению (рис. 4.10). Предположение о связи полиаденилирования с ускоренной деградацией мРНК подтверждено при исследовании подсолнечника с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС). Показано, что дицистрон-


а
б
в
г
д
е
Транскрипция продолжается через инвертированный повтор
РНК-хеликаза (SUV3) ?
Процессинг 3′-конца
Поли (A)-полимераза
Повторные циклы полиаденилирования и прогрессирующей деградации вторичных структур
5′ (N)GGACGAGG
G-CACTTTCGTTTTGGAG
G-CACTTTCG
G-CAC
G-CACAAAAAAAAAAAA
G-CAAAAAAAAAAAA

ный транскрипт полиаденилируется *in vivo* по 3′-концу, при этом ускоряется деградация матрицы [Gagliardi, Leaver, 1999]. Особенности этого процесса, его тканеспецифичность и регуляцию ядерным геном восстановления фертильности мы подробнее рассматриваем в главе 11, посвященной ЦМС.

Трансляция митохондриальных генов растений

Завершающий этап синтеза белков с митохондриальных матриц у растений почти не изучен.

Обычно, хотя и не всегда, трансляция в митохондриях растений начинается с кодона AUG. У *Arabidopsis* обнаружены также инициирующие кодоны GGG, AAU и GUG [Unseld et al., 1997], у *Oenothera* — GUG, у редиса — ACG [Bock et al., 1994; Dong et al., 1998].

Неясен самый первый этап трансляции — как происходит связывание мРНК с рибосомами, поскольку в митохондриальных матрицах растений отсутствуют SD-последовательности [Giege, Brennicke, 2001].

Неотъемлемый компонент трансляционной системы как ядра, так и органелл — молекулы транспортных РНК. Прежде чем молекулы мт-тРНК смогут участвовать в трансляции, они должны пройти ряд этапов процессинга (см. рис. 10.8). Кроме РНК-редактирования, которое рассматривается в главе 10, молекулы-предшественники претерпевают процессинг 5′- и 3′-концов, после чего к 3′-концу достраивается CCA-триплет, который не кодируется генами митохондриальных тРНК растений. Подробно процесс формирования мт-тРНК рассмотрен в замечательном обзоре [Hoffmann et al., 2001].

Рис. 4.10. Модель процессинга и деградации 3′-конца *atp9* транскриптов в митохондриях гороха [по Hoffmann et al., 2001]. *а* — транскрипция продолжается через инвертированный повтор и заканчивается на какой-то пока не найденной терминирующей структуре; *б* — несколько белков с потенциальной стабилизирующей функцией связываются с двуспиральными структурами. Возможно, они включают также РНК-хеликазу (SUV3), аналогичную найденной у дрожжей. Находящиеся после петли нуклеотиды удаляют, вероятно, с помощью экзонуклеазной реакции; *в* — образуются прошедшие процессинг 3′-концы второго двуспирального участка; *г* — некодирующие нуклеотиды, преимущественно аденозины, посттранскрипционно добавляются к 3′-концу поли(А)-полимеразой, что делает мРНК более привлекательной для экзонуклеазного переваривания; *д* — повторное удаление экзонуклеазой части нуклеотидов, теперь уже входящих в состав двуспиральной структуры; *е* — очередной цикл полиаденилирования и последующей экзонуклеазной деградации; скорее всего несколько таких циклов завершаются в конце концов разрушением стабилизирующей вторичной структуры и окончательной полной деградацией *atp9* мРНК

Изучение одной из самых распространенных митохондриальных мутаций — ЦМС позволило несколько продвинуться в понимании экспрессии генома митохондрий у растений. Первый пример пост- или котрансляционной регуляции экспрессии в митохондриях растений описан недавно для химерного гена *pvs orf239* фасоли (см. главу 11).

В последние годы показано, что посттрансляционная деградация митохондриальных полипептидов является, вероятно, одним из важных типов регуляции экспрессии митохондриального генома растений. Известна значительная склонность ДНК митохондрий растений к рекомбинациям с образованием новых химерных генов (см. подробнее главу 11), описана также трансляция неотредактированных транскриптов (глава 10). Несмотря на то что в большинстве случаев данные аномальные матрицы в митохондриях транслируются, их продукты почти никогда не обнаруживаются в тканях растений, что объясняется их быстрой деградацией [Lu et al., 1996; Sarria, Mackenzie, 1998]. Известно также, что при нарушении ядерно-митохондриальной координации генной экспрессии субъединицы ферментов, кодируемые митохондриями, быстро разрушаются после трансляции в отсутствие ядерно кодируемых субъединиц этих ферментов [Rep, Grivell, 1996].

Недавно была описана одна из протеаз митохондрий, связанная с внутренней мембраной и кодируемая ядром, которая осуществляет деградацию аномального белка у ЦМС-растений фасоли (см. подробнее в главе 11). Данная протеаза высоко гомологична LON-протеазе *E.coli,* обнаруженной также в митохондриях дрожжей и человека [Sarria, Mackenzie, 1998]. Вероятно, существуют и другие системы деградации белков митохондрий, осуществляющие посттрансляционный контроль экспрессии генов [Knorpp et al.,1995], однако их исследование — дело будущего.

Наиболее подробно изученная белоксинтезирующая система митохондрий грибов (см. главу 5) позволяет провести некоторые аналогии в экспрессии генов митохондрий растений и грибов; но делать это следует весьма осторожно. Наличие у растений трех генетических систем в клетке значительно усложняет процессы координирования их экспрессии (глава 8).

Литература

Albertazzi F.J., Kudla J., Bock R. The *cox2* locus of the primitive angiosperm plant *Acorus calamus*: molecular structure, transcript processing and RNA editing // Mol. Gen. Gen. 1998. Vol. 259, No.6. P. 591—600.

Andre C., Levy A., Walbot V. Small repeated sequences and the structure of the plant mitochondrial genomes // Trends in Genetics. 1992. Vol. 8, No. 4. P.128—132.

Aubert D., Bisanz-Seyer C., Hersog M. Mitochondrial *rps14* is a transcribed and edited pseudogene in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 20. P. 1169—1174.

Auger D.L., Newton K.J., Birchler J.A. Nuclear gene dosage effects upon the expression of maize mitochondrial genes // Genetics. 2001. Vol. 157. P. 1711—1721.

Backert S., Dörfel P., Lurz R., Börner T. Rolling-circle replication of mitochondrial DNA in the higher plant *Chenopodium album* (L.) // Mol. and Cel. Biol. 1996. Vol. 16, No.11. P. 6285—6294.

Backert S., Nielsen B.L., Börner T. The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants // Trends Genet. 1997. Vol. 2, No.12. P. 477—483.

Backert S., Lurz R., Börner T. Electron microscopic investigation of mitochondrial DNA from *Chenopodium album* // Curr. Genet. 1996. Vol. 29. P. 427—436.

Backert S., Meissner K., Börner T. Unique features of the mitochondrial rolling circle-plasmid mpl from the higher plant *Chenopodium album* L. // Nucl. Acids Res. 1997. Vol. 25, No.3. P. 582—589.

Bailey-Serres J., Leroy P., Jones S.S. et al. Size distributions of circular molecules in plant mitochondrial DNAs // Curr. Genet. 1987. Vol.12. P. 49—53.

Beardslee T.A., Roy-Chowdhury S., Jaiswal P. et al. A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts // Plant J. 2002. Vol. 31, No. 2. P. 199—210.

Binder S., Marchfelder A., Brennicke A. Regulation of gene expression in plant mitochondria // Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 32. P.303—314.

Bock H., Brennicke A., Shuster W. Rps3 and *rpl16* genes do not overlap in *Oenothera* mitochondria: GTG as a potential translation initiation codon in plant mitochondria? // Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 24. P. 811—818.

Bonen L. Wheat mitochondrial genome //The Molecular Biology of Plant Mitochondria. 1995. P. 345—364.

Bonen L., Vogel J. The ins and outs of group II introns // Trends Genet. 2001. Vol. 17, No. 6. P. 322—331.

Brangeon J., Sabar M., Gutierres S. et al. Defective splicing of the first *nad4* intron is associated with lack of several complex I subunits in the *Nicotiana sylvestris* NMS1 nuclear mutant // Plant J. 2000. Vol. 21. P. 269—280.

Brennicke A. Mitochondrial DNA from *Oenothera berteriana* // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. P.1207—1210.

Brennicke A., Blanz P. Circular mitochondrial DNA species from *Oenothera* with unique sequences // Mol. Gen. Gen. 1982. Vol. 187. P. 461—466.

Brennicke A., Grohmann L., Hiesel R. et al. The mitochondrial genome on its way to nucleus: different stages of gene transfer in higher plants // FEBS Lett. 1993. Vol. 325. P.140—145.

Brennicke A., Zabaleta E., Dombrowski S. et al. Transcription signals of mitochondrial and nuclear genes for mitochondrial proteins in dicot plants // J. Heredity. 1999. Vol. 90. P.345—350.

Brown G.G. An overview of recent advances in plant mitochondrial gene expression // Plant mitochondria: from gene to function. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 1998. P.149—152.

Brown G.G., Zhang M. Mitochondrial plasmids: DNA and RNA. The Molecular Biology of Plant Mitochondria. 1995. P. 61—91.

Chang C.-C., Sheen J., Bligny M. et al. Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases // Plant Cell. 1999. Vol.11. P. 911—925.

Cheng S.-W.C., Lynch E.C., Leason K.R. et al. Functional significance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator // Science. 1991. Vol. 254. P. 1205—1207.

Clayton D.A. Transcription of mammalian mitochondrial genome // Annu. Rev. Biochem. 1984. Vol. 53. P. 573—594.

Cohen S.N. Surprises at the 3'end of prokaryotic RNA // Cell. 1995. Vol. 80. P. 829—832.

Cooper P., Butler E., Newton K. Identification of a maize nuclear gene which influences the size and number of *cox2* transcripts in mitochondria of perennial teosintes // Genetics. 1990. Vol.126. P. 461—467.

Dale R.M.K., Duesing J.H., Keene D. Supercoiled mitochondrial DNA from plant tissue culture cells // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1981. Vol. 78. P. 4453—4457.

Dale R.M.K., Wu M., Kiernan M.C.C. Analysis of four tobacco mitochondrial DNA size classes // Nucl. Acids Res. 1983. Vol. 11. P. 1673—1685.

*DeBenedetto C., De Gara L., Arrigoni O. et al.*The structure of the cytochrome oxidase subunit II gene and its use as a new character in the construction of the phylogenetic tree of Angiospermae // Plant Sci. 1992. Vol. 81. P. 75—82.

DeHaas J. M., Hille J., Kors F. et al. Two potential *Petunia hybrida* mitochondrial DNA replication origins show structural and functional homology with the animal mitochondrial DNA heavy and light strand replication origins // Curr. Genet. 1991. Vol. 20. P. 503—513.

Dodds J.A., Morris T.J., Jordan R.L. Plant viral double-stranded DNA // Annu. Rev. Phytopathol. 1984. Vol. 22. P.151—168.

Dombrowski S., Brennicke A., Binder S. 3'-inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators // EMBO J. 1997. Vol.16, No.16. P. 5069—5076.

Dombrowski S., Hoffmann M., Guha C., Binder S. Continuous primary sequence requirements in the 18-nucleotide promoter of dicot plant mitochondria // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 10094—10099.

Dong F.G., Wilson K.G., Makaroff C.A. The radish (*Raphanus sativus* L.) mitochondrial *cox2* gene contains an ACG at the predicted translation initiation site // Curr. Genet. 1998. Vol. 34. P. 79—87.

Dudareva N.A., Kiseleva E.V., Boyarintseva A.E. et al. Structure of the mitochondrial genome of *Beta vulgaris* // Theor. Appl. Gen. 1988. Vol. 76. P. 753—759.

Echeverria M., Robert D., Carde J.P., Litvak S. Isolation from wheat mitochondria of a membrane-associated high molecular weight complex involved in DNA synthesis // Plant Mol. Biol. 1991. Vol. 16. P. 301—315.

Farre J.C., Araya A. The mat-r open reading frame is transcribed from a non-canonical promoter and contains an internal promoter to co-transcribe exons nad1e and nad5III in wheat mitochondria // Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 40, No.6. P. 959—967.

Fey J., Maréchal-Drouard L. Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: an illustration of a divergent evolution between monocots and dicot mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999a. Vol. 256. P. 409—414.

Fey J., Maréchal-Drouard L. Expression of the two chloroplast-like $tRNA^{Asn}$ genes in potato mitochondria: mapping of transcription initiation sites present in the *trnN1-trnY-nad2* cluster and upstream of *trnN2* // Curr. Genet. 1999b. Vol. 36. P. 49—54.

Finnegan P.M., Brown G.G. Autonomously replicating RNA in mitocondria of maize plants with S-type cytoplasm // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1986. Vol. 8. P. 5175—5179.

Finnegan P.M., Brown G.G. Transcriptional and post-transcriptional regulation of RNA levels in maize mitochondria // Plant Cell. 1990. Vol. 2. P. 71—83.

Folkerts O., Hanson M. The male sterility-associated *pcf* gene and the normal *atp9* gene in *Petunia* are located on different sub-genomic mitochondrial DNA molecules // Genetics. 1991. Vol. 129. P. 885—895.

Fontarnau A., Fernandez-Yago J. Characterization of mitochondrial DNA in *Citrus* // Plant Physiol. 1982. Vol.70. P. 1678—1682.

Fox T.D., Leaver C.J. The *Zea mays* mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons // Cell. 1981. Vol. 26. P. 315—323.

Gagliardi D., Kuhn J., Spadinger U. et al. An RNA helicase (AtSUV3) is present in *Arabidopsis thaliana* mitochondria // FEBS Lett. 1999. Vol. 458. P. 337—342.

Gagliardi D., Leaver C. Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 3757—3766.

Gass D.A., Makaroff C.A., Palmer J.D. Variable intron content of the NADH dehydrogenase subunit 4 gene of plant mitochondria // Curr. Genet. 1992. Vol. 21. P. 423—430.

Giege P., Hoffmann M., Binder S., Brennicke A. RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria // EMBO Reports. 2000. Vol.1, No 2. P. 164—170.

Giege P., Brennicke A. From gene to protein in higher plant mitochondria // C.R. Acad. Sci Paris /Life Sciences. 2001. Vol. 324. P. 209—217.

Gray M.W., Hanic-Joyce P.J., Covello P.S. Transcription, processing and editing in plant mitochondria // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 43. P.145—175.

Gray M.W., Lang B.F. Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases // Trends Microbiol. 1998. Vol. 6. P.1—3.

Gray M.W., Lang B.F., Cedergren R. et al. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs // Nucl. Acids Res. 1998. Vol. 26. P. 865—878.

Grayburn W.S., Bendich A.J. Variable abundance of a mitochondrial DNA fragment in cultured tobacco cells // Curr. Genet. 1987. Vol. 12. P. 257—261.

Gutierres S., Combettes B., De Paepe R. et al. In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5′ to the first exon of the mitochondrial nad 1 gene is associated with lack of the NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 261, No.2. P. 361—370.

Hallden C., Lind C., Bryngelsson T. Minicircle variation in *Beta* mitochondrial DNA // Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 77. P. 337—342.

Handa H., Mizobuchi-Fukuoka R., Waraporn P. The rapeseed mitochondrial gene for subunit 2 of the NADH dehydrogenase complex: a trans-spliced structure is conserved in one of the smallest plant mitochondrial genomes // Curr. Gen. 1997. Vol. 31. P. 336—342.

Hanson M., Folkerts O. Structure and function of the higher plant mitochondrial genome // Int. Rev. Cytol. 1992. Vol.141. P. 129—172.

Hatzack F., Dombrowski S., Brennicke A., Binder S. Characterization of DNA-binding proteins from pea mitochondria // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. P. 519—527.

Hedtke B., Börner T., Weihe A. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA-polymerases in *Arabidopsis* // Science. 1997. P. 809—811.

Hedtke B., Legen J., Weihe A. et al. Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*// Plant J. 2002. Vol. 30, No.6. P. 625—637.

Hess W., Börner T. Organellar RNA-polymerases of higher plants // Int. Rev. Cytol. 1999. Vol. 190. P. 1—59.

Hoffmann M., Dombrowski S., Guha C., Binder S. Cotranscription of the *rpl5-rps14-cob* gene cluster in pea mitochondria // Mol. Gen. Gen. 1999. Vol. 261, No. 3. P. 537—545.

Hoffmann M., Kuhn J., Daschner K., Binder S. The RNA world of plant mitochondria // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 2001. Vol. 70. P. 119—154.

Hong Y., Cole T.E., Brasier C.M., Buck K.W. Evolutionary relationships among putative RNA-dependent RNA polymerases encoded by a mitochondrial virus-like RNA in the Dutch elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi,* by other viruses and virus-like RNAs and by the *Arabidopsis* mitochondrial genome // Virology. 1998. Vol. 246, No.1. P. 158—169.

Houchins J.P., Ginsburg H., Rohrbugh M. et al. DNA sequence analysis of a 5.27–kb direct repeat occuring adjacent to the regions of S-episome homology in maize mitochondria // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 2781—2788.

Ikeda T., Gray M.W. Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat //Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 40, No.4. P. 567—578.

Ikeda T., Gray M.W. Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol. 19, No. 12. P. 8113—8122.

Itani K., Handa H. Rapeseed mitochondrial ccb206, a gene involved in cytochrome c biogenesis, is co-transcribed with the nad3 and rps12 genes: organization, transcription and RNA editing of the nad3-rps12-ccb206 locus // Curr. Genet. 1998. Vol.34, No. 4. P. 318—325.

Joyce P.M.B., Spencer D.F., Gray M.W. Multiple sequence rearrangements accompanying the duplication of a tRNA-Pro gene in wheat mitochondria // Plant Mol. Biol. 1988. Vol. 11. P. 833—843.

Kemble R.J., Carlson J.E., Erickson L.R. et al. The *Brassica* mitochondrial DNA plasmid and large RNAs are not exclusively associated with cytoplasmic male sterility // Mol. Gen. Gen. 1986. Vol. 205. P. 183—185.

Kemble R.J., Bedbrook J.R. Low molecular weight circular and linear DNA in mitochondria from normal and male sterile *Zea mays* cytoplasm // Nature. 1980. Vol. 284. P. 565—566.

Kim B.D., Lee K.J., Gib de Busk A. Linear and 'lasso-like'-structures of mitochondrial DNA from *Pennisetum typhoides* // FEBS Lett. 1982. Vol. 147. P. 231—234.

Klein M., Eckert-Ossenkopp U., Schmiedeberg I. et al. Physical mapping of the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by cosmid and YAC clones // Plant J. 1994. Vol. 6. P. 447—455.

Knorpp C., Azigyarto C., Glaser E. Evidence for a novel ATP-dependent membrane-associated protease in spinach leaf mitochondria // Biochem. J. 1995. Vol. 310. P. 527—531.

Kolodner R., Tewari K. Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from pea leaves // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1972. Vol. 69. P. 1830—1834.

Kool A.J. Isolation and physicochemical characterization of mitochondrial DNA from cultured cells of *Petunia hybrida* // Theor. Appl. Gen. 1985. Vol. 69. P. 223—233.

Kranz R., Lill R., Goldman B. et al. Molecular mechanisms of cytochrome C biogenesis: three distinct systems // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 29. P. 383—396.

Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A. et al. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA) // Nucl. Acids Res. 2000. Vol. 28. P. 2571—2576.

Kuhn J., Tengler U., Binder S. Transcript lifetime is balanced between stabilizing atem-loop structures and degradation-promoting polyadenylation in plant mitochondria // Mol. Cell. Biol. 2001. Vol. 21. P. 731—742.

Kumar R., Maréchal-Drouard L., Akama K., Small I. Striking differencies in mitochondrial DNA import between different plant species // Mol. Gen. Gen. 1996. Vol. 252. P. 404—411.

Lang B., Burger G., O'Kelly C.J. et al. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eybacterial genome in miniature // Nature. 1997. Vol. 387. P. 493—497.

Leaver C.J., Gray M.W. Mitochondrial genome organization and expression in higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. 1982. Vol. 33. P. 373—402.

Leblanc C. et al. Origin and evolution of mitochondria: what have we learnt from red algae? // Curr. Genet. 1997. Vol. 31. P.193—207.

Leon P., Arroyo A., Mackenzie S. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. Vol. 49. P. 453—480.

Levings C.S. III., Brown G.G. Molecular Biology of Plant Mitochondria // Cell. 1989. Vol. 56. P. 171—179.

Levings C.S. III, Shaw D.M., Hu W.W. et al. Molecular heterogeneity among mitochondrial DNAs from different maize cytoplasms // Extrachromosomal DNA. Symp. Molec. Cell. Biol. New York, 1979. P. 63—73.

Li Q., Hunt A.G. The polyadenylation of RNA in plants // Plant Physiol. 1992. Vol. 115. P. 321—325.

Li X.-Q., Zhang M., Brown G.G. Cell-specific expression of mitochondrial transcripts in maize seedlings // Plant Cell. 1996. Vol. 8. P. 1961—1975.

Liere K., Maliga P. In vitro characterization of the tobacco rpoB promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters // EMBO J. 1999. Vol.18. P. 249—257.

Lonsdale D.M., Grienenberger J.M. The mitochondrial genome of plants // Cell Organelles. Plant Gene Research. Wien: Springer-Verlag, 1992. P. 183—218.

Lonsdale D.M., Hodge T.P., Fauron C.M., Flavell R.B. A predicted structure for the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize // Plant Mol. Biol. 1983. Vol.12. P. 445—456.

Lu B., Wilson R., Phreaner C.G. et al. Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene // Mol. Cell. Biol. 1996. Vol. 16. P. 1543—1549.

Luck D.J.L., Riech E. DNA in mitochondria of *Neurospora crassa* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1964. Vol. 52. P. 931—938.

Lupold D.S., Caoile A.G., Stern D.B. The maize mitochondrial *cox2* gene has five promoters in two genomic regions, including a complex promoter consisting of seven overlapping units // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, No. 6. P. 3897—3903.

Lupold D.S., Caoile A.G., Stern D.B. Polyadenylation occurs at multiple sites in maize mitochondrial *cox2* mRNA and is independent of editing status // Plant Cell. 1999. Vol. 11. P. 1565—1578.

Mackenzie S., McIntosh L. Higher plant mitochondria // Plant Cell. 1999. Vol.11. P. 571—586.

Malek O., Knoop V. Trans-splicing group II introns in plant mitochondria: the complete set of cis-arranged homologs in ferns, fern allies, and a hornwort // RNA. 1998. Vol. 4, No. 12. P.1599—1609.

Manna E., Brennicke A. The mitochondrial genome of *Nicotiana plumbaginifolia* // Curr. Genet. 1985. Vol. 9. P. 411—415.

Maréchal-Drouard L., Small I., Weil J.-H., Dietrich A. Transfer RNA import into plant mitochondria // Methods Enzymol. 1995. Vol. 360. P. 310—327.

Marienfeld J., Unseld M., Brennicke A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information // Trends Plant Sci. 1999. Vol. 4. P. 495—502.

McCabe T.C., Daley D., Whelan J. Regulatory, developmental and tissue aspects of mitochondrial biogenesis in plants // Plant Biol. 2000. Vol. 2. P. 121—135.

Michel F., Umesono K., Ozeki H. Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns – a review // Gene. 1989. Vol. 82. P. 5—30.

Morikami A., Nakamura K. Structure and expression of pea mitochondrial F_1 — ATPase *a* subunit gene and its pseudogene involved in homologous recombination // J. Biochem. 1987. Vol. 101. P. 967—976.

Mulligan R.M., Maloney A.P., Walbot V. RNA processing and multiple transcription initiation sites result in transcript size heterogeneity in maize mitochondria // Mol. Gen. Gen. 1988a. Vol. 211. P. 373—380.

Mulligan R.M., Lau G.T., Walbot V. Numerous transcription initiation sites exist for the maize mitochondrial genes for subunit 9 of the ATP synthase and subunit 3 of cytochrome oxidase // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988b. Vol. 85. P. 7998—8002.

Mulligan R.M., Leon P., Walbot V. Transcriptional and posttranscriptional regulation of maize mitochondrial gene expression // Mol. Cell. Biol. 1991. Vol.11. P. 533—543.

Naas M.M.K., Naas S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and DNA staining reactions // J. Cell. Biol. 1963. Vol.19. P. 593—611.

Naas M.M.K., Naas S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments // J. Cell. Biol. 1963. Vol.19. P. 613—629.

Negruk V.I., Eisner G.I., Redichkina T.D. et al. Diversity of *Vicia faba* circular mtDNA in whole plants and suspension culture // Theor. Appl. Gen. 1986. Vol. 72. P. 541—547.

Newton K.J. Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation // Ann. Rev. Plant Physiol. 1988. Vol. 39. P. 503—532.

Newton K.J., Winberg B., Yamoto K. et al. Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the *cox2* gene of perennial teosintes // EMBO J. 1995. Vol.14. P. 585—593.

Oda K., Yamato K., Ohta E. et al. Gene organization deduced from the complete sequence of livewort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: a primitive form of plant mitochondrial genome // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 223. P. 1—7.

Oeser B. S2 plasmid from *Zea mays* encodes a specific RNA polymerase: an alternative alignment // Nucl. Acids Res. 1988. Vol.16. P. 8729—8733.

Ohyama K., Oda K., Ohta E. et al. Gene organization and evolution of introns of a liverwort, *Marchantia polymorpha* mitochondrial genome // Plant Mitochondria. Weinheim: VCH Chemie, 1993. P. 115—129.

Oldenburg D.J., Bendich A.J. Size and structure of replicating mitochondrial DNA in cultured tobacco cells // Plant Cell. 1996. Vol. 8. P. 447—461.

Palmer J.D., Adams K.L., Cho Y. et al. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2000. Vol. 97, No. 13. P. 6960—6966.

Palmer J.D., Shields C.R., Cohen D.B., Orton T.J. An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus *Brassica* // Nature. 1983. Vol. 301. P. 725—728.

Palmer J.D., Herbon L.A. Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome// Curr. Genet. 1987. Vol. 11. P. 565—570.

Palmer J.D., Shields C.R. Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome // Nature. 1984. Vol. 307. P. 437—440.

Powling A. Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugar beet with normal and male sterile cytoplasms // Mol. Gen. Gen. 1981. Vol. 183. P. 82—84.

Quétier F., Lejeune B., Delorme S. et al. Molecular form and function of the wheat mitochondrial genome // Molecular Form and Function of the Plant Genome. New York: Plenum Press, 1985. P. 413—420.

Quétier F., Vedel F. Heterogenous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants // Nature. 1977. Vol. 268. P. 365—368.

Rapp W.D., Lupold D.S., Mack S., Stern D.B. Architecture of the maize mitochondrial *atp1* promoter as determined by linker-scanning and point mutagenesis // Mol. Cell Biol. 1993. Vol.13, No. 12. P. 7232—7238 .

Reisner D., Gross H.J. Viroids // Annu. Rev. Biochem. 1985. Vol. 54. P. 531—564.

Rep M., Grivell L.A. The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis //Curr. Genet. 1996. Vol. 30. P. 367—380.

Rode A., Hartmann C., Falconet D. et al. Extensive mitochondrial DNA variation in somatic tissue cultures initiated from wheat immature embryos // Curr. Genet. 1987. Vol.12. P. 369—376.

Rousvoal S., Oudot M., Fontaine J. et al. Witnessing the evolution of transcription in mitochondria: the mitochondrial genome of the primitive brown alga *Pylaiella littoralis* (L) Kjellm. encodes a T7-like RNA polymerase // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 277. P. 1047—1057.

Salas M. A new mechanism for the initiation of replication of ø29 and adenovirus DNA: priming by the terminal protein // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1983. Vol.109. P. 89—106.

Sarria R., Mackenzie S.A. A cytoplasmic male sterility — associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated // Plant Cell. 1998. Vol. 10. P.1217—1228.

Schardl C.L., Lonsdale D.M., Pring D.R., Rose K.R. Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes // Nature. 1984. Vol. 310. P. 292—296.

Schuster W., Brennicke A. The Plant Mitocondrial Genome: Physical structure, information content, RNA editing and gene migration to the nucleus // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 45. P. 61—78.

Schuster W., Hiesel H., Isaac P.G. et al. Transcript termini of messenger RNAs in higher plant mitochondria // Nucl. Acids Res. 1986. Vol. 14. P. 5943—5954.

Sena E.P., Revet B., Moustacchi E. In vivo homologous recombination intermediates of yeast mitochondrial DNA analysed by electron microscopy // Mol. Gen. Gen. 1986. Vol. 202. P. 421—428.

Shikanai T., Yamada Y. Properties of the circular plasmid-like DNA, B4 from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice // Curr. Genet. 1988. Vol.13. P. 441—443.

Shirzadegan M., Christey M., Earle E.D., Palmer J.D. Rearrangement, amplification and assortment of mitochondrial DNA molecules in cultured cells of *Brassica campestris* // Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 77. P. 17—25.

Sisco P.H., Garcia-Arenal F., Zaitlin M. et al. LBN, a male-sterile cytoplasm of maize, contains two double-stranded RNAs // Plant Sci Lett. 1984. Vol. 34. P. 127—134.

Small I.D., Suffolk R., Leaver C.J. Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates // Cell. 1989. Vol. 58. P. 69—76.

Smart C., Moneger F., Leaver C.J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower // Plant Cell. 1994. Vol. 6. P. 811—825.

Sparks R.B., Dale R.M. Characterization of ^{3}H-labelled supercoiled mitochondrial DNA from tobacco suspension culture cells // Mol. Gen. Gen. 1980. Vol. 180. P. 351—355.

Spencer D.F., Schnare M.N., Coulthart M.B., Gray M.W. Sequence and organization of a 7.2 kb region of wheat mitochondrial DNA containing the large subunit (26S) rRNA gene // Plant Mol. Biol. 1992. Vol. 20. P. 347—352.

Stern D.B., Lonsdale D.M. Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12-kilobase sequence in common // Nature. 1982. Vol. 229. P. 698—702.

Sünkel S., Brennicke A., Knoop V. RNA editing of a conserved reading frame in plant mitochondria increases its similarity to two overlapping reading frames in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Gen. 1994. Vol. 242. P. 65—72.

Synenki R.M., Levings C.S.III, Shah D.M. Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from soybean // Plant Physiol. 1978. Vol. 61. P. 460—464.

Unseld M., Marienfeld J.R., Brandt P., Brennicke A. The mitochondrial genome in *Arabidopsis* contains 57 genes in 366924 nucleotides // Nat. Genet. 1997. Vol. 15. P. 57—61.

Vaughn J.C., Mason M.T., Sper-Witis G.L. et al. Fungal origin by horizontal transfer of a plant mitochondrial group I intron in the chimeric *coxI* gene of *Peperomia* // J. Mol. Evol. 1995. Vol. 41. P. 563—572.

Vedel F., Quetier F. Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from potato tubers // Biochim. Biophys. Acta. 1974. Vol. 340. P. 374—378.

Wahle E., Keller W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors // Annu. Rev. Biochem. 1992. Vol. 61. P. 419—440.

Wahleithner J.A., Wolstenholme D.R. Mitochondrial plasmid DNAs of broad bean: nucleotide sequences, complex secondary structures and transcription // Curr. Genet. 1987. Vol. 12. P. 55—67.

Wahleithner J.A., Wolstenholme D.R. Origin and direction of replication in mitochondrial plasmid DNAs of broad bean, *Vicia faba* // Curr. Genet. 1988. Vol. 14. P. 163—170.

Wang B., Cheng Y.-N., Li D.D. Some physicochemical properties of rice mitochondrial DNA // Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 77. P. 581—586.

Wang Z.-Y., Zheng F.-Q., Guo X.-L., Hong M.-M. Occurence and partial characterization of RNA species in rice // Plant Sci. 1989. Vol. 61. P. 227—234.

Ward B.L., Anderson R.S., Bendich A.J. The size of the mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (*Cucurbitaceae*) // Cell. 1981. Vol. 25. P. 793—803.

Weihe A., Hedtke B., Börner T. Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album* // Nucl. Acids Res. 1997. Vol.19. P. 2319—2325.

Weiner J.H., Bilous P.T., Shaw G.M. et al. A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins // Cell. 1998. Vol. 93. P. 93—101.

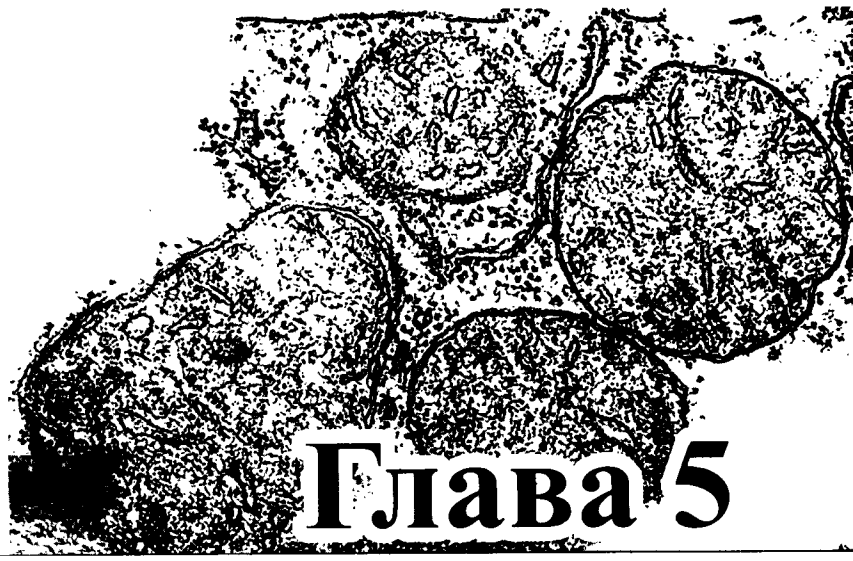
Wells R., Ingle J. The constancy of the buoyant density of chloroplast and mitochondrial DNA in a range of higher plants // Plant Physiol. 1970. Vol. 46. P. 178—179.

Wissinger B., Heisel R., Schuster W., Brennicke A. The NADH-dehydrogenase subunit 5 gene in *Oenothera* mitochondria contains two introns and is co-transcribed with the 5S rRNA gene // Mol. Gen. Gen. 1988. Vol. 212. P. 56—65.

Wolff G., Plante I., Lang B.F. et al. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the chlorophyte alga *Prototheca wickerhamii* // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 237. P. 75—86.

Wolstenholme D.R., Fauron C. Mitochondrial genome organization // The molecular biology of plant mitochondria. Dordrecht: Kluwer AP, 1995. P. 1—59.

Yang A., Mulligan R.M. Identification of a 4.5 S-like ribonucleoprotein in maize mitochondria // Nucl. Acids Res. 1996. Vol. 24. P. 3601—3606.



Глава 5

Организация митохондриального генома грибов

СТРУКТУРА и экспрессия митохондриального генома грибов будут рассмотрены главным образом на примере дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и нейроспоры (*Neurospora crassa*) как наиболее изученных объектов.

Сведения о митохондриальных геномах грибов, секвенированных к настоящему моменту, можно почерпнуть на сайте FMGP (Fungal Mitochondrial Genome Project, http://megasun.bch.umontreal.ca/People/lang/FMGP FMGP.html), а также в MitBASE [http://bio-www.ba.cnr.it:800/Tutorials/Mitbase/Fungi].

Митохондриальный геном дрожжей

S.cerevisiae — классический генетический объект — является также одним из наиболее детально изученных и в митохондриальной генетике [Dujon, 1981; Evans, 1983].

Основной наследственной единицей митохондриального генома дрожжей является нуклеоид, имеющий диаметр 20 — 50 нм и состоящий обычно из 3—4 молекул мтДНК. Митохондриальная ДНК дрожжей связана с гистоноподобными белками [Wolf, 1995]. Показано, что при аминокислотном голодании у мутантов дрожжей с дыхательной недостаточностью (*petite*) количество нуклеоидов увеличивается примерно в 10 раз при неизменном количестве копий мтДНК. Увеличение числа нуклеоидов способствует усилению трансмиссии мтДНК [MacAlpine et al., 2000].

Митохондриальная ДНК дрожжей — кольцевая или линейная?

Митохондриальную ДНК *S.cerevisiae* в редких случаях удавалось выделить в виде замкнутого кольца размером 25 мк [Wolf, 1995]. Как и в случае с мтДНК растений, обнаруживаемые линейные ДНК молекулы первоначально считали результатом разрывов ДНК *in vitro* в процессе приготовления препаратов. Однако линейная структура молекул мтДНК обнаруживалась не только при электронномикроскопических исследованиях, но и при рестрикционном картировании геномов, пульс-электрофорезе [Bendich, 1993, 1996]. В настоящее время линейные молекулы мтДНК обнаружены у трети из 60 изученных видов дрожжей, а также у ряда других таксономических групп, включая водоросли, *Ciliata,* паразитических простейших, плесневые грибы, оомицеты [Nosek et al., 1998]. При изучении структуры линейных мтДНК обнаружены гомогенные терминальные структуры, что позволило ввести

термин "митохондриальные теломеры" [Morin, Cech, 1988]. Особенности структуры данных теломер и возможные механизмы репликации линейных ДНК рассмотрены в работах [Nosek et al., 1998; Williamson, 2002].

Размер и нуклеотидный состав митохондриальных геномов дрожжей

Изученные к настоящему времени митохондриальные геномы дрожжей чрезвычайно изменчивы по размерам (от 17,3 т.п.н. у *Schizosaccharomyces pombe* до 101 т.п.н. у *Brettanomyces custersii*) и порядку расположения генов, в то время как общее число генов изменяется незначительно. Основные причины столь существенных различий в размере геномов объясняются наличием или отсутствием интронов и изменчивостью межгенных участков — спейсеров [Clark-Walker, 1992].

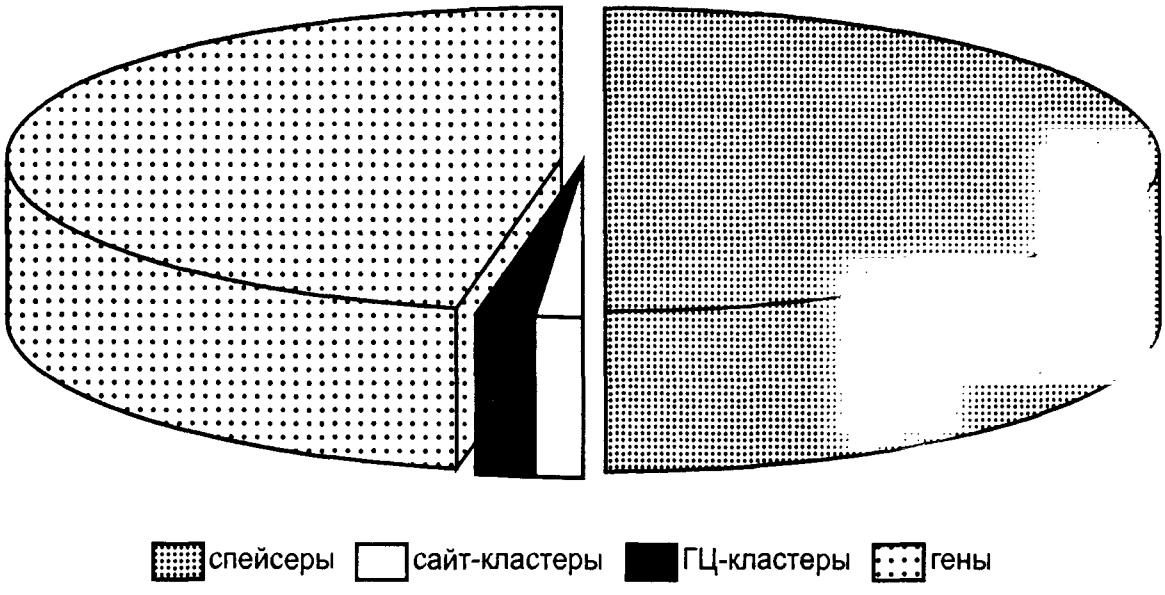


Рис. 5.1. Митохондриальный геном дрожжей [по de Zamaroczy, Bernardi, 1986]

Общее количество ГЦ-пар в мтДНК дрожжей чрезвычайно мало — 18%; молекула состоит из ГЦ- и АТ-богатых зон. Половину всей мтДНК составляют АТ-богатые последовательности, содержащие менее 5% ГЦ-пар — так называемые спейсеры. Два-три процента генома составляют короткие участки, богатые ГЦ (более 50%). Половина этих участков содержит сайт рестрикции *HaeIII* и называется сайт-кластерами, остальные несут сайт *HpaII* и названы ГЦ-кластерами. Длина ГЦ-кластеров обычно 30—60 п.н., число их на митохондриальный геном может превышать 150, обнаруживаются они по всему геному, но преимущественно в межгенных участках (рис. 5.1). Наконец, в оставшейся части генома содержание ГЦ-пар около 26% — это участки, состоящие из собственно генов [de Zamaroczy, Bernardi, 1986; Wolf, 1995]. На рис. 5.2 представлена карта митохондриального гено-

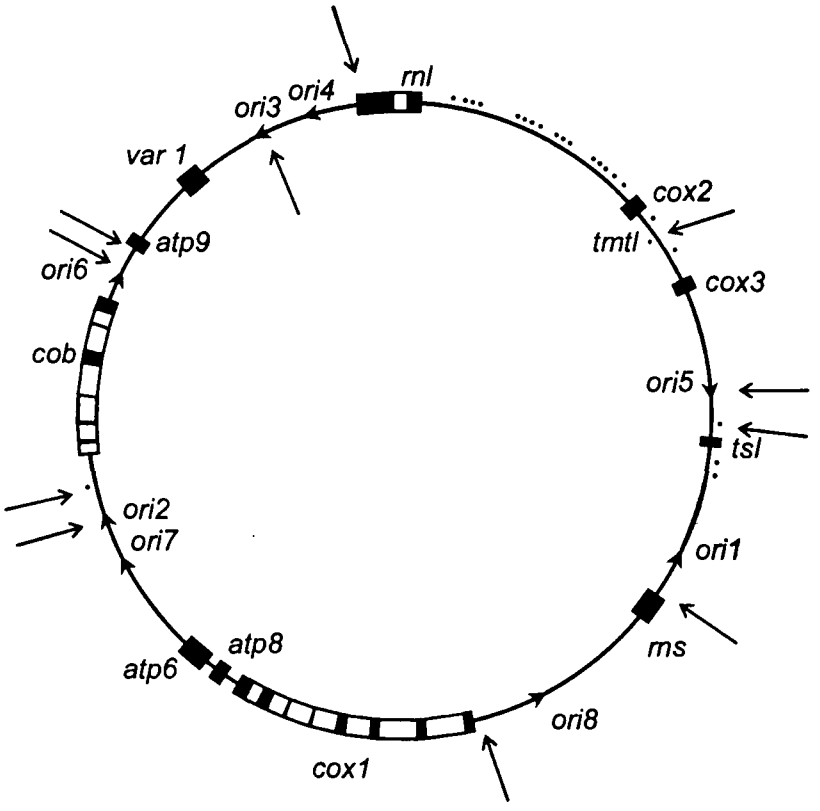


Рис. 5.2. Карта митохондриального генома *S.cerevisiae* [по Wolf, 1995]. Показаны известные гены, точки начала репликации (*ori*) и их ориентация. Черными прямоугольниками обозначены экзоны, белыми — интроны. Гены тРНК обозначены точками. Стрелки указывают места инициации транскрипции; стрелка около *ori3* указывает сайт инициации транскрипции на комплементарной нити. *rnl* и *rns* — большая и малая рРНК; *var1* — белок малой субъединицы митохондриальной рибосомы; *tsl* — локус синтеза тРНК. *tmtl* — единственная тРНК, которая находится на комплементарной цепочке

ма *Saccharomyces cerevisiae,* на которой показаны известные гены, точки начала репликации и их ориентация. Функция ГЦ-кластеров до конца не ясна, в главе 9 обсуждается их роль в связи со структурными перестройками митохондриальной ДНК.

Размер митохондриального генома у разных видов рода *Saccharomyces* обычно колеблется от 85 т.п.н. (так называемые длинные геномы) до 78 т.п.н. (короткие геномы) и 74 т.п.н. (сверхкороткие геномы). У *S.cerevisiae* количество молекул мтДНК на гаплоидную клетку составляет в среднем 21—23. Этот вид имеет "длинный" геном — 85 т.п.н. [Wolf, 1995].

Митохондриальный геном одного из примитивных видов дрожжей — *S.uvarum* оказался значительно меньшего размера — 57 т.п.н. Соответственно у данного вида имеется меньше точек начала репликации *(ori)* — четыре вместо восьми; ГЦ-кластеров всего 50—60, в то время как у *S.cerevisiae* их 200. Учитывая, что все характерные для дрожжей митохондриальные гены присутствуют и у *S.uvarum,* сокращение размера молекулы мтДНК можно с

уверенностью отнести за счет некодирующих участков [Cardazzo et al., 1998]. Заметим, что у *S.cerevisiae* из восьми точек *ori*-активными являются только четыре [Wolf, 1995].

Ori-область митохондриальной ДНК дрожжей имеет обычно следующую структуру (рис. 5.3): три ГЦ-кластера, сайты инициации репликации и АТ-богатый участок длиной приблизительно 200 п.н. [Baldacci et al., 1983].

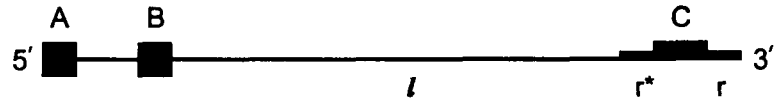


Рис. 5.3. Схематическая структура *ori* последовательности. A,B, C — ГЦ- кластеры, r* и r — сайты, в которых репликация ДНК инициируется в обоих направлениях РНК-праймерами, *l* — АТ-богатый участок [по Wolf, 1995]

Гены, кодируемые митохондриальной ДНК дрожжей

представлены в табл. 5.1. Два гена, кодирующих рибосомальную РНК большой и малой субъединиц, у *S. cerevisiae* находятся на значительном расстоянии друг от друга (см. рис. 5.2), размеры этих генов соответственно 3100 (21S) и 1460 (15S) нуклеотидов. У грибов с малым митохондриальным геномом (*Kloeckera africana* — 27 т.п.н. и *Torulopsis glabrata* — 19 т.п.н.) рибосомальные РНК также меньше: 2700 и 1450—1400 нуклеотидов [Wallace, 1982]. Ген *rns* непрерывен, тогда как *rnl* в зависимости от штамма может содержать интрон группы I, включающий ген эндонуклеазы [Dujon, 1981].

У дрожжей известен только один рибосомальный белок, кодируемый митохондриальным геномом – *var1*, размер которого изменяется в зависимости от штамма (отсюда и название — **var**iable) — от 40 до 44 кД [Wolf, 1995].

Все тРНК гены, за исключением одного (*tmt1*), кодируются на одной и той же ДНК-нити (рис. 5.2), ни один из них не имеет интронов. Терминальный триплет ССА ко всем тРНК молекулам добавляется посттранскрипционно, подобно тому как это происходит с ядерными тРНК. Имеющихся в митохондриальном геноме 24 тРНК достаточно для переноса 20 аминокислот [Wallace, 1982; Wolf, 1995], импортируется из цитоплазмы лишь одна $тРНК^{lys}$ (CUU) [Tarassov, Entelis, 1992].

По своей кодирующей способности мтДНК дрожжей значительно уступают митохондриальному геному растений. Это касается генов, кодирующих как структурные рибосомальные белки, так и белки комплексов электронно-транспортной цепи митохондрий. Очевидно, эта редукция связана с переносом соответствующих генов в ядро.

Таблица 5.1

Гены, идентифицированные в митохондриальных геномах дрожжей [по Wallace, 1982; Kohli, 1987; Grivell, 1989]

Компоненты митохондрий	Гены
Рибосомальная РНК	*rns (21S) , rnl (15S)*
Рибосомальные белки: малая субъединица	 *var1*
Транспортные РНК РНК-компонент РНКаза-Р-подобного фермента	24
Цитохром *b* (комплекс III)	*cob (*или *cyb)*
Цитохром *c* оксидаза (комплекс IV) — 3 субъединицы	*cox1, cox2, cox3*
АТФ-синтаза — 3 субъединицы	*atp6, atp 8, atp 9*
Интрон-кодируемые *orf*: РНК-матуразы эндонуклеазы белки, подобные обратной транскриптазе (orf *cox1* интр.)	 *mat* ? *aI1, aI2*
Неидентифицированные рамки считывания	3

Интроны митохондриальных генов дрожжей. Все интроны митохондриальных генов дрожжей, выявленные к настоящему времени, относятся к группам I и II. Присутствие этих интронов не является обязательным для организма: сконструированы жизнеспособные штаммы, полностью лишенные митохондриальных интронов [Seraphin et al., 1987].

Некоторые митохондриальные гены прерываются большим количеством интронов, варьирующим у разных штаммов. Так, ген цитохрома *b* может иметь до пяти, а ген *cox1* — до девяти интронов [Wolf, 1995] .

Многие интроны содержат *orf* значительной длины, которые могут перекрываться с 3′-концами прилегающих экзонов, эти *orf* кодируют матуразы и участвуют в сплайсинге, как это наблюдается для хпДНК и мтДНК растений (см. главы 2 и 4). Некоторые матуразы участвуют не только в сплайсинге собственных интронов, но и интронов других митохондриальных генов. Так, матураза 4-го интрона *cyb* гена (bI4) удаляет также интрон aI4α гена *cox1* [Perlman, Butow, 1989].

Интроны ряда митохондриальных генов (*cox1, cob, rnl*) содержат *orf,* кодирующие эндонуклеазы [Wernette et al., 1990; Sargueil et al., 1991]. Именно присутствие этих высокоспецифических интрон-кодируемых ферментов, способных расщеплять двунитчатые ДНК молекулы, очевидно, связано с мобильностью ряда интронов группы I. Первый такой мобильный интрон размером 1,1 т.п.н. (Sc LSU.1) был обнаружен в *rnl* гене, кодирующем рРНК

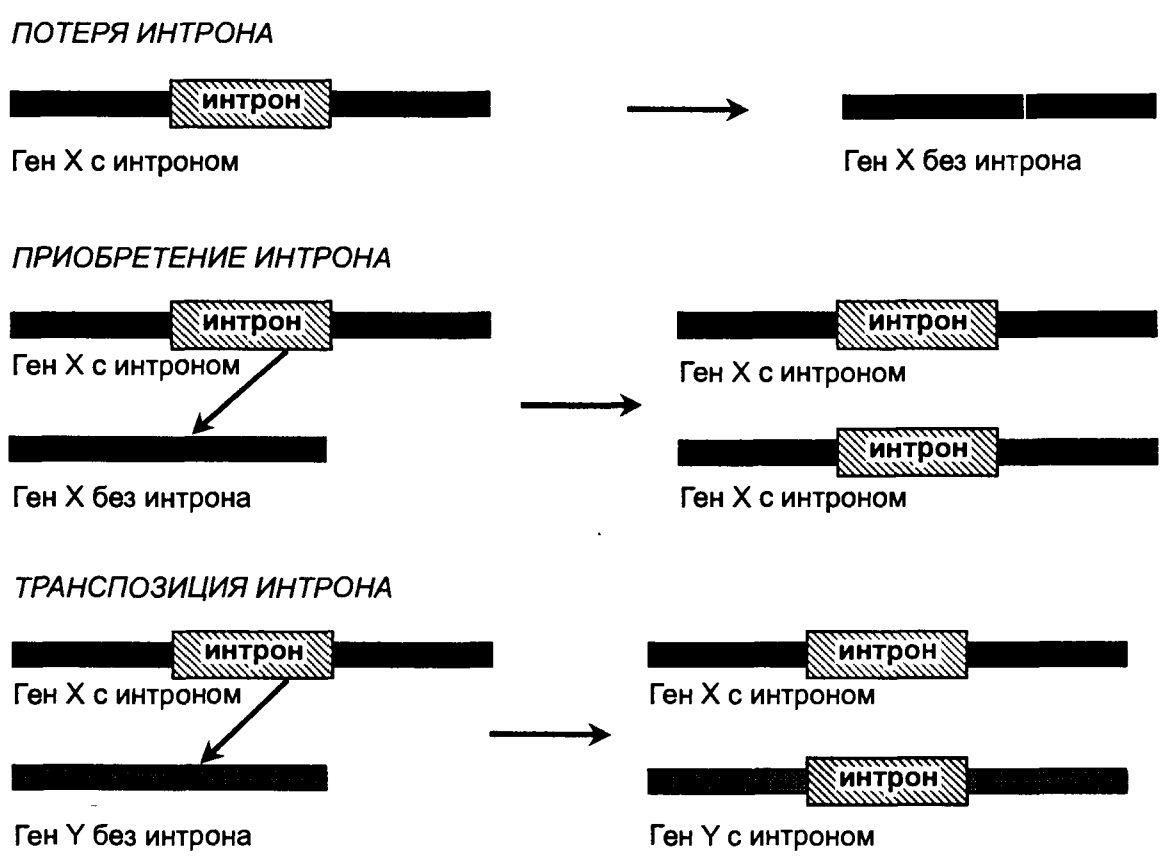


Рис. 5.4. Мобильность интронов. *Потеря интрона* — точная делеция интронной последовательности ДНК из интрон-содержащего гена, при этом ген без интрона остается функциональным. Происходит с низкой частотой. *Приобретение интрона* — добавление интронной ДНК-последовательности к данному сайту гена без интрона, последовательность произошла от интрон-содержащего варианта того же гена, с той же позиции. *Транспозиция интрона* — добавление интронной ДНК-последовательности в сайт гена, не содержащий интрона, последовательность перенесена из другого гена или другой позиции того же гена [по Dujon, 1989]

большой субъединицы митохондриальных рибосом *S. cerevisiae* [Dujon, 1980], затем мобильные интроны были описаны и для других генетических систем: ядерного рРНК гена *Physarum,* двух генов фага Т4 *E.coli* [Perlman, Butow, 1989]. На рис. 5.4 показаны возможные варианты перемещения интронов, а на рис. 5.5 — схема встраивания интрона в реципиентный геном.

Интрон-кодируемые эндонуклеазы содержат протяженные сайты узнавания — до 18 нуклеотидов; относительная важность каждого нуклеотида Sc LSU.I-интрона показана на рис. 5.6. Специфичность этих эндонуклеаз гораздо выше, чем обычных рестрикционных ферментов [Perlman, Butow, 1989]. Фермент разрезает ДНК, оставляя четырехнуклеотидные липкие концы. Эндонуклеазы содержат короткие декапептиды, так называемые LAGLI-DADG-последовательности, которые обнаруживаются и у большинства других *orf* интронов группы I [Hensgens et al., 1983]. Вся эта структура обеспечивает весьма эффективный сайт-специфический перенос интронов

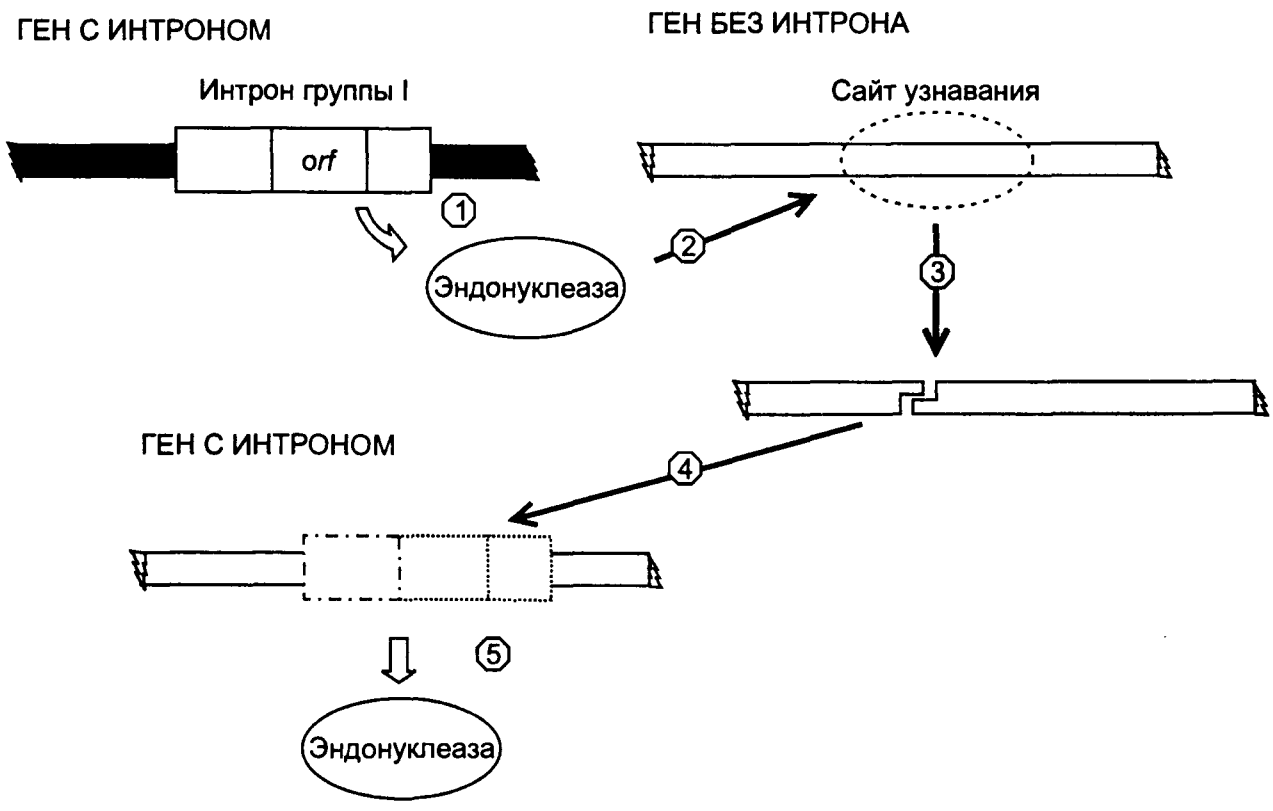


Рис. 5.5. Стадии встраивания интрона. 1— интронная *orf* интрона группы I данного гена (черный) экспрессирует эндонуклеазу; 2 — эндонуклеаза узнает соответствующую последовательность в безинтронной копии такого же гена и присоединяется к ней; 3 — эндонуклеаза производит сдвинутый на 4 нуклеотида разрез с липкими 3′ OH-концами в сайте узнавания; 4 — разрез застраивается с использованием гомологичных последовательностей интрон-содержащих копий того же гена в качестве матрицы, при этом происходит встраивание интронной последовательности. Механизм репарации может захватить фланкирующие интрон районы гена; 5 — внедрившись в ген, новая интронная копия может в свою очередь участвовать в синтезе эндонуклеазы и/или служить в качестве матрицы при репарации разрезанных генов, не содержащих интронов [по Dujon, 1989]

группы I не только в аллельные гены, но и в другие места тех же генов, а также в иные гены, имеющие сайт узнавания данной эндонуклеазой [Dujon, 1989].

Уже к концу 80-х годов были опубликованы первичные последовательности 43 интронов группы I, большинство из них содержали в своем составе белок-кодирующие *orf* [Perlman, Butow, 1989].

Наиболее типична организация aI4α интронной *orf cox1* гена, где интронная матрица является продолжением предшествующего экзона. В таких случаях химерная мРНК транслируется прежде, чем происходит сплайсинг. Гораздо реже встречаются свободнолежащие (free-standing) интронные *orf*, несущие собственные сигналы инициации и терминации трансляции интронных белков (рис. 5.7) [Perlman, Butow, 1989].

Как уже упоминалось, сплайсинг интрона aI4α осуществляет интронная матураза другого гена (*cob*) — bI4. Однако при определенных условиях ак-

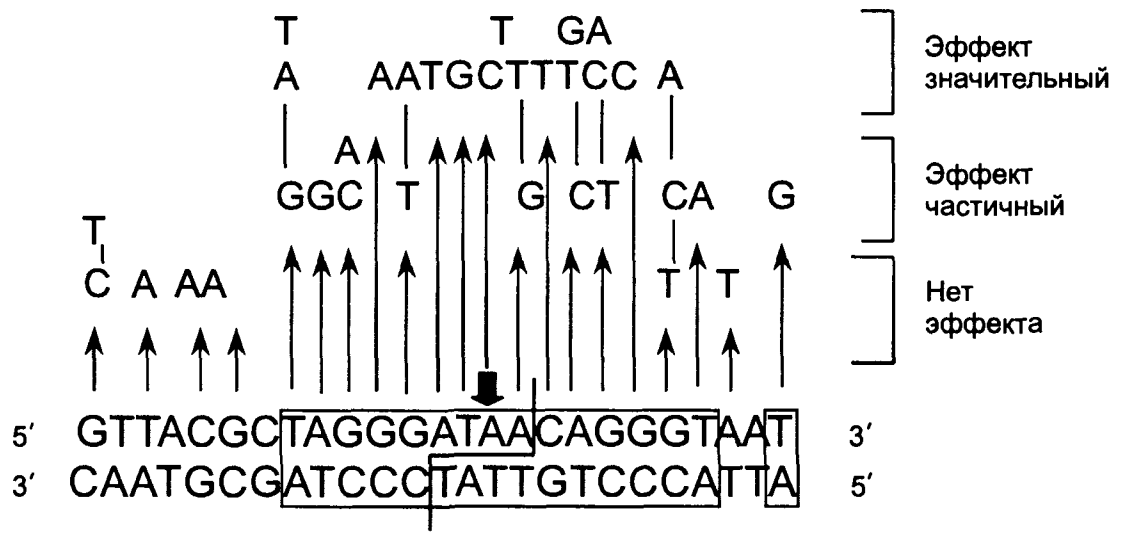


Рис. 5.6. Сайт узнавания эндонуклеазой, кодируемой мобильным интроном Sc LSU.I. Показана последовательность митохондриального гена LSU (*rnl*) вокруг сайта инсерции интрона (черная стрелка) и эндонуклеазного сайта расщепления (ломаная линия) (верхняя цепочка соответствует РНК). Указаны замены оснований по отношению к верхней цепочке. Минимальная узнающая последовательность взята в рамки [по Dujon, 1989]

тивируется матуразная активность aI4α-кодируемого белка, и он выполняет сплайсинг интрона aI4α вместо bI4-матуразы. Таким образом, это первый пример бифункциональности белка, кодируемого интронной *orf*: он обладает мощной эндонуклеазной активностью и латентной способностью к РНК-сплайсингу. Оба этих свойства увеличивают шансы интрона на выживание: благодаря первому интрон переносится в другие организмы, благодаря второму он вовремя удаляется, не мешая носителю, что позволяет ему сохраняться в организме [Perlman, Butow, 1989] .

Мультифункциональность показана и для ферментов, кодируемых *orf* интронов группы II митохондриальной ДНК дрожжей. Только небольшая часть интронов этой группы содержит *orf,* и кодируемые ими белки весьма сходны по структуре [Perlman, Butow, 1989]. Так, изученные интроны *cox1* гена aI1 и aI2 кодируют *orf* соответственно по 778 и 786 аминокислот, более чем на 50% идентичных. Кроме того, что обе интронные *orf* проявляют матуразную активность, эти белки имеют явное сходство с обратными транскриптазами (рис.5.8) [Kennell et al., 1993].

Показано, что aI1 и aI2, так же как интроны группы I, являются мобильными генетическими элементами, однако их перенос осуществляется в форме РНК-копий и реализуется не эндонуклеазами, как у интронов группы I, а обратными транскриптазами. Филогенетически ретротранскриптазные элементы интронов группы II ближе всего к обратным транскриптазам плазмид *Neurospora* (см. далее в этой главе) и к аналогичным элементам бактерий [Kennell et al., 1993].

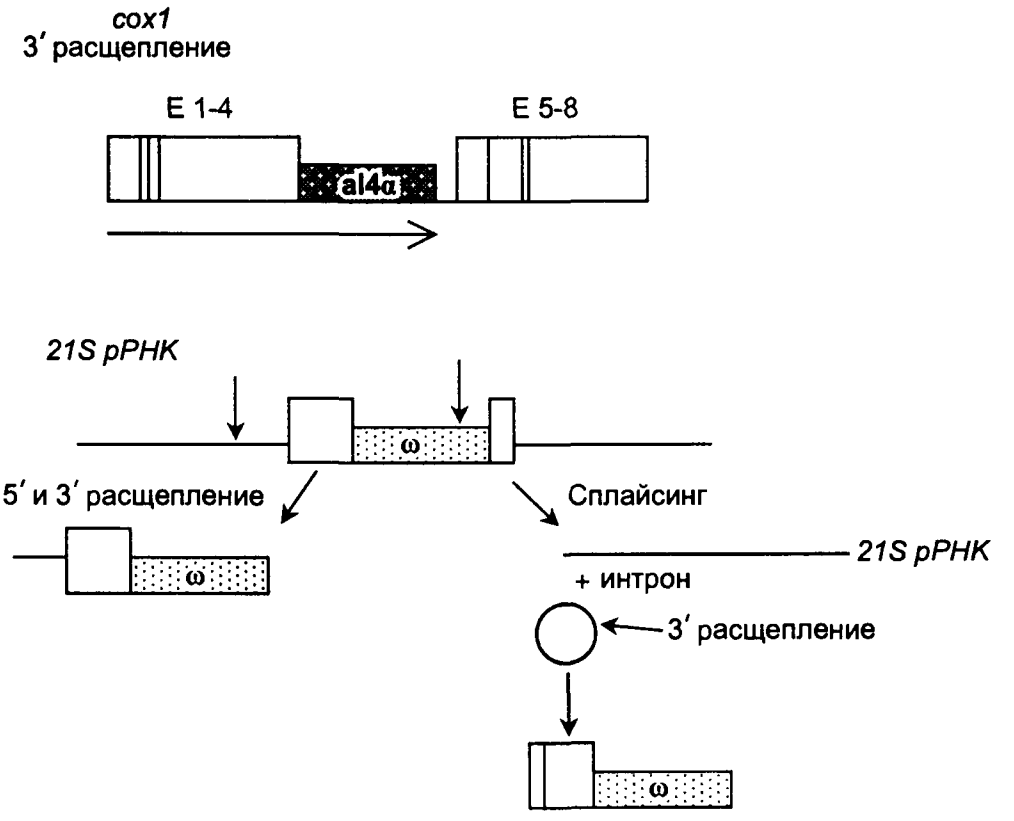


Рис. 5.7. Различные пути экспрессии интрон-кодируемых *orf*. Большая часть *orf* интронов I и II являются продолжением предшествующего экзона. Первичный продукт трансляции *cox1* интрона aI4α, указанный в виде горизонтальной стрелки, является химерным белком, частично кодируемым интроном aI4α, частично экзоном E1-4. Окончательный продукт — эндонуклеаза — образуется после протеолиза химерного белка и состоит только из интрон-кодируемых аминокислот. Указаны также два возможных пути процессинга ω^+ формы, кодируемой интроном *21S pPHK* гена: один путь предшествует сплайсингу, другой следует после вырезания интрона [по Perlman, Butow, 1989]

Предполагается, что белки, подобные обратной транскриптазе, которые кодируют некоторые интроны группы II, могут участвовать не только в перемещениях и потерях интронов, но также в других перестройках митохондриального генома, в частности в сайт-специфических делециях [Mueller et al., 1993; Sellem et al., 1993].

Рекомбинации митохондриального генома дрожжей

Митохондриальные геномы дрожжей чрезвычайно изменчивы не только по размеру, но и по порядку генов при весьма константном наборе этих генов. Структурной основой рекомбинаций мтДНК дрожжей являются ГЦ-богатые межгенные районы [Clark-Walker, 1992]. Изменение порядка митохондриальных генов проиллюстрировано на рис. 5.9 на примере трех видов *Saccharomyces*. Вид *Saccharomyces uvarum* имеет наименьший по размеру митохондриальный геном: 57 т.п.н., два других — соответственно 70 и 85 т.п.н. *Ori/rep*-последовательности и тРНК гены богаты ГЦ-кластера-

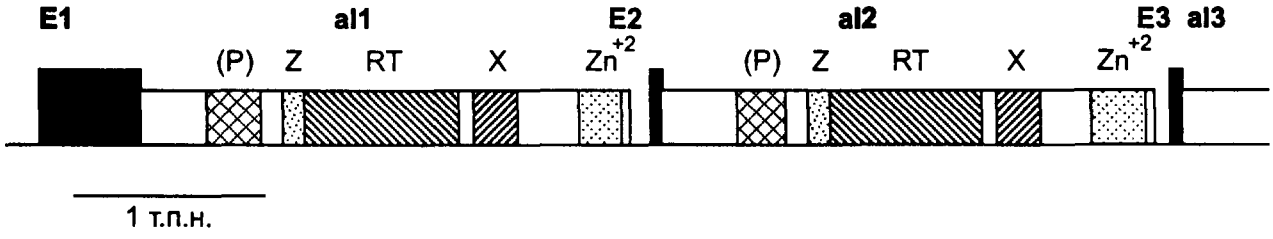


Рис. 5.8. Карта 5′-конца дрожжевого гена *cox1* с интронами **aI1** и **aI2**. Экзоны (**E**) изображены черными прямоугольниками, интронные *orf* имеют область, гомологичную обратным транскриптазам (RT), и предшествующий ей характерный для недлинных ретроэлементов домен (Z), матуразный мотив (X), область, подобную zink-finger (цинковые пальцы Zn^{+2}). (P) — домен, возможно, имеющий протеазную активность [по Kennell et al., 1993]

ми. Очевидно, изменение порядка генов происходило путем перемещения генных блоков, состоящих, как правило, из структурного гена, фланкированного либо генами тРНК, либо *ori/rep*-последовательностями [Cardazzo et al., 1998]:

$$ori/rep - cox3 - \varphi;\ ori/rep - cyb - \gamma;\ \mu - \text{rpm1} - \pi,$$

где греческими буквами обозначены соответствующие тРНК (рис. 5.9).

Давно известны спонтанные крупные делеции митохондриальной ДНК дрожжей, приводящие к фенотипу дыхательной недостаточности, так называемым мутациям "petite". Аналогичные цитоплазматически наследуемые мутации известны и у других грибов, они встречаются также у грибов-гифомицетов [Dujon, Belcour, 1989]. Механизм образования таких делеций пока неясен, вероятно, они сайт-специфичны, и их возникновение связано либо с упомянутыми выше транспозонными свойствами интронов группы II (α-интронами), либо с неправильной рекомбинацией [Sellem et al., 1993; Sainsard-Chanet et al., 1998].

Митохондриальный геном *Neurospora*

Митохондриальная генетика другого классического объекта — нейроспоры разрабатывалась в основном на стандартных лабораторных штаммах *Neurospora crassa.*

Митохондриальная ДНК *N. crassa* на 95% секвенирована, она представляет собой кольцевую молекулу размером 62 т.п.н. Карта митохондриального генома нейроспоры представлена на рис. 5.10, гены и продукты, которые они кодируют, — в табл. 5.2 [Griffiths et al., 1995].

Очевидно, что количество генов в митохондриальном геноме *N. crassa* превышает таковое у дрожжей: тРНК представлены 27 генами, имеется до-

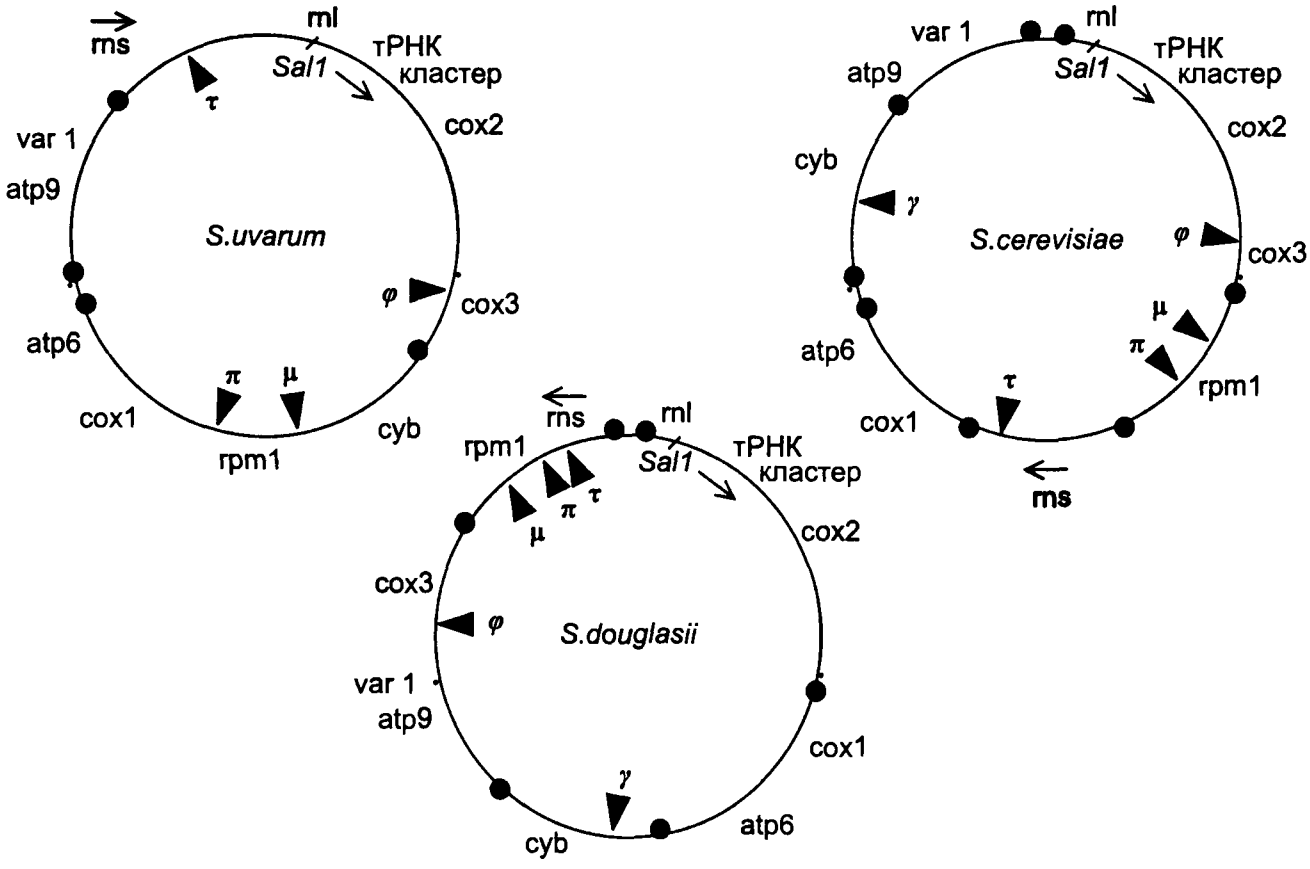


Рис. 5.9. Структурные изменения в митохондриальном геноме различных видов дрожжей. Черные кружки указывают местоположение *ori/rep*-подобных последовательностей, черные треугольники — тРНК генов (γ — РНК^{glu}, μ — РНК^{fmet}, π — тРНК^{pro}, φ — тРНК^{phe}, τ — тРНК^{trp}). Стрелка внутри каждой мтДНК указывает направление для большинства транскрипционных единиц, стрелка над *rns* геном — направление транскрипции только данного гена [по Cardazzo et al., 1998]

полнительно ген рибосомального белка 5S, гены семи субъединиц NADH-дегидрогеназы, ряд *URF.* При этом несколько генов, имеющихся у *Saccharomyces,* у нейроспоры отсутствуют.

У поддерживаемого в большинстве лабораторий штамма *N. crassa* Oak Ridge (74-OR23-1A) все интроны относятся к группе I, однако в некоторых природных изолятах были также обнаружены интроны группы II. Во многих интронах (*ND1, ND4, ND4L, ATP6, ND5* и *cob*) присутствуют ORF, часть из которых пока не идентифицирована В *ND3* интроне обнаружена ORF с двумя сдвигами рамки [Griffiths et al., 1995].

Митохондриальные плазмиды Neurospora

Стандартные лабораторные штаммы нейроспоры не содержат плазмид. Однако в природных изолятах найдены как кольцевые, так и линейные плазмиды, причем у разных видов *Neurospora* и у географически отдаленных изолятов иногда встречаются идентичные плазмиды. При этом в одном и том же штамме возможно сосуществование кольцевых и линейных плаз-

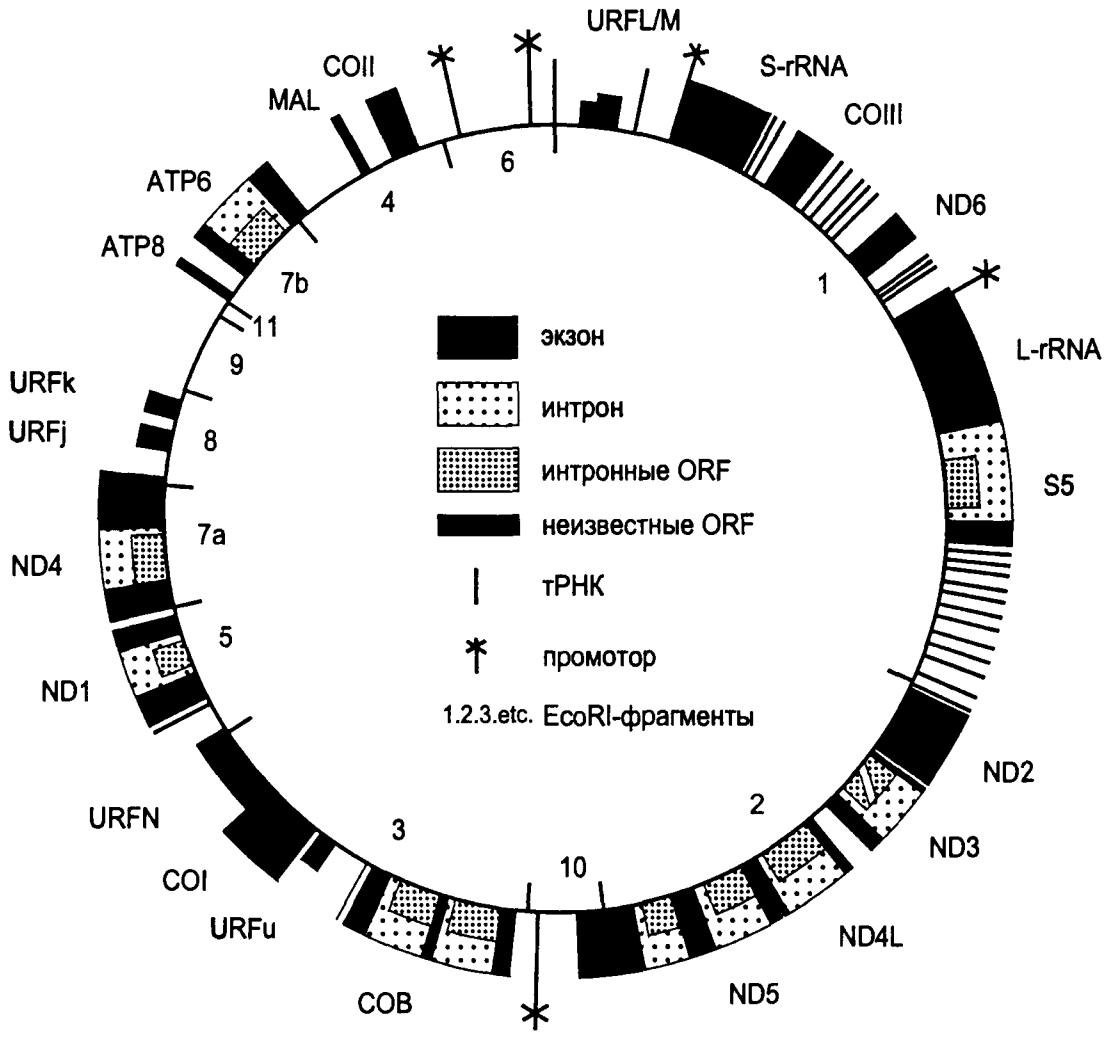


Рис. 5.10. Карта митохондриальной ДНК *Neurospora* [по Griffiths et al., 1995]

мид. Линейные плазмиды могут являться результатом реорганизации кольцевых [Yang, Griffiths, 1993]. Многие плазмиды не оказывают видимых эффектов на клетки хозяина, но в ряде случаев показана связь линейных плазмид со старением гриба, выражающимся в потере способности к росту и в дальнейшей гибели штамма [Griffiths et al., 1995].

Ни одна из плазмид, найденных в естественных условиях, не является фрагментом митохондриальной ДНК *Neurospora,* за исключением 2,2 т.п.н. плазмиды *stp-B1* мутанта [Almasan, Mishra, 1990]. В то же время незначительная часть митохондриальной ДНК скорее всего представляет собой плазмидные последовательности, интегрированные в геном [Nargang et al., 1992].

Геномы митохондриальных плазмид Neurospora

Размер кольцевых митохондриальных плазмид колеблется от 0,9 до 5,3 т.п.н., линейные плазмиды достигают длины 8,6 т.п.н. (рис. 5.11). Плазмиды делятся на несколько групп, названных по географическому местонахожде-

Таблица 5.2

Митохондриальные гены стандартного лабораторного штамма *Neurospora* [по Griffiths et al., 1995]

Ген	Продукт
coI *coII* *coIII*	Три субъединицы цитохром *c* оксидазы
cob	Апоцитохром *b*
ND1 *ND2* *ND3* *ND4* *ND4L* *ND5* *ND6*	Субъединицы NADH-дегидрогеназы
ATP6 *ATP8* *MAL*	Субъединицы АТФазы
L-rRNA *S-rRNA* *S5* *tRNAs*	Большая рибосомная РНК Малая рибосомная РНК Рибосомный белок А Транспортные РНК
URF (неидентифицированные рамки считывания) *URF j* *URF k* *URF L/M* *URF N* *URF u* Несколько интрон-кодируемых *ORF* (подобные эндонуклеазам, матуразам и др.)	

нию изолята, из которого они впервые были выделены. Малые кольцевые плазмиды (VS-ДНК) иногда сосуществуют в митохондриях штаммов, несущих плазмиды группы *Mauriceville* [Griffiths et al., 1995].

Как уже упоминалось, линейные плазмиды *kalilo* (8,6 т.п.н.), обнаруженные в *N.intermedia* на одном из Гавайских островов, вызывают старение штамма. При этом плазмиды встраиваются в мтДНК. В стареющих штаммах *N.crassa* была обнаружена другая линейная плазмида *maranhar* (7 т.п.н.), напоминающая по структуре плазмиду *kalilo* [Court et al.,1991].

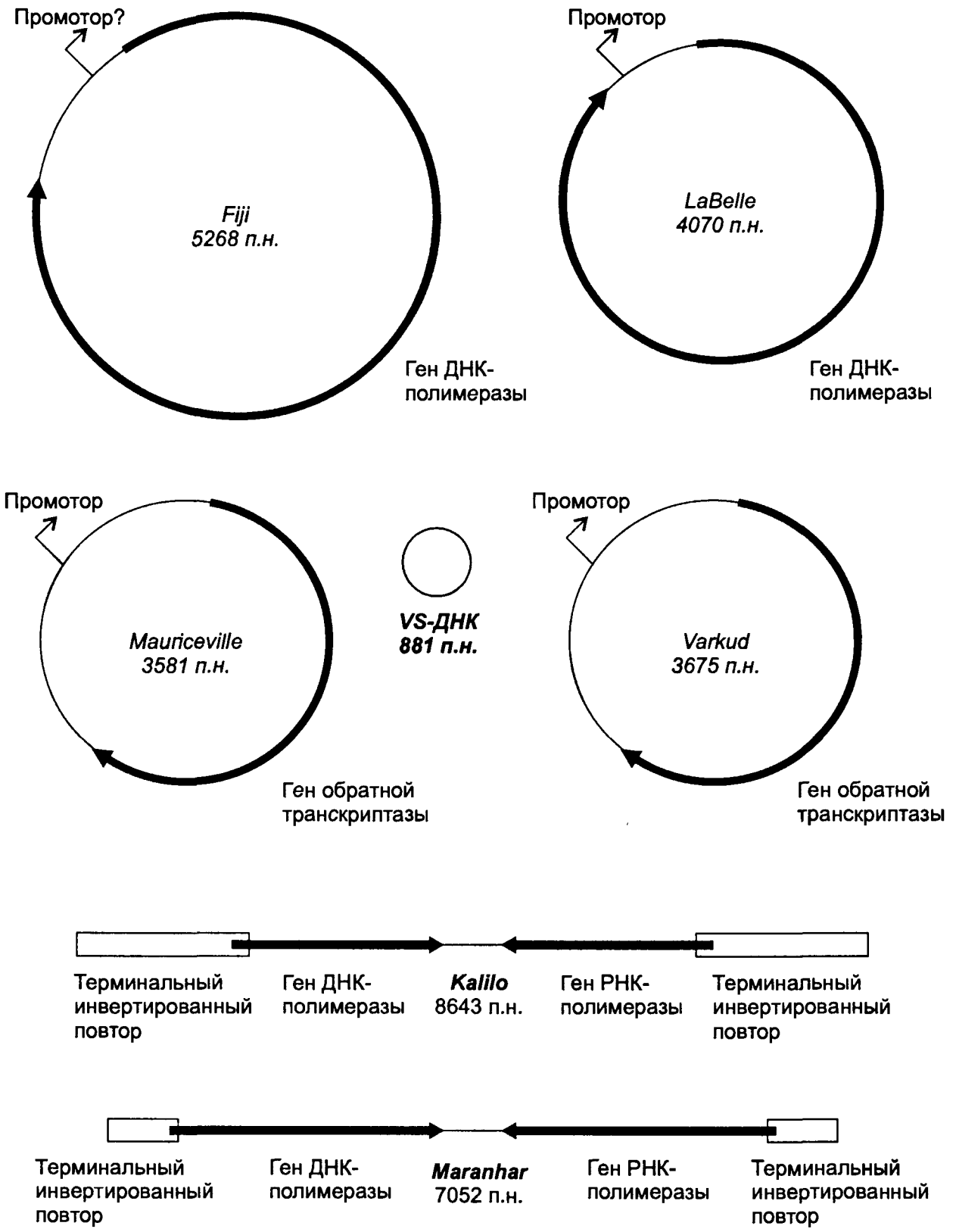


Рис. 5.11. Полностью секвенированные митохондриальные плазмиды *Neurospora*. Указаны генные продукты, кодируемые каждой плазмидой. Возможно, в некоторых плазмидах существуют другие короткие *orf*, но их роль неясна. У *Mauriceville, Varkud* и *LaBelle* показана промоторная активность. Положение промотора для *Fiji* основано просто на сходстве с митохондриальной промоторной последовательностью *Neurospora* [по Kubelik et al.,1990]

Пять основных кольцевых и две линейные плазмиды секвенированы. За исключением VS-плазмиды, все они несут длинную ORF, занимающую большую часть плазмиды. Эти ORF несут полимеразы, которые выполняют репликацию или транскрипцию плазмидной ДНК.

Сходные между собой кольцевые плазмиды *Mauriceville* и *Varkud* кодируют обратные транскриптазы, участвующие в репликации плазмид. Реверта-за плазмиды *Mauriceville* необычна тем, что способна инициировать кДНК-синтез непосредственно напротив 3′-терминального нуклеотида матричной РНК — вероятно, этот фермент является примитивной формой обратной транскриптазы, родственной той, которая образовалась когда-то из РНК-зависимой РНК-полимеразы [Griffiths et al., 1995].

VS-ДНК не кодирует никакой полимеразы, и ее репликация зависит от ферментов других плазмид (*Mauriceville/Varkud*). VS-РНК способна к самосплайсингу и может образовывать мономерные молекулы из мультимерных РНК, транскрибируемых с мультимерных версий VS-ДНК [Griffiths et al., 1995].

Линейные плазмиды *kalilo* и *maranhar* содержат генетическую информацию о структуре ДНК-полимеразы В и РНК-полимеразы, сходной с бактериофаговой и митохондриальной. Концы молекулы *kalilo* содержат длинные (1,4 т.п.н.) терминальные инвертированные повторы, 5′-концы которых связаны с терминальными белками размером около 120 кД. У плазмиды *maranhar* терминальные инвертированные повторы более короткие — 349 п.н., они также связаны с белками. До сих пор неясно, где кодируется информация о терминальных белках [Court, Bertrand, 1992].

Генетическая организация и нуклеотидные последовательности плазмид *Neurospora* привели к предположению, что они родственны митохондриальным интронам и мобильным генетическим элементам [Lambowitz, 1989]. "Вездесущесть" плазмид можно объяснить тем, что они могут передаваться от одних штаммов к другим во время нестабильных вегетативных слияний гифов. Из-за более быстрой эволюции плазмид по сравнению с мтДНК многие из них кажутся неродственными (например, *Fiji* и *LaBelle*), хотя при сравнении аминокислотных последовательностей их полимераз становится очевидным наличие общего предка [Griffiths et al., 1995].

Аномалии митохондриального генома и старение

Впервые явная связь между нестабильностью митохондриального генома и старением штаммов грибов была обнаружена на нитчатом (filamenous) грибе *Podospora anserina.* Сравнительный анализ митохондриальной ДНК

у разных штаммов данного вида показал, что в стареющих культурах накапливаются специфические молекулы плазмидоподобных ДНК [Stahl et al., 1978]. Эти кольцевые молекулы образуются в результате сплайсинга интрона субъединицы I цитохромоксидазы (pl-интрон) и являются мобильными генетическими элементами. Данный интрон кодирует фермент — обратную транскриптазу [Fassbender et al., 1994]. Встраиваясь в различные места мтДНК, он формирует повторяющиеся последовательности [Sellem et al., 1993], которые впоследствии рекомбинируют с образованием дефектных молекул мтДНК с делециями разной длины. Протяженные делеции, выявленные в стареющих культурах штаммов *P. anserina,* приводят к нарушению функций митохондрий, энергетическому дефициту и гибели культуры, начиная с кончиков гифов [Osiewacz, Kimpel, 1999]. При дальнейших исследованиях были выявлены мутантные штаммы *P. anserina,* имеющие значительно большую продолжительность жизни, у которых не наблюдалось ни амплификации pl-интрона, ни реорганизации мтДНК. Наследование фенотипа "долгожителя" у одного из таких мутантов — *grisea* — происходит по менделевскому типу и связано, вероятно, с особенностями ядерного генома [Osiewacz, Kimpel, 1999]. Были также описаны два стареющих мутанта *P. anserina,* у которых изменены компоненты ТОМ-комплекса — наружной мембраны митохондрий (см. главу 8). Накопление специфических мутаций мтДНК у этих штаммов не было связано с амплификацией pl-интрона [Jamet-Vierny et al., 1997].

Еще один механизм старения, связанный с реорганизацией митохондриального генома, выявлен у нейроспоры. В данном случае наблюдалась не утрата фрагментов мтДНК, а инактивация генов, связанная с интеграцией плазмид в митохондриальный геном [Court et al., 1991].

Большинство природных и лабораторных штаммов *Neurospora* не стареют и кажутся бессмертными, но, как упоминалось в предыдущем разделе, описано два случая старения, связанного с линейными плазмидами.

Наиболее детально исследованы штаммы *kalilo* (умирающие), обнаруженные на Гавайях, которые в природных популяциях сосуществуют с нестареющими штаммами *N. intermedia.* Было показано, что в ювенильной стадии плазмида присутствует в митохондриях в большом количестве копий и наследуется преимущественно по материнской линии. Начало старения совпадает с внедрением *kal*ДНК молекулы в мтДНК. Это событие происходит во времени более или менее случайно, да и в мтДНК плазмида внедряется в самые различные локусы. Внедрившаяся плазмида вызывает разрушение — старение и гибель организма, поскольку нарушается функционирование митохондриального генома. Свободные и встроенные плазмиды стареющего штамма передаются потомству вместе с мтДНК через мате-

ринскую цитоплазму. Чем короче жизненные циклы, тем ближе материнский родитель к смерти. При этом обнаруживаются цитохромные и рибосомальные дефекты, наблюдается цианид-нечувствительное дыхание [Griffiths et al., 1995].

Хотя точный механизм встраивания неизвестен, показано, что для этого процесса необходимо совпадение последовательности любых 5 п.н. из терминальных 20 нуклеотидов *kal*ДНК с таковыми мтДНК. Молекула мтДНК со встроенной плазмидой имеет структуру ...C–B–A– *kal*ДНК–A–B–C... (где A,B,C — митохондриальные сегменты), тогда как до встраивания она представляла собой структуру ...X–Y–Z–A–B–C... Неясно, существуют ли молекулы ...X–Y–Z– *kal*ДНК –Z–Y– X...[Griffiths et al., 1995].

Кроме этих молекул в стареющих *kalilo* клетках обнаруживают и другие аномалии: большие сцепленные (concatenated) кольцевые или линейные комплексы *kal*ДНК без мтДНК или минорные варианты делетированных *kal*ДНК разных размеров [Yang, Griffiths, 1993].

Вторая линейная плазмида, вызывающая старение, — *maranhar* — также встраивается в митохондриальный геном, хотя при этом не наблюдается 5′-нуклеотидной гомологии между ее концом и мтДНК. Комплекс *mar*ДНК/мтДНК так же симметрично фланкирован митохондриальными последовательностями, как и *kal*ДНК/мтДНК [Court, Bertrand, 1992].

У патогенного гриба другой систематической группы — *Fusarium oxysporum* — обнаружены две линейные митохондриальные плазмиды, для которых впервые была доказана репликация путем обратной транскрипции [Walther, Kennell, 1999]. Поскольку эти плазмиды также имеют 5-нуклеотидный повтор на одном конце молекулы, как и *kal*ДНК, механизм встраивания может быть аналогичным.

Реорганизация митохондриального генома и связанные с ней процессы старения могут запускаться с помощью разных механизмов, в которых, вероятнее всего, участвует и ядерный геном.

Транскрипция митохондриальных генов и ее регуляция

В митохондриальном геноме дрожжей выявляется 19—20 сайтов инициации транскрипции, все они начинаются высококонсервативной 9-членной последовательностью 5′-ATATAAGTA-3′, 3′-нуклеотид которой является 5′-началом мРНК [Edwards et al., 1982].

Критическая область, необходимая для функционирования промотора, расположена между нуклеотидами –10 и +2 по отношению к точке начала транскрипции [Costanzo, Fox, 1990]. Важность каждого из нуклеотидов

этой последовательности была определена методом точечного мутагенеза с последующим исследованием транскрипции в системе *in vitro*. Оказалось, что наиболее важными позициями являются –2, – 4, –6 и –7 нуклеотиды. Обнаруженная митохондриальная мутация в промоторе *COX2* гена — замена А на Т в положении – 4 — вызывает прекращение транскрипции *in vivo*, подтверждая результаты *in vitro* анализа [Costanzo, Fox, 1990].

У дрожжей были выделены и охарактеризованы два кодируемых ядром белка, связанных с инициацией транскрипции мтДНК: РНК-полимераза и фактор специфичности sc-mtTFB.

Митохондриальная РНК-полимераза Saccharomyces

Митохондриальная РНК-полимераза дрожжей представлена одним ферментом. Ген *RPO41*, кодирующий РНК-полимеразу, был идентифицирован с помощью антисыворотки к РНК-полимеразе, с которой проводили скрининг λ-экспрессионной библиотеки митохондриальной ДНК дрожжей. Как и ожидалось, разрушение этого гена приводило к неспособности клеток осуществлять дыхание [Greenleaf et al., 1986].

Рис. 5.12. Схема строения митохондриальной РНК-полимеразы дрожжей [по Rodeheffer et al., 2000]

Митохондриальная РНК-полимераза состоит из основной субъединицы размером 145 кД и по крайней мере одного специфического фактора инициации транскрипции sc-mtTFB, сходного с бактериальными сигма-факторами [Schinkel, Tabak, 1989; Jang, Jaening, 1991; Shadel, Clayton, 1993]. Как и в случае митохондрий растений, дрожжевая митохондриальная РНК-полимераза в значительной части своей молекулы гомологична РНК-полимеразам бактериофагов Т3 и Т7 [Masters et al., 1987]. Однако имеются и отличия: в молекуле митохондриальной РНК-полимеразы дрожжей выявляется последовательность, определяющая импорт фермента в митохондрию, а также протяженная амино-концевая последовательность, не имеющая гомологии с ферментом фагов [Rodeheffer et al., 2000] (рис. 5.12). Хотя эта последовательность не играет видимой роли в инициации транскрипции, она тем не менее очень важна для стабильности и функционирования митохондри-

ального генома дрожжей [Wang, Shadel, 1999]. Недавно показано, что одной из функций этого участка является взаимодействие с белком Nam1p, роль которого весьма многообразна в митохондриях — это и регуляция сплайсинга интрон-содержащих митохондриальных генов, и обеспечение стабильности мРНК в митохондриях, и контролирование процессинга других митохондриальных генов. Не исключено, что данный белок участвует в координировании транскрипции и трансляции в митохондриях [Rodeheffer et al., 2000].

Гомология наблюдается и в структуре промоторов: у бактериофагов это также высококонсервативный блок нуклеотидов, прилегающий к сайту начала транскрипции. Однако в отличие от фагов РНК-полимераза митохондрий для узнавания промотора нуждается в факторе специфичности. В отсутствие же такого фактора в системе *in vitro* проявляется только неспецифическая транскрипционная активность [Costanzo, Fox, 1990].

Выделен белок размером 43 кД (sc mtTFB), который в системе *in vitro* обладает способностью инициировать транскрипцию по крайней мере восьми испытанных митохондриальных промоторов. Этот фактор не проявляет собственной транскрипционной активности и не связывается с ДНК [Schinkel et al.,1987]. Возможно, еще один связывающийся с ДНК белок массой 70 кД является фактором специфичности для РНК-полимеразы митохондрий дрожжей [Ticho, Getz, 1988].

Регуляция транскрипции

Транскрипция различных митохондриальных генов дрожжей происходит с неодинаковой скоростью прежде всего из-за различий между промоторами. Различия между самым сильным и наиболее слабым промоторами достигают 20-кратной величины как при *in vivo*, так и при *in vitro* определении [Costanzo, Fox, 1990]. Ранее было показано, что наличие в положении +2 пурина делает промотор сильным, тогда как пиримидин на +2 позиции определяет слабый промотор. Именно второй нуклеотид от начала мРНК молекулы определяет скорость транскрипции разных матриц *in vivo* [Biswas, Getz, 1988].

Так, например, ген АТФазной субъединицы 9 митохондрий дрожжей может транскрибироваться с двух промоторов (Op_1 и Op_2), находящихся на расстоянии 78 нуклеотидов друг от друга (рис 5.13, Н). Вышележащий промотор Op_1 в 12—15 раз сильнее, чем Op_2. Частично это объясняется тем, что +2 нуклеотидом сильного промотора является пурин (А), в то время как у Op_2 на этом месте находится пиримидин (Т). Кроме того, оказалось, что на силу промотора влияет не только его нуклеотидная последовательность, но и относительное расположение: цис-эффект сильного промотора на расстоянии

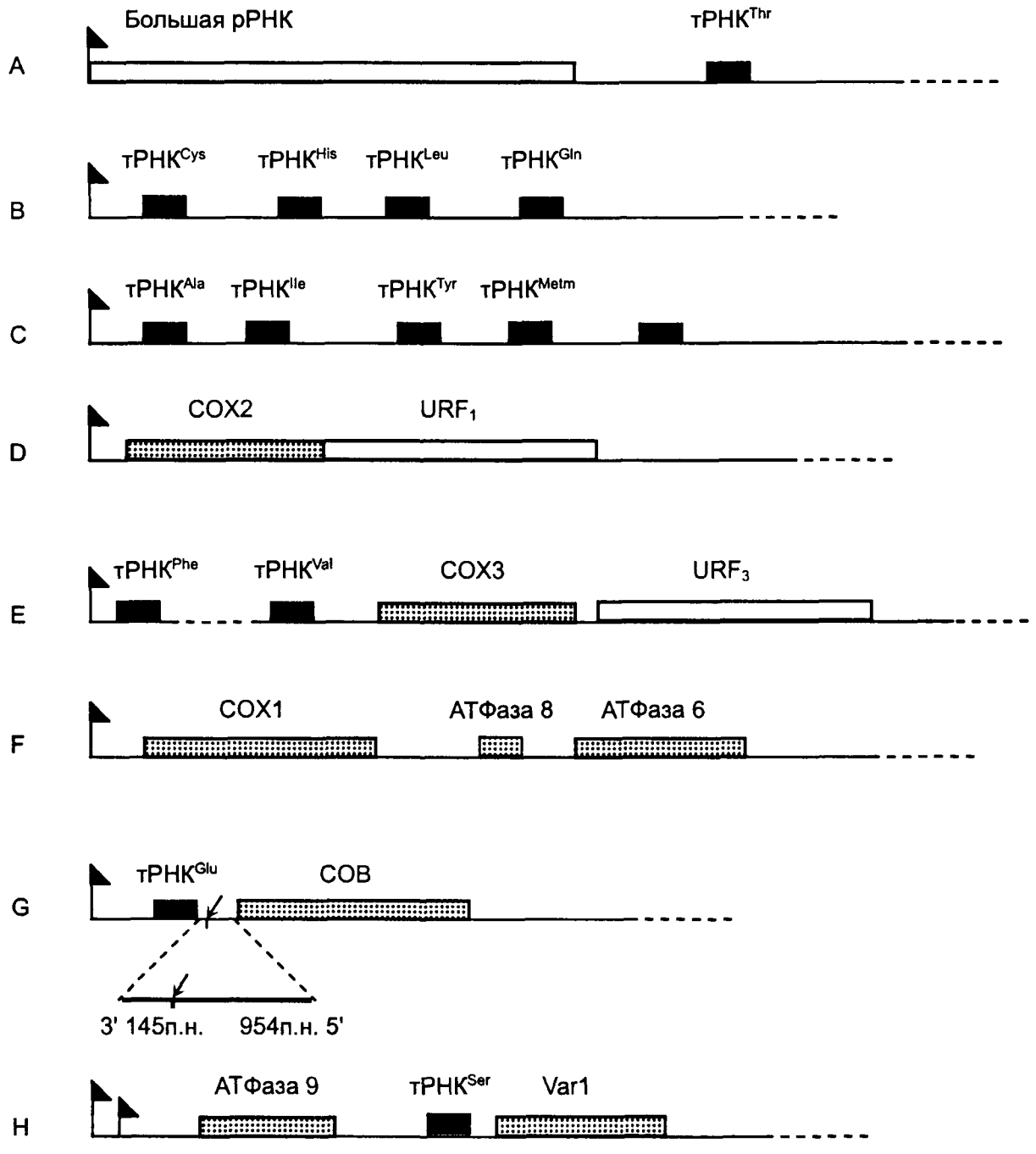


Рис. 5.13. Транскрипционные кластеры в дрожжевых мРНК. Показаны различные генные кластеры (не в масштабе). Во всех случаях точное положение 3'-конца неопределенно. В некоторых кластерах содержатся дополнительные сайты инициации транскрипции, которые не используются в нормальных условиях, но обнаруживают низкий уровень транскрипции в мутантах *petite*. Эти сайты не содержат традиционных последовательностей "сильных" промоторов и могут использоваться в специфических условиях или фазах роста. Показаны 3'UTR гена тРНК^{Glu} и 5'UTR COB (G) [по Grivell, 1989, с дополнениями — см. текст]

до 400 нуклеотидов (эксперименты проведены в системе *in vitro*) может еще в несколько раз подавлять активность слабого промотора. При делеционном мутагенезе удаление сильного промотора в несколько раз повышает эффективность слабого промотора. Возможно, механизм этого подавления слабого сильным заключается в том, что присоединенная к сильному промотору

РНК-полимераза изменяет конформацию транскрипционного комплекса, что еще более снижает способность слабого промотора связывать фермент. Чем дальше слабый промотор находится от сильного, тем этот эффект слабее, и на расстоянии более 600 нуклеотидов он практически исчезает [Biswas, Getz, 1988].

Другим важным фактором регуляции экспрессии на уровне транскрипции является то, что митохондриальные гены транскрибируются в полицистронных матрицах (рис. 5.13). Оказалось, что уровень мРНК тех или иных генов зависит от их удаленности от промотора: он тем выше, чем ближе ген к началу транскрипта. Для некоторых генов эта разница может быть 17-кратной в пределах одной мРНК молекулы. Возможно, причиной этого является ослабление активности РНК-полимеразы [Mueller, Getz, 1986], хотя не следует исключать и возможность избирательной деградации дистально расположенных транскриптов [Costanzo, Fox, 1990].

Специфических ядерных генов, контролирующих транскрипцию специфических митохондриальных генов, не было обнаружено [Costanzo, Fox, 1990]. Транскрипционная активность митохондриального генома изменяется в зависимости от внешних условий. Было показано, что уровень большинства митохондриальных мРНК в 3 — 6 раз выше в дерепрессированных клетках по сравнению с репрессированными глюкозой. Соотношение некоторых мРНК к тотальной РНК остается неизменным при добавлении глюкозы (например, *COX3* мРНК), тогда как количество других мРНК в отсутствие глюкозы пропорционально возрастает (21S рРНК синтезировалась в 7,2 раза быстрее) [Costanzo, Fox, 1990]. Это отчасти связано с увеличением числа мтДНК матриц (приблизительно в 2 раза) [Grivell, 1989].

Уровень РНК-полимеразы (*RPO41* мРНК) также снижен в клетках дрожжей, репрессированных глюкозой. Однако, скорее всего, *RPO41* транскрипция не является в данной системе лимитирующим фактором, так как 10—15-кратное искусственное ее увеличение не приводит к повышению уровня митохондриальных мРНК [Costanzo, Fox, 1990].

Хуже изучена зависимость уровня транскрипции в митохондриях от концентрации кислорода. Показано 2—3-кратное подавление *COX3* мРНК в анаэробных условиях; уровень *COX1* и *CYB* мРНК не изменялся [Costanzo, Fox, 1990].

Терминация транскрипции. 3′-концы большинства белок-кодирующих мРНК молекул митохондрий дрожжей совпадают с 12-членным мотивом AAUAAUAUUCUU. Данный мотив был обнаружен также в двух URF и в двух интрон-кодируемых ORF. Эта последовательность является сайтом эндонуклеазного расщепления. Образовавшиеся в результате мРНК молекулы имеют стабильный 3′-конец [Grivell, 1989].

РНК-процессинг

Все митохондриальные транскрипты дрожжей подвергаются РНК-процессингу, который включает в себя разрезание (cleavage) полигенных матриц на индивидуальные транскрипты, обработку 5′- и 3′- концов мРНК молекул (trimming) и в случае тРНК добавление CCA-триплета [Grivell, 1989].

Как и в бактериях, процессинг 5′-концов молекул транспортных РНК осуществляется специальным ферментом — РНКазой Р, который состоит из белковой части ядерного кодирования и РНК, кодируемой митохондриальным геномом. Выделена эндонуклеаза, осуществляющая процессинг 3′-концов молекул тРНК *in vitro* [Costanzo, Fox, 1990].

Роль 5′-конца в процессинге пре-мРНК митохондрий была показана на примере *cob* гена. Промежуточная последовательность между генами *cob* и $тРНК^{Glu}$ несет 145 оснований 3′-конца вышележащей матрицы $тРНК^{Glu}$ и 954 нуклеотида 5′-конца *COB* мРНК (рис. 5.13, G). Оказалось, что существует ядерный ген *cbp1*, продукт которого специфически реагирует с 5′-фланкирующим участком *COB* мРНК. Мутации *cbp1* гена резко уменьшают уровень зрелых *COB* мРНК молекул, хотя и не препятствуют транскрипции *COB* гена и не влияют на количество второго компонента дицистронной матрицы -$тРНК^{Glu}$. Следовательно, продукт ядерного гена *CBP1* каким-то образом обеспечивает стабильность *COB* мРНК путем взаимодействия с 5′-концом транскрипта [Costanzo, Fox, 1990]. Возможно, это достигается связыванием CBP1 белка с последовательностями *COB* мРНК, которые обычно атакуются эндонуклеазой [Grivell, 1989]. У мутантов с делециями 5′-фланкирующего участка *COB* матрицы также выявлено нарушение накопления стабильных *cob* транскриптов, несмотря на присутствие нормального ядерного гена *CBP1* [Dobres et al., 1985].

Описаны две митохондриальные мутации, подтверждающие важную роль 3′-фланкирующей мРНК последовательности в экспрессии генов. Первая — *FIT1* — это двойная точечная мутация в 12-нуклеотидном мотиве на конце ORF омега-интрона гена 21S рРНК. Продукт интронной ORF — специфическая эндонуклеаза — участвует, как обсуждалось выше, в переносе интронов в другие гены. Мутация *FIT1* приводит к нарушению процессинга данной мРНК и интронных перемещений [Zhu et al., 1987]. Вторая мутация — это 195-нуклеотидная делеция ниже (downstream) белок-кодирующего гена *VAR1*, при которой исчезает 12-членный мотив и резко нарушается экспрессия *VAR1* гена: транскрипты мутантного гена весьма малочисленны и имеют длинные 3′-концы, не прошедшие нормальный процессинг. Описана доминантная мутация *SUV3-1*, способная супрессировать *var1* делецию. Не изменяя структуру мутантной *var1* мРНК и незначительно изменяя ее количество, *SUV3-1* резко увеличивает трансляцию с данной матрицы. Оче-

видно, для эффективной трансляции *VAR1* гена необходим определенный 3′-фланкирующий мотив, а в случае ядерной супрессорной мутации *SUV3-1* это требование снимается и трансляция происходит в любом случае [Costanzo, Fox, 1990].

Процессинг большинства митохондриальных транскриптов нечувствителен к изменению внешних условий, тем не менее показано подавление процессинга *COX1* пре-мРНК при репрессии глюкозой, а также в анаэробных условиях [Costanzo, Fox, 1990].

РНК-сплайсинг

В целом митохондриальные интроны дрожжей являются скорее всего примером молекулярного паразитизма, так как штаммы, не содержащие ни одного интрона, функционируют нормально [Seraphin et al., 1987]. Однако мутации, блокирующие сплайсинг митохондриальных интронов, приводят к фенотипам дыхательной недостаточности [Costanzo, Fox, 1990].

Как уже упоминалось, три митохондриальных гена дрожжей несут интроны групп I и II, которые могут участвовать как в ряде процессов перемещения самих интронов, так и в реорганизации митохондриального генома. Для сплайсинга этих интронов небходимы матуразы, кодируемые внутриинтронными ORF, а также ряд белков ядерного кодирования. Удивительно, что отдельные ядерные гены специфичны для сплайсинга индивидуальных интронов (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Белки ядерного и митохондриального кодирования, необходимые для сплайсинга митохондриальных интронов [по Grivell, 1989]

Гены	Белки	Контролируемые интроны
Митохондриальная ДНК		
Интронные orf	РНК-матуразы	aI1, aI2, aI4, bI2, bI4
Ядерная ДНК		
CBP2		bI5
MSS18		aI5b
MSS51		aI1, aI2, aI4, aI5
MSS116	RNA unwindase	aI1, aI5a/b, bI1, bI2/3
MRS1		bI3
SUP-101		bI1
NAM1		Группы I и II
NAM2	Мт Leu-тРНК-синтетаза	aI4, bI4
CYT18	Мт Tyr-тРНК-синтетаза	Группа I у *N.crassa*

В сплайсинге участвуют митохондриальные белки, функционирующие так же, как аминоацил-тРНК-синтетазы, причем продукт гена *cyt18* контролирует сплайсинг интронов группы I из многих транскриптов, тогда как *NAM2* — лишь двух интронов генов *COX1* и *COB* [Grivell, 1989].

Штаммы, несущие мутации ядерных генов *MSS18* и *MSS116,* остаются дефектными по дыханию даже в случае отсутствия интронов в митохондриальном геноме, что также указывает на их роль и в других процессах генезиса митохондрий. Так, было обнаружено, что продукт гена *MSS116,* контролирующий сплайсинг многих интронов, относится к группе, включающей факторы инициации трансляции и другие белки с хеликазной активностью [Grivell, 1989].

Регуляция трансляции митохондриального генома дрожжей

Трансляционный аппарат митохондрий грибов кодируется в основном ядерными генами: 77 рибосомальных белков, тРНК-синтетазы, гомологи бактериальных факторов элонгации Tu и G [Costanzo, Fox, 1990].

Гены митохондрий дрожжей входят в состав полицистронных комплексов, включающих 2—7 генов, однако РНК-матрицы семи из восьми генов имеют длинную (от 300 до 950) 5′- и более короткую 3′-нетранслируемые области. Все 5′-нетранслируемые области (5′UTL — untranslated leader) имеют по крайней мере по одному AUG-триплету [Grivell, 1989; Kozak, 1989; Wiesenberger et al., 1995].

Механизм, с помощью которого митохондриальные рибосомы дрожжей идентифицируют инициирующие кодоны, неясен. Рибосомы митохондрий дрожжей не сканируют мРНК в поисках инициирующего кодона подобно цитоплазматическим. Нет никаких указаний, что в данной системе задействованы последовательности Shine—Dalgarno [Wiesenberger et al., 1995]. Во многих отношениях инициация трансляции в митохондриях дрожжей напоминает процесс, который описан для ряда вирусных и клеточных мРНК в цитоплазме клеток животных [Macejak, Sarnow, 1991; Pelletier, Sonenberg, 1988].

Описана делеция участка (от –32 до –5), предшествующего инициирующему кодону *cob* гена, которая вызывает прекращение трансляции активного цитохрома *b*. При этом начинает синтезироваться белок несколько меньшего молекулярного веса, чем цитохром *b*, — очевидно, происходит сдвиг инициации трансляции к какому-то из нижележащих AUG-триплетов внутри кодирующей последовательности цитохрома [Mittelmeier, Dieckmann, 1995].

Необычной чертой трансляционной системы митохондрий дрожжей являются специфические белки-активаторы: именно они взаимодействуют с 5′UTR-областями митохондриальных транскриптов и играют решающую роль в регуляции трансляции. Такие активаторы кодируются ядром и обнаружены почти для всех генов, транслируемых на митохондриальных матрицах (табл. 5.4) [Grivell, 1989; Poutre, Fox, 1987; Costanzo, Fox, 1990; Gillham et al., 1994].

Таблица 5.4

Белки, кодируемые ядром, — специфические активаторы трансляции митохондриальных мРНК дрожжей

мРНК митохондрий	Белки — активаторы ядерного кодирования	Дополнительные функции активаторов	Источник
COX1p	PET309p Mss51p	Локализует синтез на внутренней мембране митохондрий	Manthe, McEwen // EMBO J. 1995. Vol.14. P. 4031—4043; Siep et al. // Curr. Genet. 2000. Vol. 37. P. 213—220.
COX2p	PET111p	Локализует синтез на внутренней мембране митохондрий	Mulero, Fox // Genetics. 1993. Vol. 133. P. 509—516.
COX3p	PET54p PET122p PET494p	Участвует в сплайсинге интрона aI5B гена *cox1* Все три фактора локализуют синтез на внутренней мембране митохондрий	Valencik, McEwen // Mol. Cell. Biol. 1991. Vol.11. P. 2399—2405; Costanzo, Fox // PNAS. 1988. Vol. 85. P. 2677—2681; Brown, Costanzo, Fox // Mol. Cell. Biol. 1994. Vol.14. P. 1045—1053.
CYB	CBS1p CBS2p CBP6		Rödel // Curr. Genet. 1986. Vol.11. P. 41–45; Michaelis, Rödel // Mol. Gen. Gen. 1990. Vol. 223. P. 394—400; Rödel // Curr. Genet. 1997. Vol. 31. P. 375—379.
Atp9	AEP1 AEP2		Payne et al. // Curr. Genet. 1993. Vol. 24. P. 126—135.

Белки ядерного кодирования — регуляторы трансляции митохондрий

Роль отдельных ядерных белков в активации митохондриальных транскриптов удалось установить при исследовании митохондриальных супрессоров соответствующих ядерных мутантов. Такие супрессии возникают, если спонтанная делеция участка митохондриальной ДНК приводит к присоединению 5′UTR одного гена к кодирующей части гена, не экспрессировавшегося у данного мутанта (рис. 5.14). Именно таким путем установлена роль ядерных генов в трансляции *cox3* мРНК: лидерная последовательность этого гена у супрессорного мутанта была присоединена к структурной части *cob* гена. Трансляция белка — цитохрома *b* с этой "химерной" матрицы зависела от PET494, PET54 и PET122, что доказывает их участие в активации трансляции *cox3* у немутантных дрожжей [Costanzo, Fox, 1990].

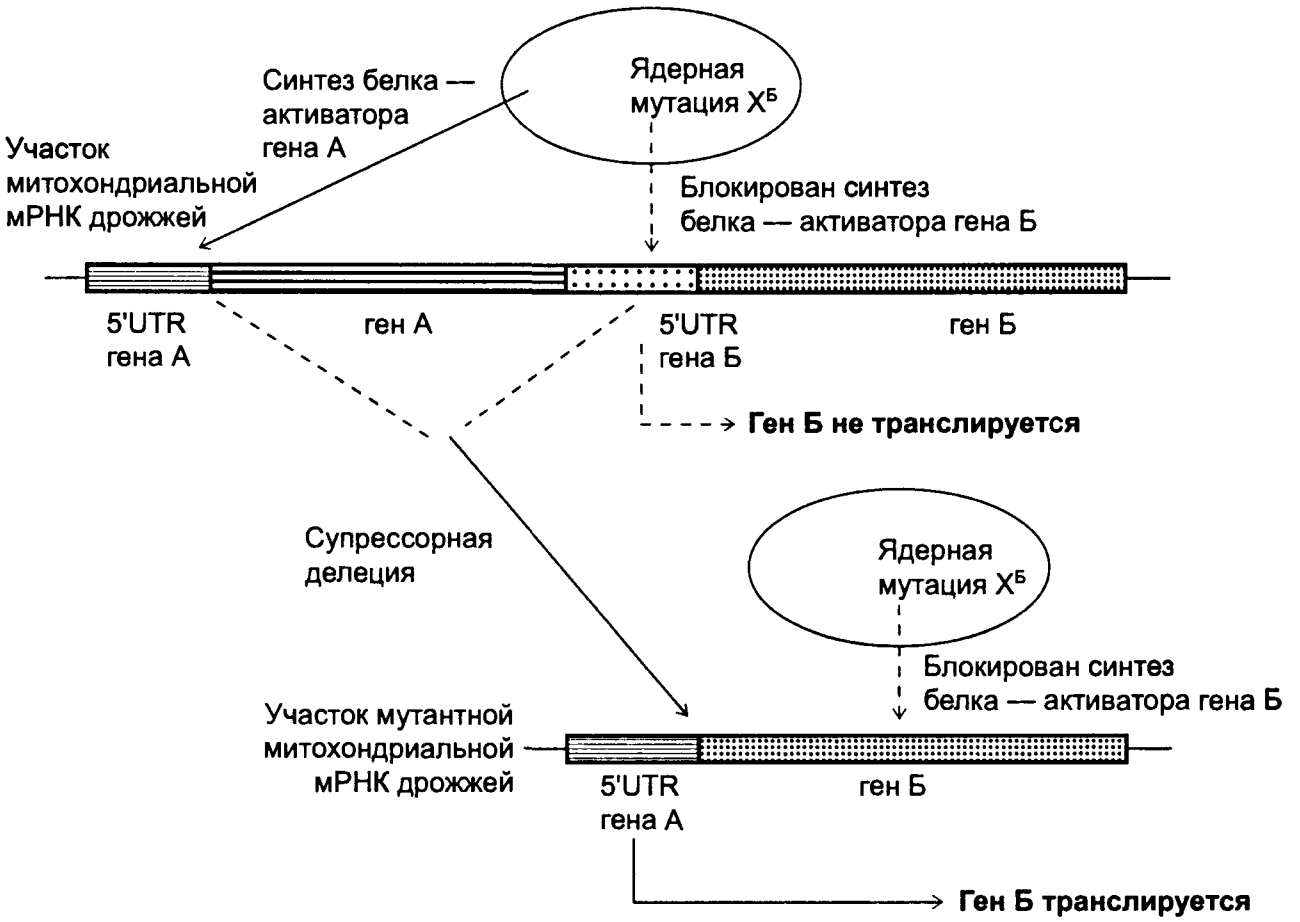


Рис. 5.14. Схема образования супрессорной митохондриальной делеции, в результате которой восстанавливается трансляция митохондриального гена Б, но уже под действием белка — активатора митохондриального гена А [по Costanzo, Fox, 1990]

Ядерный ген *Rpm2,* кодирующий белковую субъединицу митохондриальной РНКазы Р, как было показано, контролирует еще два процесса в митохондриях: трансляцию восьми белковых матриц митохондриального кодирования (табл. 5.5), усиливая синтез четырех из них и подавляя синтез

Таблица 5.5

Белки ядерного кодирования, участвующие в процессинге митохондриальных мРНК дрожжей

Специфические факторы ядерного кодирования	Функции, выполняемые ядерными белками в процессинге митохондриальных мРНК	Другие функции данных ядерных генов	Источник
NAM2	Участвует в сплайсинге интронов *COB* bI4 и *COXI* aI4	Кодирует лейцил-тРНК-синтетазу митохондрий	Herbert et al. // EMBO J. 1988. Vol.7. P. 473—483.
MSS18	Участвует в сплайсинге интрона *COX1* aI5β	Участвует в дыхании (как — пока неясно)	Seraphin et al.// EMBO J. 1988. Vol.7.P.1455—1464.
MSS16	Участвует в сплайсинге нескольких интронов *COXI* и *COB*	Участвует в трансляции митохондриальных генов	Seraphin et al. //Nature. 1989. Vol. 337. P. 84—87.
RPM2p	Точная функция неясна: ***усиливает*** трансляцию *COX1p*, *COX2p*, *COX3p*, *Var1p*, но ***ингибирует*** трансляцию *COB*, *atp6, atp 8, atp 9*	Кодирует белок, необходимый для активирования митохондриальной РНКазы Р и для ферментативного роста дрожжей	Stribinskis et al.// Genetics. 2001. Vol. 158. P. 573—585.

остальных, а также каким-то неясным пока образом регулирует рост дрожжей на ферментативной среде [Stribinskis et al., 2001].

Механизм активации белками транслирования РНК-матриц пока неизвестен, однако для некоторых из них предложены гипотетические модели. Так, вероятно, мембранно-прикрепленный ядерный белок — активатор *cox3* мРНК — PET122 — участвует в связывании малой субъединицы митохондриальных рибосом, в то же время PET122 и PET54 взаимодействуют с 5′UTL *cox3* мРНК. Таким образом, весь активированный трансляционный комплекс оказывается прикрепленным к внутренней мембране митохондрий, где и синтезируется высокогидрофобный белок *cox3* [Wiesenberger et al., 1995].

Вероятно, трансляция и других белков в митохондриях дрожжей осуществляется мембранно-связанными рибосомами, как это давно показано для *Neurospora* [Kuriyama, Luck, 1973].

Транскрипт *cox3* имеет 5′UTR длиной 613 оснований, при этом критичес-

кой областью является участок от –405 до –330, который, очевидно, несет центральную последовательность, необходимую для активации трансляции. Нуклеотиды, фланкирующие этот участок, обеспечивают пространственную конфигурацию молекулы мРНК, оптимальную для образования комплекса с активаторами трансляции либо для сближения с инициирующим кодоном (либо для выполнения обеих функций) [Wiesenberger et al., 1995].

Единственный из известных активаторов трансляции *cox2* мРНК — PET111 — сам отличается необычно длинным 5′UTL (470 нуклеотидов), роль этого участка молекулы пока неясна, но скорее всего связана со сложной регуляцией трансляции самого активатора [Green-Wilms et al., 2001].

Экспрессия одного из активаторов трансляции цитохромоксидазы *cox3* — PET494 — в свою очередь регулируется в зависимости от концентрации глюкозы и кислорода, и это в конечном итоге изменяет количество цитохромоксидазы в клетках дрожжей [Wiesenberger et al., 1995].

Для объяснения регуляции трансляции другого митохондриального гена — цитохрома *b* — была разработана модель, согласно которой 5′UTL *cob* гена связывается с CBSI на внутренней поверхности мембраны митохондрий, в то время как растворимый белок CBS2 служит мостом между малой субъединицей рибосомы и 5′UTL *cob*. Трансляция одного митохондриального гена — *cob* — осуществляется с помощью не менее трех белков ядерного кодирования: CBS1, CBS2 и CBP6 [Michaelis, Rödel, 1990; Rödel, 1997].

Трансляция митохондриальных мРНК дрожжей мембранно локализована. По мнению ряда исследователей, белки — активаторы трансляции митохондриальных генов скорее всего выполняют двоякую роль, прикрепляя транслируемые мРНК к внутренней мембране митохондрий и контролируя уровень синтеза продуктов митохондриального генома. Как при этом контролируется мРНК-специфичность, неясно, особенно в тех случаях, когда различные субъединицы одного фермента, например цитохром *c* оксидазы, регулируются раздельно [Steele et al., 1996].

Описан уникальный растворимый митохондриальный белок (p40), кодируемый ядром, который непосредственно взаимодействует с 5′UTR всех митохондриальных мРНК *Saccharomyces cerevisiae*. Данный белок узнает один и тот же мотив 5′-UUUAUA-3′, находящийся в двуспиральном участке, рядом с которым на 5′-конце находится однонитчатая последовательность. Функция белка p40, вероятно, состоит в стабилизации структур 5′UTR; в отличие от всех рассмотренных выше белков-активаторов p40 блокирует трансляцию [Dekker et al., 1992]. Специфические активаторы трансляции, расположенные на внутренней мембране митохондрий, снимают репрессивный эффект p40. Таким образом, сборка инициирующего комплекса и

сама трансляция оказываются приближенными к тому месту, где должны локализоваться основные белки митохондриального кодирования [Gillham et al., 1994].

Модуляция трансляции. Количество митохондриальных мРНК варьирует незначительно в ответ на изменение концентрации глюкозы или кислорода (см. "Регуляция транскрипции"). Скорость же образования белков, синтезируемых с большинства митохондриальных матриц, изменяется в гораздо большем диапазоне. Например, *COX1*, *COX2, COX3* и *COB* в аэробно растущих клетках транслировались в 19 раз быстрее, чем в анаэробных. Снятие глюкозной репрессии резко стимулировало трансляцию *COX3*, но незначительно изменило уровень ее мРНК [Costanzo, Fox, 1990]. Как уже упоминалось в данном разделе, активаторы трансляции регулируются экзогенными факторами, что позволяет эффективно адаптировать трансляцию митохондриальных белков к изменяющимся условиям.

* * *

Из митохондриальных белоксинтезирующих систем разных систематических групп организмов (растения, животные, грибы) самой изученной является дрожжевая. Однако, несмотря на обнаружение ряда регуляторных белков, общая картина регуляции экспрессии митохондриального генома пока отсутствует. Неясно, чем объясняются различия количества транскриптов с разных участков одной полицистронной матрицы, как координируются процессы транскрипции и трансляции в митохондриях, как активируется трансляция мтДНК специфическими белками. Тем не менее наличие большого числа мутантных и супрессорных штаммов и особенности самого объекта — *Saccharomyces cerevisiae* — позволяют предсказать дальнейший значительный прогресс в данном разделе митохондриальной генетики.

Литература

Almasan A., Mishra N.C. Characterization of a novel plasmid-like element in *Neurospora crassa*, derived mostly from the mitochondrial DNA // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 5871—5877.

Baldacci G., Coli Y., Faugeron-Fonty G. The origins of replication of the mitochondrial genome of yeast // Manipulation and expression of genes in eukaryotes. Sydney: Academic Press, 1983. P. 279—289.

Bendich A.J. Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure // Curr. Genet. 1993. Vol. 24. P. 279—290.

Bendich A.J. Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 255. P. 564—588.

Biswas T.K., Getz G.C. Promoter-promoter interactions influencing transcription of yeast mitochondrial gene, Olil, coding for ATPase subunit 9: *cis* and *trans* effects // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 4844— 4851.

Cardazzo B., Minuzzo S., Sartori G. P. et al. Evolution of the mitochondrial DNA in yeast: gene order and structural organization of the mitochondrial genome of *Saccharomyces uvarum* // Curr. Genet. 1998. Vol. 33. P. 52—59.

Clark-Walker G.D. Evolution of mitochondrial genomes in *Fungi* // Int. Rev. Cytol. 1992. Vol. 141. P. 89—127.

Costanzo M., Fox T. Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* // Annu. Rev. Genet. 1990. Vol. 24. P. 91—113.

Court D.A., Bertrand H. Genetic organization and structural features of a maranhar, a senescence-inducing linear mitochondrial plasmid of *Neurospora crassa* // Curr. Genet. 1992. Vol. 22. P. 385—397.

Court D.A., Griffiths A.J.F., Kraus S.R. et al. A new senescence-inducing mitochondrial linear plasmid in field-isolated *Neurospora crassa* strains from India // Curr. Genet. 1991. Vol. 19. P. 129—137.

De Zamaroczy M., Bernandi G. The GC clusters of the mitochondrial genome of yeast and their evolutionary origin //Gene. 1986. Vol. 41. P. 1—22.

Dekker P., Stuurman J., van Oosterum, Grivell L.A. Determinants for binding of a 40 kDa protein to the leaders of yeast mitochondrial mRNAs // Nucl. Acids Res. 1992. Vol. 20. P. 2647—2655.

Dobres M., Gerbl-Rieger S., Schmelzer C. et al. Deletions of the *cob* gene of yeast mtDNA and their phenotypic effect // Curr. Genet. 1985. Vol. 10. P. 283—290.

Dujon B. Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the omega and ribI loci // Cell. 1980. Vol. 20. P. 185—197.

Dujon B. Mitochondrial genetics and function // The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. New York: Cold Spring Harbor Lab. 1981. P. 505—535.

Dujon B., Belcour L. Mitochondrial DNA instabilities and rearrangements in yeast and fungi // Mobile DNA. Amer. Soc. Microbiology. 1989. P. 861—878.

Dujon B. Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations — a review //Gene. 1989. Vol. 82. P. 91—114.

Edwards J.C., Levens D., Rabinowitz M. Analysis of transcriptional initiation of yeast mitochondrial DNA in a homologous *in vitro* transcription system// Cell. 1982. Vol. 31. P. 337—346.

Evans I.H. Molecular genetic aspects of yeast mitochondria // Yeast genetics. Fundamental and applied aspects. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer, 1983. P. 269—370.

Fassbender S., Brühl K.H., Ciriacy M., Kück U. Reverse transcriptase activity and of an intron encoding polypeptide // EMBO J. 1994. Vol. 9. P. 2075—2083.

Hensgens L., Bonen L., De Haan M. et al. Two intron sequences in yeast mitochondrial *COX1* gene: homology among URF-containing introns and strain-depending variations of flanking exons // Cell. 1983. Vol. 32. P. 379—389.

Gillham N.W., Boynton J.E., Hauser C.R. Translational regulation of gene expression in chloroplast and mitochondria // Annu. Rev. Genet. 1994. Vol. 28. P. 71—93.

Greenleaf A.L., Kelly J.L., Lehman I.R. Yeast *RPO41* gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1986. Vol. 83. P. 3391—3394.

Green-Wilms N.S., Butler C.A., Dunstan H.M., Fox T.D. Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene *COX2* // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, No.9. P. 6392—6397.

Griffiths A.J.F., Collins R.A., Nargang F.E. Mitochondrial genetics of *Neurospora* // The Mycota II. Genetics and Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. P. 93—105.

Grivell L.A. Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis // Eur. J. Biochem. 1989. Vol. 182, No. 1. P. 477—493.

Jamet-Vierny C., Contamine V., Boulay J. et al. Mutations in genes encoding the mitochondrial outer membrane proteins Tom70 and Mdm10 of *Podospora anserina* modify the spectrum of mitochondrial DNA rearrangements associated with cellular death // Mol. Cell. Biol. 1997. Vol.17. P. 6359—6366.

Jang S.H., Jaening J.A. The yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, *MTF1*, is similar to bacterial sigma factors // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 22671—22677.

Kennell J.C., Moran J.V., Perlman P.S. et al. Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria // Cell. 1993. Vol. 73. P.133—146.

Kozak M. The scanning model for translation: an update // J. Cell. Biol. 1989. Vol. 108. P. 229—241.

Kubelik A.R., Kennel J.C., Akins R.A., Lambowitz A.M. Identification of *Neurospora* mitochondrial promoters and analysis of synthesis of the mitochondrial small rRNA in wild-type and the promoter mutant [poky] // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 4515—4526.

Kuriyama Y., Luck D.J.L. Membrane-associated ribosomes in mitochondria of *Neurospora crassa* // J. Cell. Biol. 1973. Vol. 59. P. 776—784.

Lambowitz A.M. Infectious introns // Cell. 1989. Vol. 56. P. 323—326.

MacAlpine D.M., Perlman P.S., Butow R.A. The numbers of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway // EMBO J. 2000. Vol.19. P. 767—775.

Macejak D.G., Sarnow P. Internal initiation of translation mediated by the 52 leader of a cellular mRNA // Nature (London). 1991. Vol. 353. P. 90—94.

Masters B.S., Stohl L.L., Clayton D.A. Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7 // Cell. 1987. Vol. 51. P. 89—99.

Michaelis U., Rödel G. Identification of CBS2 as a mitochondrial protein in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Gen. Gen. 1990. Vol. 223. P. 394—400.

Mittelmeier T.M., Dieckmann C.L. In vivo analysis of sequences required for translation of cytochrome *b* transcripts in yeast mitochondria //Mol. Cell. Biol. 1995. Vol.15. P. 780—789.

Morin G.B., Cech T.R. Mitochondrial telomeres: surprising diversity of repeated telomeric DNA sequences among six species of Tetrahymena // Cell. 1988. Vol. 52. P. 367—374.

Mueller M.W., Allmaier M., Eskes R., Schweyen R.J. Transposition of group II intron aI1 in yeast and invasion of mitochondrial genes at new locations // Nature. 1993. Vol. 366. P. 174 — 176.

Mueller D.M., Getz G.S. Transcriptional regulation of the mitochondrial genome of yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 11756—11764.

Nargang F.E., Pande S., Kennell J.C. et al. Evidence that a 1.6 kb region of *Neurospora* mtDNA was derived by insertion of part of the LaBelle mitochondrial plasmid // Nucl. Acids Res. 1992. Vol. 20. P.1101—1108.

Nosek J., Tomaška L., Fukuhara H., Kovač L. Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line // Trends Genet. 1998. Vol. 14, No. 5. P. 184—188.

Osiewacz H.D., Kimpel E. Mitochondrial-nuclear interactions and lifespan control in fungi // Exp. Gerontology. 1999. Vol. 34. P. 901—909.

Pelletier J., Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA // Nature (London). 1988. Vol. 334. P. 320—325.

Perlman P.S., Butow R.A. Mobile introns and intron-encoded proteins // Science. 1989. Vol. 246. P. 1106—1009.

Poutre C.G., Fox T.D. PetIII, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation

of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome C oxidase subunit II // Genetics. 1987. Vol. 115. P. 637—647.

Rodeheffer M.S., Boone B.E., Bryan A.C., Shadel G.S. Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, No.11. P. 8616—8622.

Rödel G. Translational activator proteins required for cytochrome *b* synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. 1997. Vol. 31. P. 375—379.

Sainsard-Chanet A., Begel O., d'Aubenton-Carafa Y. Two co-existing mechanisms account for the large-scale deletions of mitochondrial DNA in *Podospora anserine* that involve the 5'border of a group-II intron // Curr. Genet. 1998. Vol. 34. P. 326—335.

Sargueil B., Delahodde A., Hatat D. et al. A new specific DNA endonuclease activity in yeast mitochondria // Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 225. P. 340—341.

Schinkel A.H., Koerkamp M.J.A., Touw E.P.W., Tabak H.F. Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and interaction with core RNA polymerase // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 12785—12791.

Schinkel A.H., Tabak H.F. Mitochondrial RNA polymerase: dual role in transcription and replication // Trends Genet. 1989. Vol. 5. P. 149—154.

Sellem C.H., Lecellier G., Belcour L. Transposition of group II intron // Nature. 1993. Vol. 366. P. 176—178.

Seraphin B., Boulet A., Jacq C., Faye G. Construction of a yeast strain devoid of mitochondrial introns and its use to screen nuclear genes involved in mitochondrial splicing // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1987. Vol. 84. P. 6810—6814.

Shadel G., Clayton D.A. Mitochondrial transcription initiation // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 16083—16086.

Stahl U., Lemke P.A., Tudzynski P. et al. Evidence for plasmid-like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina* // Mol. Gen. Gen. 1978. Vol. 178. P. 639—646.

Steele D.F., Butler C.A., Fox T.D. Expression of a recorded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by a mRNA-specific translational activation // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 5253—5257.

Stribinskis V., Gao G.-J., Ellis S.R., Martin N.C. Rpm2, the protein subunit of translation of mitochondrially encoded subunits of cytochrome *c* oxidase // Genetics. 2001. Vol. 158. P. 573—585.

Tarassov I.A., Entelis N.S. Mitochondrially imported cytoplasmic transfer RNA^{Lys}(CUU) of *Saccharomyces cerevisiae* — in vivo and in vitro targeting systems // Nucl. Acids Res. 1992. Vol. 20. P. 1277—1281.

Ticho B.S., Getz G.S. The characterization of yeast mitochondrial RNA polymerase: a monomer of 150000 daltons with a transcription factor of 70000 daltons // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 10096—10103.

Wallace D.C. Structure and evolution of organelle genomes // Microbiol. Rev. 1982. Vol. 46, No. 2. P. 208—240.

Walther T.C., Kennell J.C. Linear mitochondrial plasmids of *F.oxysporum* are novel, telomere-like retroelements // Mol. Cell. 1999. Vol. 4, No. 2. P. 229—238.

Wang Y., Shadel G.S. Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96. P. 8046—8051.

Wernette C.M., Saldahne R., Perlman P.S., Butow R.A. Purification of a site-specific endonuclease, *I–Sce–II,* encoded by intron-4-alpha of the mitochondrial *cox1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 18976—18982.

Wiesenberger G., Costanzo M., Fox T. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mito-

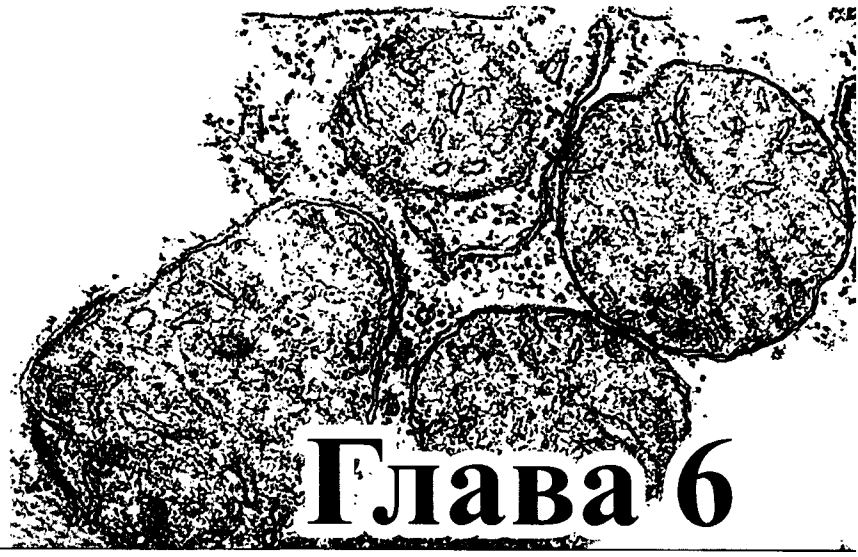
chondrial COX3 mRNA 5'untranslated leader: translational activation and mRNA processing // Mol. Cell. Biol. 1995. Vol. 15. P. 3291—3300.

Williamson D. Timeline: The curious history of yeast mitochondrial DNA // Nat. Rev. Genet. 2002. Vol. 3. P. 475—481.

Wolf K. Mitochondrial genetics of yeast //The Mycota II. Genetics and Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer, 1995. P. 75—91.

Yang X., Griffiths A.J. Plasmid diversity in senescent and nonsenescent strains of *Neurospora* // Mol. Gen. Gen. 1993. Vol. 237. P.177—186.

Zhu H., Macreadie I.G., Butow R.A. RNA processing and expression of an intron-encoded protein in yeast mitochondria: role of the conserved dodecamer sequence // Mol. Cell. Biol. 1987. Vol. 7. P. 2530—2537.



Глава 6

Организация митохондриального генома животных

Более 90 митохондриальных геномов многоклеточных животных было полностью секвенировано к концу 20-го столетия, из них большинство (62) — позвоночные, 9 — членистоногие, 6 — иглокожие и по 1—3 — моллюски, *Cnidaria* (стрекающие) и аннелиды [Lang et al., 1999]. За последующие годы их число значительно увеличилось [Shimko et al., 2001], и для получения последних сведений рекомендуем читателю заглянуть на сайты GOBASE (genome organelle database http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmpproj.html) и MitBASE (http:/www3.ebi.ac.uk/Research/Mitbase/mitbase.pl) [Shimko et al., 2001; Attimonelli et al., 2000].

Как оказалось, митохондриальные геномы животных даже самых отдаленных филогенетических групп весьма сходны и значительно уступают по размерам митохондриальной ДНК большинства грибов и особенно мтДНК растений (см. главы 4, 5). Митохондриальная ДНК животных представляет собой замкнутую кольцевую молекулу размером от 14 до 42 т.п.н. [Wolstenholme, 1992], чаще всего 16—17 т.п.н. (табл. 6.1).

Увеличение размеров митохондриальных геномов некоторых животных обычно происходит за счет некодирующих повторяющихся последовательностей, почти всегда в контрольной области [Wolstenholme, 1992; Pont-

Таблица 6.1

Размеры митохондриальных геномов у животных разных систематических групп

	Тип /класс	Размер генома, т.п.н.	Источник
Sarcophyton glaucum	*Cnidaria/Anthozoa* (коралл)	18,4	Pont-Kingdon et al.,1998
Ascaris suum	Нематоды	14,284	Wolstenholme et al.,1987
Strongylocentrotus purpuratus	Иглокожие	15,560	Jacobs et al., 1988
Drosophila melanogaster	Членистоногие/насекомые	15,9	Garesse, 1988
Xenopus laevis	Хордовые/ земноводные	17,2	Ramirez et al.,1978
Cnemidophorus exsanguis	Хордовые/ пресмыкающиеся	17,4(22,2)	Moritz, Brown, 1986
Gallus gallus domest.	Хордовые/ птицы	16,775	Desjardins et al.,1990
Mus musculus	Хордовые/млекопитающие	16,295	Bibb et al., 1981
Homo sapiens	Хордовые/млекопитающие	16,569	Anderson et al., 1981

Kingdon et al.,1998]. Однако возможны исключения: у ящериц *Cnemidophorus exsanguis* наряду с молекулами мтДНК размером 17,4 т.п.н. обнаружены молекулы размером 22,2 т.п.н. Последние являются результатом дупликации фрагмента длиной 4,8 т.п.н., содержащего, кроме регуляторных последовательностей, два гена рибосомальных РНК и два гена транспортных РНК [Moritz, Brown, 1986].

Содержание ГЦ-пар обычно невелико, в случае его увеличения комплементарные основания, как правило, распределяются асимметрично [Saccone et al., 1999].

Митохондриальные геномы животных несут стандартный набор из 37 генов, не содержащих интронов (табл. 6.2), которые компактно организованы на обеих цепочках двойной спирали [Wolstenholme, 1992; Boore, 1999; Lang et al., 1999].

Таблица 6.2

Гены митохондриальных ДНК животных

Компоненты митохондрий	Гены
Рибосомальная РНК	*rns (16S), rnl (12S)*
Транспортные РНК	22
Цитохром *b* (комплекс III)	*cyt b*
Цитохром *c* оксидаза (комплекс IV)	*cox1, cox2, cox3*
АТФ-синтаза	*atp6, atp 8*
Дыхательная цепь NADH-дегидрогеназы	*nd1, nd2, nd3, nd4l, nd4, nd5, nd6*

Гены митохондриальных ДНК животных — "уплотненная" организация

Большая часть генов расположена на Н-нити мтДНК: это 14 генов тРНК, оба гена рРНК и 11 генов, кодирующих белки. 8 тРНК генов и два белоккодирующих гена (*ND3* и *AT8)* расположены на L-нити (рис. 6.1) [Wallace, 1982; Desjardins et al.,1990]. Малый размер митохондриального генома животных по сравнению с грибами и растениями при сохранении почти всех митохондриально кодируемых белков свидетельствует о его чрезвычайно экономной организации. Так, гены расположены почти вплотную, межгенные спейсеры составляют 1—9 нуклеотидов [Anderson et al., 1981; Desjardins et al.,1990]. Некоторые соседние гены, например такие, как $тРНК^{Met}$ и ND2, ND1 и $тРНК^{Ile}$, размещены "встык", другие же перекрываются своими кодирующими участками, как, например, $тРНК^{Gln}$ и $тРНК^{Met}$, COI и $тРНК^{Ser(UCN)}$, $тРНК^{Cys}$ и $тРНК^{Tyr}$, *atp8* и *atp6, nd4l* и *nd4.* Степень этого пере-

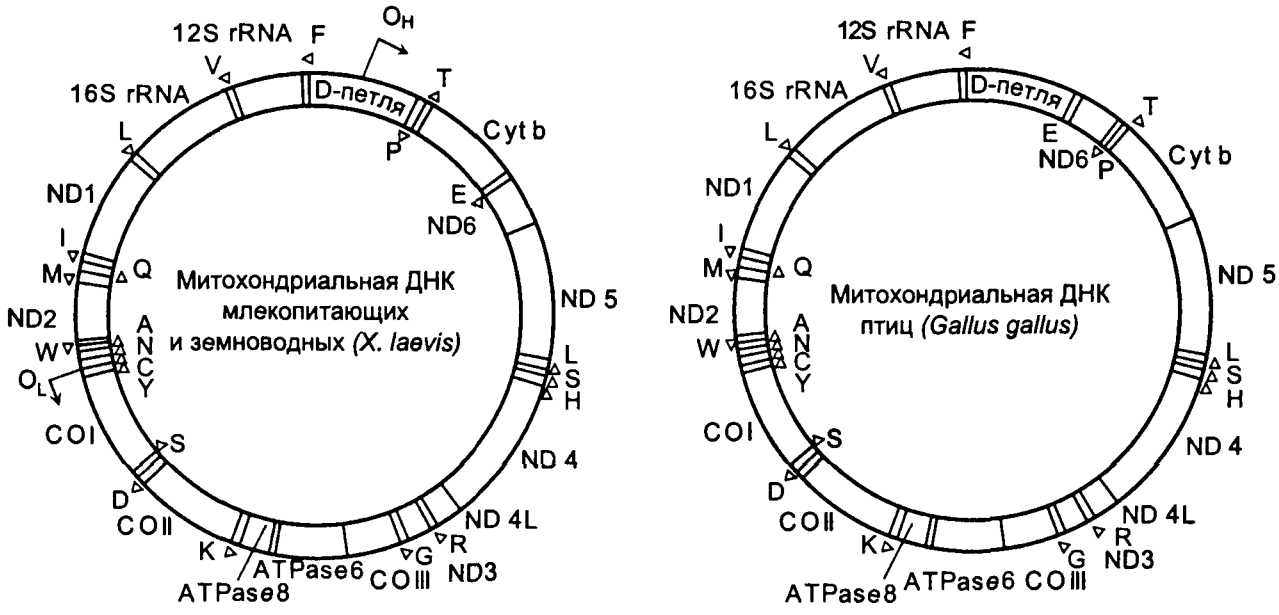


Рис. 6.1. Сравнительная организация митохондриального генома различных классов позвоночных. тРНК гены на обеих нитях ДНК показаны на наружной и внутренней поверхностях и обозначены одной буквой латинского алфавита; полярность генов указана треугольниками. Внутри круга — гены, кодируемые L-нитью и направленные по часовой стрелке, снаружи — гены, кодируемые H-нитью, имеющие полярность против часовой стрелки. O_L и O_H указывают точки начала репликации соответственно L- и H- нитей мтДНК млекопитающих. Не установлена точка начала репликации мтДНК птиц [по Desjardins et al.,1990]

крывания может быть различной для разных пар генов, а также в зависимости от видов животных. Так, гены COI и $тРНК^{Ser(UCN)}$ у птиц (*Gallus gallus)* перекрываются на 9 нуклеотидов, тогда как у мтДНК других позвоночных такого интенсивного перекрывания не найдено. Всего на один нуклеотид перекрываются кодируемые L-нитью гены $тРНК^{Cys}$ и $тРНК^{Tyr}$ у птиц, земноводных и человека, тогда как у других млекопитающих — мыши и быка — эти гены расположены "встык", не перекрываясь [Desjardins et al.,1990]. Только у *G.gallus* обнаружено перекрывание на 7 нуклеотидов генов *nd4l* и *nd4,* эти же гены у других позвоночных расположены в различных ORF. Гены *atp8* и *atp6* перекрываются на 40, 43 и 46 нуклеотидов соответственно у быка, мыши и человека и на 10 нуклеотидов — у птиц и амфибий [Desjardins et al.,1990].

Порядок расположения генов в митохондриальном геноме животных у различных систематических групп может несколько изменяться (рис. 6.1), хотя и не так радикально, как у растений (см. главу 4). Реорганизация области митохондриальной ДНК на участке между границей D-петли и геном ND 5 — первая, описанная у высших животных [Desjardins et al., 1990]. Некоторые блоки генов сохраняются в неизменной последовательности даже у разных типов животных [Boore, 1999]. Даже у весьма далеких от позвоночных полухордовых животных *Balanoglossus carnosus* порядок взаимного

расположения генов в целом такой же, как у млекопитающих, т.е. сохраняется в течение 600 млн лет [Castresana et al., 1998].

Значительные отличия организации митохондриального генома обнаружены у паразитических животных класса *Secernentea* типа *Nematoda*: большинство их генов меньше по размеру, чем у других животных, а один ген (*atp8*) вообще отсутствует; ряд белковых генов имеет необычный инициирующий кодон GTT или TTG вместо ATG; необычна также структура их тРНК (см. ниже) и порядок расположения генов [Lavrov, Brown, 2001]. Но крайним проявлением нетипичной организации является геном картофельной нематоды *Globodera pallida*: мтДНК этого животного существует в виде популяции малых кольцевых молекул различного размера и с разным набором генов, что является уникальным для многоклеточных животных [Armstrong et al., 2000]. Митохондриальный геном *Trichinella spiralis,* принадлежащих к другому классу нематод — *Adenophorea*, является как бы промежуточным по организации между нематодами класса *Secernentea* и типичным для всех основных групп животных [Lavrov, Brown, 2001].

Гены рибосомальных и транспортных РНК

Гены 16S и 12S рРНК с обоих концов фланкированы тРНК генами — на 5′-концах они вплотную "стыкуются" соответственно с $тРНК^{Val}$ и $тРНК^{Phe}$, а на 3′-концах — вплотную соответственно с генами $тРНК^{Leu}$ и $тРНК^{Val}$ (рис.6.1) [Anderson et al.,1981; Wallace, 1982]. Рибосомальные гены содержат высококонсервативные последовательности, перемежающиеся с вариабельными. Очевидно, именно консервативные последовательности играют основную роль в выполнении рРНК-заданных функций. Данные по секвенированию рибосомальных генов свидетельствуют о том, что митохондриальные рибосомы животных не имеют возможности сиквенс-специфически узнавать правильный инициирующий кодон, но непосредственно взаимодействуют с первым инициирующим кодоном на мРНК [Anderson et al.,1981].

Имеющихся в митохондриальной ДНК 22 тРНК генов достаточно для синтеза всех необходимых митохондриальных белков. Действительно, как показано для млекопитающих, импорта молекул тРНК из цитоплазмы не происходит [Anderson et al.,1981]. В молекулах мтДНК позвоночных и *Drosophila* гены тРНК расположены либо поодиночке, либо группами до шести между генами различных белков или рРНК (см. рис. 6.1).

Различаются тРНК гены митохондрий животных по уровню консервативности: наиболее консервативен у позвоночных ген $тРНК^{Met}$, наименее — ген $тРНК^{Ser(AGY)}$, который у млекопитающих, птиц и земноводных имеет необычную структуру с очень короткой DHU-петлей [Desjardins et al.,1990].

Интересной особенностью тРНК молекул в митохондриях животных, как и дрожжей, является то, что 3′CCA-конец добавляется посттранскрип-

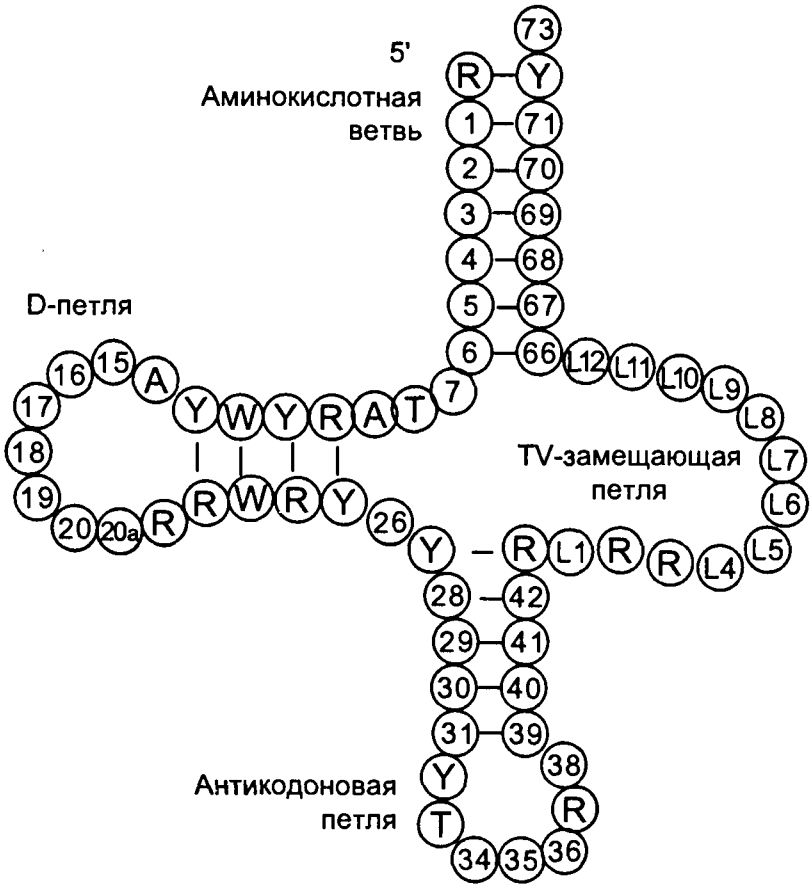


Рис. 6.2. Схема предполагаемой вторичной структуры мт-тРНК генов нематоды *Ascaris suum*. Показано максимальное из наблюдаемого количество нуклеотидов в D- и TV-петлях (TV замещает TψC arm-variable loop). Используемая нумерация (1—42 и 66—73) соответствует нумерации молекулы дрожжевой тРНК^{Phe}. L1—L12 отражают максимальное количество нуклеотидов — 12, наблюдаемых в TV-петле. A — аденин, T — тимин, R — аденин или гуанин, Y — цитозин или тимин, W — аденин или тимин [по Wolstenholme et al., 1987]

ционно, а не кодируется ДНК [Desjardins et al.,1990]. В главе 10 мы рассмотрим другие посттранскрипционные изменения, происходящие с тРНК животных в процессе так называемого РНК-редактирования.

Совершенно необычно устроены гены тРНК митохондрий нематод, как паразитических, так и свободноживущих. Так, у *Ascaris suum* стандартные гены тРНК в митохондриальном геноме отсутствуют. Вместо них между генами многих белков и рРНК у нематод находится 21 последовательность длиной до 250 нуклеотидов, которые невозможно сложить в "клеверный лист", типичный для молекул тРНК. Однако все они укладываются в структуру, отдаленно напоминающую тРНК молекулы, у которых вместо двух петель (TψC-петля, variable loop) имеется одна (TV replacement loop), состоящая из 4—12 нуклеотидов в зависимости от конкретной тРНК. Транспортные РНК митохондрий нематод содержат 52—62 нуклеотида (в среднем 57) вместо обычных 72 (рис. 6.2). Такая аномалия структуры тРНК не связана с паразитическим образом жизни ряда нематод в анаэробных условиях, так как она обнаружена также в митохондриях свободноживущего вида нематод *Caenorhabditis elegans* [Wolstenholme et al., 1987].

У другого вида нематод — *Trichinella spiralis* — 22 тРНК митохондрий делятся на три категории: 1) типичный "клеверный лист", 2) аномальные, имеющие TV-замещающие петли; 3) аномальные, имеющие DHU-замещающие петли [Lavrov, Brown, 2001].

Гены белков митохондрий

13 генов мтДНК животных кодируют белки различных энергетических комплексов (рис. 6.3). В исключительно редких случаях отсутствует какой-то из генов в мтДНК некоторых видов или, наоборот, имеются дополнительные гены или генные копии. Так, у моллюска *Mytilus edulis* и у нематод в митохондриальном геноме отсутствует ген *atp8* [Wolstenholme et al., 1987; Okimoto et al., 1992; Hoffmann et al., 1992]. У моллюсков *M.edulis* и *M.californianus* находится дополнительный ген $тРНК^{Met}$, который узнает АТА-кодон [Pont-Kingdon et al.,1998]. Дупликации могут включать участки белковых генов, рРНК и тРНК гены [Moritz, 1991; Stanton et al., 1994].

Сравнение аминокислотных последовательностей митохондриальных белков у разных классов позвоночных показало, что наиболее консервативными являются белки ND1, CO1, COII, COIII, Cyt *b* (70—85% гомологии аминокислот), наименее консервативны АТФаза 8 и ND6 (27— 47% гомологии) [Desjardins et al.,1990].

Обращает на себя внимание то, что гены митохондриальных белков почти всегда фланкированы с двух сторон генами тРНК, исключение составляют расположенные рядом *cyt b* и *nd 5*, а также *nd 4* и *nd 4L* (см. рис. 6.1).

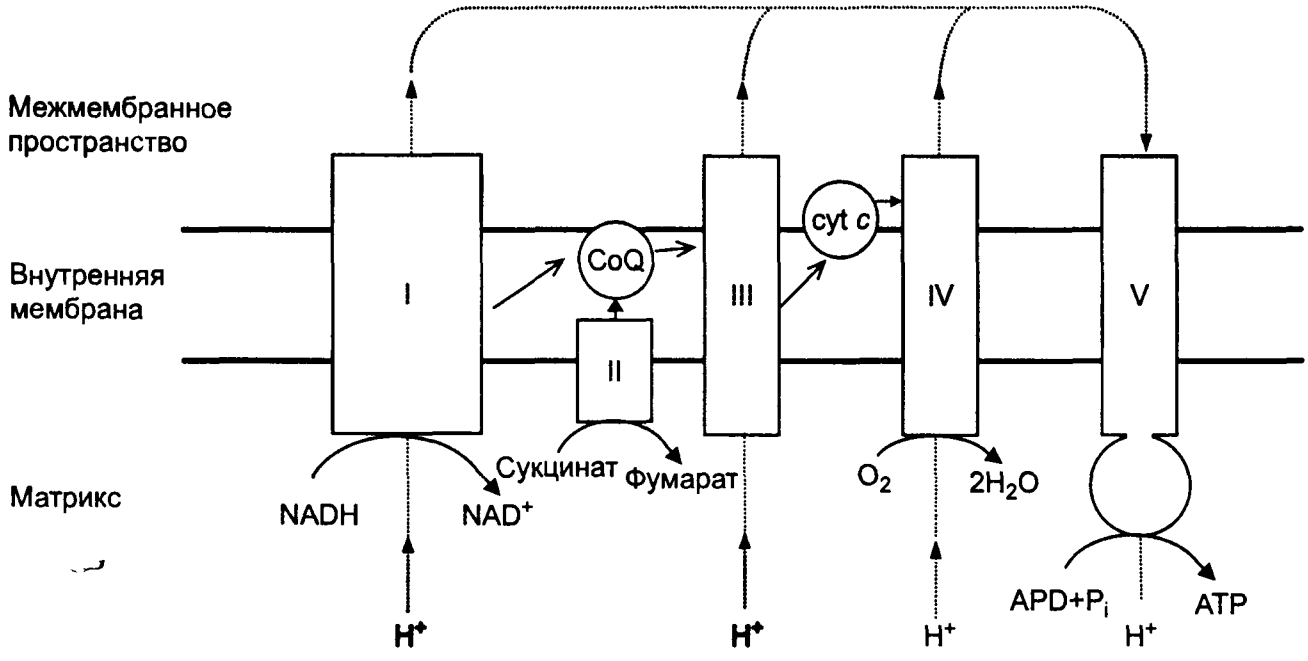


Рис. 6.3. Схематическое изображение структуры и функции дыхательной цепи. Дыхательная цепь состоит из пяти ферментных комплексов (I—V), коэнзима Q(CoQ) и цитохрома *c* (cyt *c*). NADH и сукцинат окисляются комплексами I и II, электроны передаются на коэнзим Q, комплекс III, цитохром *c*, комплекс IV и, наконец, на молекулярный кислород, который окисляется до воды. Протоны перекачиваются из митохондриального матрикса комплексами I, III и IV, и по внутренней митохондриальной мембране образуется протонный градиент. Протоны вновь попадают в матрикс через АТФ-синтазу (комплекс V), и энергия протонного градиента используется для синтеза АТФ [по Larsson, Clayton, 1995]

У многих нематод наряду с типичным ATN-инициирующим кодоном некоторые белковые гены начинаются с TTG или с GTT [Lavrov, Brown, 2001], встречаются атипичные старт-кодоны и у других животных. Однако во многих случаях РНК-матрицы подвергаются посттранскрипционному редактированию (глава 10), при этом восстанавливаются типичные стартовые кодоны.

Область D-петли и репликация митохондриальной ДНК

Единственным протяженным участком мтДНК животных, не имеющим никаких генов, является область так называемой D-петли (**D**isplacement loop). В этой области расположены два промотора: один из них (HSP) инициирует транскрипцию основной кодирующей H-цепи, другой (LSP) — комплементарной легкой L-цепи. В области D-петли находится также точка инициации репликации H-цепи ($O_н$), тогда как точка инициации репликации L-цепи находится обычно вдали от D-петли (см. рис. 6.1).

ДНК-репликация в митохондриях тесно связана с транскрипцией. Вначале на LSP инициируется синтез коротких РНК-транскриптов, которые служат праймерами для начала репликации H-цепи (подробнее этот процесс описан ниже в разделе "Инициация транскрипции на LSP-промоторе"). Вновь синтезируемая часть H-цепи имеет небольшую длину (700 — 1000 п.н.) и была первоначально названа 7S ДНК [Anderson et al., 1981]. Она комплементарно связывается с соответствующим участком L-цепи, оттесняя в этом месте родительскую H-цепочку, так что образуется D-петля. Молекула мтДНК в области D-петли трехнитчатая (рис. 6.4) [Shadel, Clayton, 1993, 1997].

Доля молекул с D-петлей в общем пуле митохондриальных ДНК зависит от типа клеток и стадии клеточного цикла. Так, при увеличении потребности в кислороде частота молекул мтДНК с D-петлей увеличивается. Установлено, что 100000-кратная амплификация митохондриальной ДНК, происходящая в оогенезе земноводных (*Xenopus*), коррелирует со значительным увеличением доли молекул с D-петлей [Shadel, Clayton, 1997; Ye et al., 1996].

Длина D-петли несколько различается у разных видов и определяется короткими (15 п.н.) специфическими TAS-последовательностями (**t**ermination-**a**ssociated **s**equences). Эти последовательности у позвоночных весьма консервативны и расположены в сходных сайтах — на 3′-конце D-петли [Shadel, Clayton, 1997]. Такой консерватизм свидетельствует в пользу существования сиквенс-специфического фактора, контролирующего реплика-

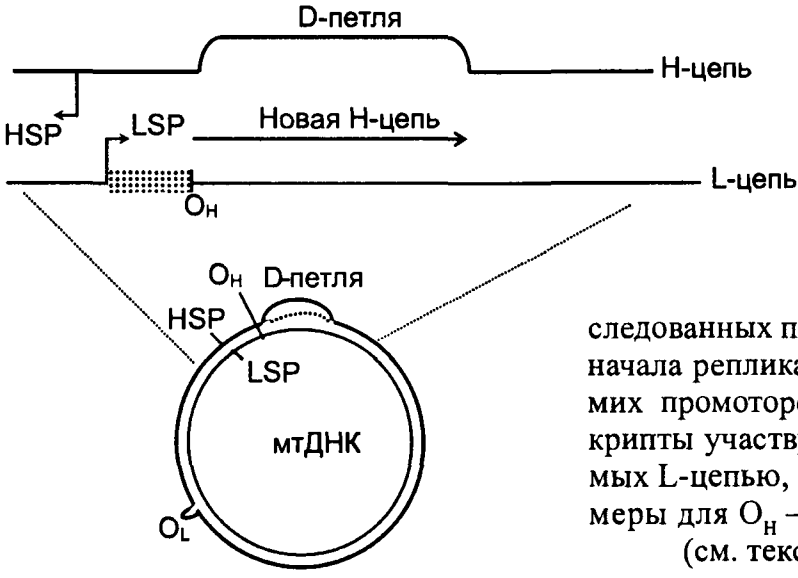


Рис. 6.4. Схема организации D-петли митохондриального генома позвоночных. В верхней части D-петля в большем масштабе. Новая H-цепь связывается с родительской L-цепью и вытесняет старую H-цепь с образованием D-петли. Промоторы HSP и LSP у всех исследованных позвоночных находятся перед точкой начала репликации H-цепи (O_H), однако число самих промоторов может варьировать. LSP-транскрипты участвуют и в экспрессии генов, кодируемых L-цепью, и в репликации ДНК, образуя праймеры для O_H — заштрихованный прямоугольник (см. текст) [по Shadel, Clayton, 1997]

цию H-цепи. Этот фактор, связываясь с TAS, должен определять терминацию репликации H-цепи (т.е. образование D-петли) либо продолжение репликации за пределы D-области. Кодируемая ядром TAS-специфическая ДНК-связывающая активность была выявлена у коров [Madsen et al., цит. по Shadel, Clayton, 1997].

Митохондриальная ДНК-полимераза

Единственным ферментом, катализирующим репликацию митохондриальной ДНК, является ДНК-полимераза гамма (γ). Наряду с полимеразной фермент обладает также экзонуклеазной активностью [Ye et al., 1996]. Гены, кодирующие обе субъединицы данного фермента, находятся в ядре и отличаются консерватизмом. Так, последовательности и полимеразного, и экзонуклеазного домена ДНК-полимеразы γ земноводного *Xenopus laevis* сходны с таковыми дрожжей и с ДНК-полимеразой I *E.coli* [Ye et al., 1996].

ДНК-полимераза γ состоит из двух субъединиц: α-каталитической и β-дополнительной (accessory) массой соответственно 125—140 кД и 35—54 кД. Как полимеразная, так и эндонуклеазная активности связаны с разными доменами большой субъединицы. Мутации в экзонуклеазной части гена приводят к увеличению числа мутаций в мтДНК *in vivo*. Очевидно, при этом нарушается контроль правильности включения нуклеотидов в строящуюся ДНК молекулу (proofreading) [Shadel, Clayton, 1997].

Функция малой субъединицы окончательно не установлена, однако исследования на *Drosophila* показали, что ее С-терминальная область имеет редкую топологию, которая обнаружена только у антикодон-связывающих доменов аминоацил-тРНК-синтетаз [Fan et al., 1999]. Интересно, что тРНК-подобные структуры выявлены в O_H-сайтах у нескольких видов млекопи-

тающих [Lee, Clayton, 1998]. Логично предположить, что малая субъединица ДНК-полимеразы γ участвует в узнавании РНК-праймеров [Fan et al., 1999], тогда как большая затем катализирует репликацию.

Ядерные гены, кодирующие каждую из субъединиц, регулируются поразному. Ген α-субъединицы экспрессируется конститутивно. Экспрессия гена β-субъединицы контролируется регуляторным белком DREF, вовлеченным также в контроль транскрипции шести генов, участвующих в репликации ДНК ядра. Очевидно, ген β-субъединицы ДНК-полимеразы γ является одним из координаторов при взаимодействии ядерных и митохондриальных генетических систем. Он же обеспечивает регуляцию репликации митохондриальных геномов во времени [Lefai et al., 2000].

Для успешного катализа ДНК-полимераза γ нуждается в специфическом белковом факторе, связывающемся с однонитчатой ДНК, — так называемом SSB-белке (**S**ingle-**S**tranded DNA-**B**inding protein). Этот белок также весьма консервативен — сходные аминокислотные последовательности и свойства показаны для SSB таких эволюционно далеких видов, как *E. coli, Xenopus laevis,* крыса и человек. Более того, установлена их функциональная взаимозаменяемость: SSB *E.coli* в 40 раз увеличивал скорость мтДНК-репликации дрозофилы. Вероятно, SSB стимулирует полимеразную активность благодаря увеличению сродства фермента к однонитчатой ДНК — т.е. ускорению узнавания ДНК-полимеразой праймера и связывания с ним [Williams, Kaguni, 1995].

Инициация транскрипции на LSP-промоторе

Митохондриальная РНК-полимераза животных, так же как растений и дрожжей, гомологична фаговым РНК-полимеразам (T7, T3, SP6). Митохондриальные промоторы млекопитающих состоят из двух частей: сайта инициации транскрипции и предшествующей ему области связывания с фактором транскрипции mtTFA. Молекула mtTFA, связываясь с ДНК, изгибает и расплетает ее на 12—39 нуклеотидов выше сайта LSP [Shadel, Clayton, 1997]. Кроме mtTFA митохондрии животных, вероятно, содержат также фактор, гомологичный mtTFB дрожжей, но выполняющий у животных не главную, а вспомогательную функцию в транскрипции (рис. 6.5). Белок массой 40 кД, участвующий в инициации транскрипции и отличающийся от mtTFA, был найден у земноводного *Xenopus laevis* [Shadel, Clayton, 1997].

По достижении транскрипционным комплексом точки O_H дальнейшая судьба его может быть двоякой: 1) транскрипция всей L-цепи с последующей трансляцией восьми кодируемых на ней генов, 2) процессинг коротких транскриптов и придание им роли праймеров для репликации мтДНК, начинающейся с Н-цепи (см. рис. 6.4).

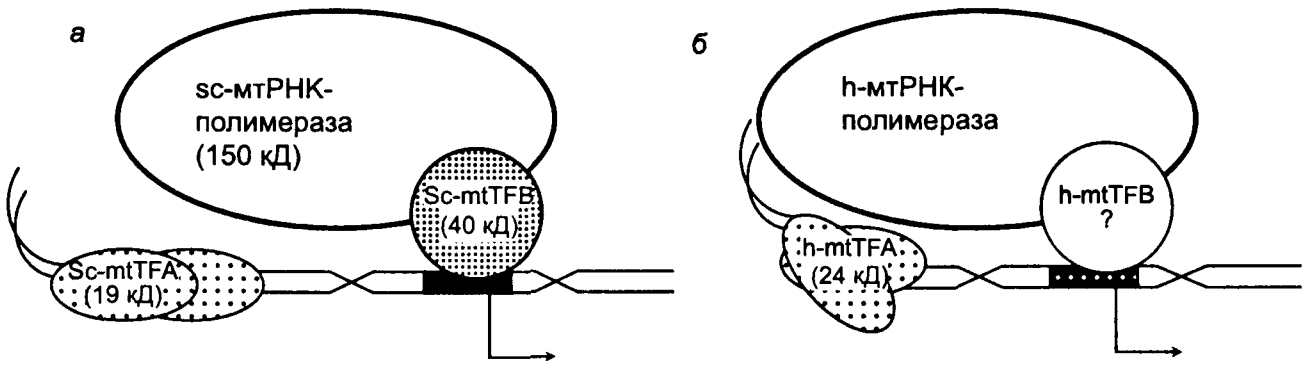


Рис. 6.5. Транскрипционные компоненты митохондрий дрожжей и человека. Промоторные последовательности (темные прямоугольники) расположены около сайтов инициации транскрипции (ломаные стрелки). Конформация молекул ДНК в местах связывания с белками mtTFA изменена. *а* — известные компоненты митохондриальной системы инициации транскрипции дрожжей. Инициируют транскрипцию РНК-полимераза (сходная с бактериофаговой) и белок sc-mtTFB (сходный с бактериальными σ-факторами). Белок sc-mtTFA умеренно стимулирует транскрипцию в присутствии двух других компонентов и может ингибировать ее при высоких концентрациях. *б* — гипотетическая модель компонентов митохондриальной системы инициации транскрипции у человека. В отличие от дрожжей белок h-mtTFA находится рядом с сайтом инициации, так как он связывается с критическими для инициации транскрипции промоторами и играет первостепенную роль в активации транскрипции [по Shadel, Clayton, 1993]

Сравнение последовательностей мтДНК непосредственно за LSP-промотором у разных позвоночных животных позволило обнаружить три консервативных блока — CSBI, CSBII, CSBIII (**c**onserved **s**equence **b**locks). CSBI всегда расположен около точки инициации репликации O_H. Предполагается, что последовательности CSB придают РНК молекуле требуемую пространственную конфигурацию — так называемую R-петлю — для дальнейшего формирования праймера репликации H-цепи. Трехнитчатые чрезвычайно стабильные ДНК-РНК-ДНК-гибриды с участием CSB-кластеров были выявлены в митохондриях позвоночных (рис. 6.6) [Shadel, Clayton, 1997].

Консервативность CSB-зон выходит далеко за рамки митохондриального генома животных — у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* один из ГЦ-кластеров (С) в *ori/rep*-участках (см. рис. 5.3) подобен CSB II и участвует в образовании стабильных РНК-ДНК-гибридов, определяющих начало ДНК-репликации [Shadel, Clayton, 1997].

Следует отметить, что короткие стабильные ДНК-РНК-гибридные молекулы в процессе ДНК-репликации выявлены ранее у прокариот: в плазмиде ColEI [Itoh, Tomizawa, 1980] и фаге T7 [Romano et al.,1981]; у эукариот они обнаружены только в митохондриальной генетической системе [Shadel, Clayton, 1997].

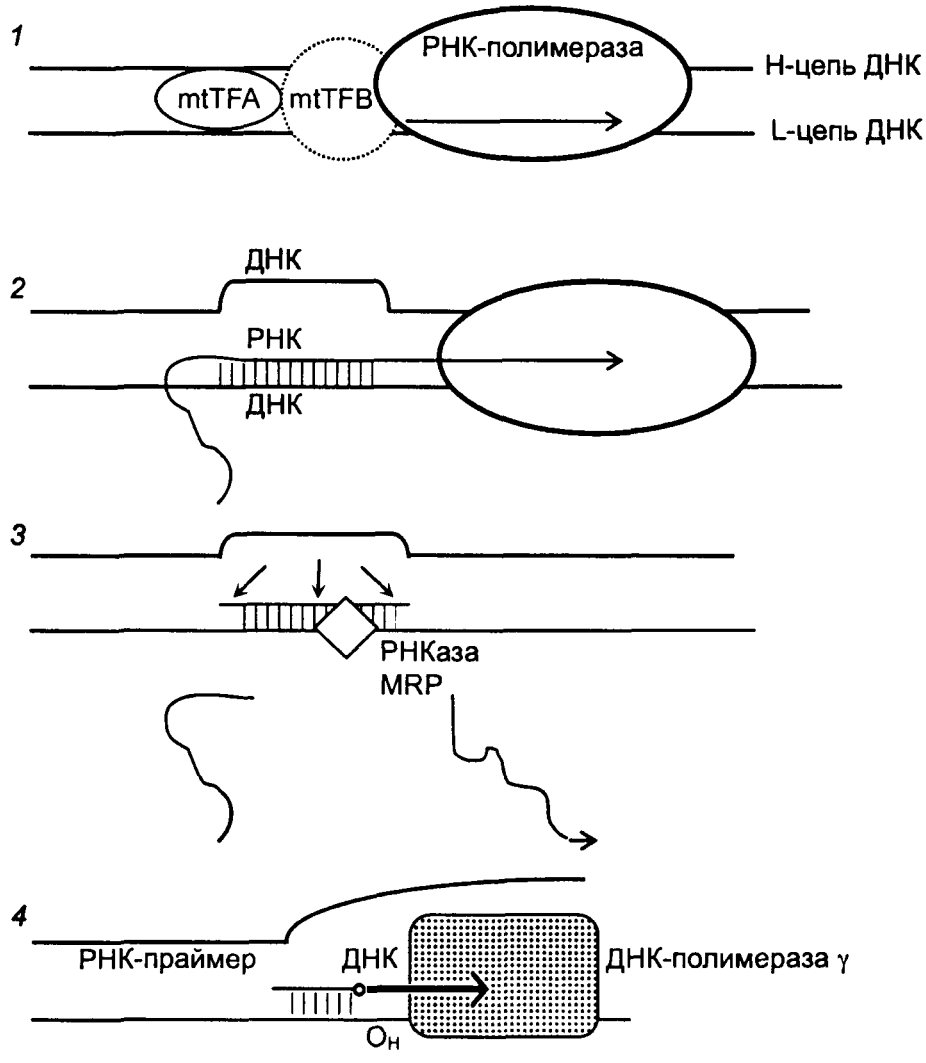


Рис. 6.6. Модель инициации репликации H-цепи митохондриальных ДНК позвоночных. Тонкая стрелка – новый LSP-транскрипт, жирная стрелка – новая H-цепь ДНК. Механизм инициации функционирует в четыре стадии: *1* — инициация транскрипции на промоторе LSP с помощью мтРНК-полимеразы, основного фактора транскрипции mtTFA и, возможно, вспомогательного фактора mtTFB; *2* — прохождение транскрипции через O_H и образование РНК-ДНК-гибрида, в процессе участвуют CSB (см. текст); *3* — РНК-ДНК-гибрид образует R-петлю, конфигурация которой позволяет осуществить процессинг РНК (короткие стрелки), ведущий к образованию РНК-праймеров. Процессинг осуществляется РНКазой MRP; *4* — инициация репликации H-цепи в O_H путем удлинения РНК-праймера с помощью ДНК-полимеразы γ [по Shadel, Clayton, 1997]

Процессинг РНК-праймера

Для того чтобы РНК молекула могла выполнять роль праймера при репликации митохондриальной ДНК, LSP-транскрипт должен заканчиваться в O_H-сайте — либо в результате прекращения транскрипции, либо в результате процессинга. Фермент, специфически расщепляющий РНК в R-петлях, действительно был найден у млекопитающих. Им оказалась РНКаза MRP. После расщепления участок молекулы РНК — транскрипт от LSP до O_H (см. рис. 6.4) остается связанным с ДНК-матрицей и может участвовать в инициации ДНК-синтеза как праймер [Lee, Clayton, 1998].

РНКаза MRP представляет собой рибонуклеопротеин, у которого как белковая, так и РНК-части вполне эволюционно консервативны. Биохимически и по своим антигенным свойствам РНКаза MRP сходна с широко распространенной клеточной РНКазой P, которая катализирует созревание 5′-конца транспортных РНК. Для успешного процессинга РНК-праймера РНКазой MRP необходимо наличие CSBI-последовательности и трехнитчатой структуры ДНК-РНК-ДНК-гибрида. Интересно, что наряду с РНКазой MRP, локализованной в митохондриях, данный фермент обнаружен в ядре, где он выполняет функцию процессинга рибосомальной ядерной РНК [Shadel, Clayton, 1997].

Асинхронность репликации H- и L-цепей митохондриальной ДНК

Как только репликация H-цепи достигает точки O_L, находящейся на расстоянии примерно 2/3 длины молекулы мтДНК от O_H, родительская H-цепь, как и в D-области, оттесняется вновь синтезирующейся H-мтДНК молекулой. При этом образуется совсем небольшая петля — 30 нуклеотидов, которую фланкируют с обеих сторон тРНК гены, — так называемый WANCY-кластер (рис. 6.1). Эта конфигурация H-цепи инициирует репликацию комплементарной L-цепи. Митохондриальная ДНК-праймаза синтезирует короткие РНК молекулы, которые связываются с T-богатым участком O_L-петли, после чего происходит как завершение репликации H-цепи, так и полная репликация всей L-цепи. По окончании репликации каждой из цепей они замыкаются лигазой и образуют кольцевую двунитчатую молекулу [Shadel, Clayton, 1997]. В табл. 6.3 приведена последовательность процессов и факторы, участвующие в репликации митохондриальной ДНК животных.

Регуляция репликации митохондриальной ДНК с помощью специфических белковых факторов

Связь транскрипции с репликацией H-цепи в митохондриях животных свидетельствует о том, что число копий мтДНК может контролироваться частотой инициации транскрипции на LSP-промоторе. В связи с этим большое внимание было уделено структуре инициирующего комплекса и его компонентам (см. рис. 6.4).

Как известно, молекулы дрожжевой мтДНК имеют множественные *ori/rep*-сайты (см. главу 5). Для точной инициации транскрипции с этих сайтов *in vitro* необходимы только два компонента: РНК-полимераза (продукт гена *RPO41)* и специфический белок sc-mtTFB (продукт гена *MTF1*). Фактор sc-mtTFB без РНК-полимеразы с ДНК не взаимодействует, он ассоциирует-

Таблица 6.3

Последовательность процессов и факторы, участвующие в репликации митохондриальной ДНК животных

Этап	Ферменты, белковые факторы, ДНК-блоки	Функция
Инициация транскрипции на LSP	мРНК-полимераза, mtTFA, mtTFB	ДНК локально расплетается выше сайта LSP и начинает транскрибироваться
Образование R-петли (ДНК-РНК-ДНК)	Консервативные ДНК-блоки: CSB I, CSB II, CSB III	Формируется правильная РНК-структура для последующего процессинга
Процессинг LSP- транскрипта	РНКаза MRP, CSB I	Расщепляет РНК-транскрипт в сайте O_H
Образование D-петли ($ДНК_L$-новая ДНК-$ДНК_H$)	ДНК-полимераза γ,TAS	LSP-транскрипт служит праймером для репликации H-цепи мтДНК, TAS служит сигналом терминации репликации
Репликация мтДНК	Хеликаза, ДНК-полимераза, SSB-белок	ДНК локально расплетается, реплицируется H-цепь, затем и L-цепь

ся с РНК-полимеразой лишь непосредственно на ДНК-матрице, обеспечивая специфическое связывание транскрипционного комплекса с промотором (см. рис. 6.5). В результате такого связывания ДНК изгибается. Анализ ряда мутантов промоторной области позволяет связать степень изгиба ДНК с уровнем транскрипционной активности. Еще один компонент системы транскрипции в митохондриях дрожжей, sc-mtTFA (19 кД), является как бы вторичным: действие его проявляется лишь при наличии двух обязательных компонентов и может быть двояким. Обычно он умеренно стимулирует транскрипцию, но при высоких концентрациях может ее ингибировать [Shadel, Clayton, 1993; Zelenaya-Troitskaya et al., 1998].

В отличие от дрожжей в митохондриях позвоночных основным фактором транскрипции наряду с РНК-полимеразой (mtRPOL) является h-mtTFA размером 24 кД, который независимо от фермента транскрипции специфически связывается с ДНК-матрицей перед (upstream) HSP- и LSP-промоторами (рис. 6.5). Показано, что данный белок может раскручивать, сгибать и сворачивать (wrap) ДНК [Shadel, Clayton, 1993]. h-mtTFA гомологичен группе белков, содержащих домен размером около 80 аминокислот, называемый HMG-боксом (**h**igh **m**obility **g**roup). HMG-белки являются обширной и раз-

нообразной группой, они типичны также для ядра и являются ДНК-связывающими белками [Ner, 1992; Jantzen et al., 1990, цит. по Shadel, Clayton, 1993].

В h-mtTFA содержатся два HMG-домена и два богатых основными (basic) аминокислотами участка молекулы: С-конец и линкер между HMG-доменами. Эти участки обеспечивают специфическое связывание h-mtTFA с ДНК, при этом изменяя ее конформацию так, что это позволяет РНК-полимеразе начать транскрипцию [Shadel, Clayton, 1997].

Неясно, как регулируется репликация отдельных мтДНК в общем клеточном пуле. Известно, что в растущей клеточной популяции одни мтДНК молекулы могут реплицироваться дважды за то время, что другие в той же клетке всего один раз [Bogenhagen, Clayton, 1977, цит. по Shadel, Clayton, 1997]. Возможно, в данном случае скорость репликации контролируется удаленностью от ядра, откуда поступают необходимые для синтеза мтДНК компоненты [Shadel, Clayton, 1997].

Возвращаясь к значению белка h-mtTFA, отметим, что наряду с участием его в инициации репликации мтДНК ряд фактов свидетельствует о заметной роли этого белка в конформационной укладке синтезируемых молекул мтДНК. Дрожжевой гомолог sc-mtTFA, вероятно, является компонентом митохондриальных нуклеоидов [Newman et al., 1996]. h-mtTFA может функционально заменить sc-mtDNA-гомолог *in vivo,* так же как и бактериальный хромосомно-связывающийся белок HU. Все эти факты свидетельствуют о том, что наряду со специфической функцией белки данной группы могут выполнять более общую роль поддержания ДНК-структуры [Shadel, Clayton, 1997].

Транскрипция митохондриальных генов

осуществляется митохондриальной РНК-полимеразой, которая гомологична бактериофаговой (см. раздел "Инициация транскрипции на LSP промоторе"). Каждая цепь мтДНК млекопитающих, как уже упоминалось, имеет по одному промотору (HSP и LSP), оба они расположены в зоне D-петли (см. рис. 6.4). С LSP-промотора начинается синтез полицистронной РНК молекулы, состоящей из восьми тРНК и одной белковой мРНК, с HSP — полицистронный транскрипт всех остальных генов. LSP, кроме того, участвует в инициации репликации мтДНК, что подробно описано выше. Каждый промотор у млекопитающих инициирует транскрипцию только в одном направлении (рис. 6.7) [Larsson, Clayton, 1995].

Следует отметить, что структура промоторов отличается у различных классов позвоночных: у земноводных (*Xenopus)* также имеется два промото-

ра, однако оба они инициируют транскрипцию в двух направлениях [Antoshechkin et al., 1997], у птиц — всего один, но тоже двунаправленный промотор (рис. 6.7). Как у птиц, так и у земноводных инициация транскрипции осуществляется с помощью консервативной 8-нуклеотидной последовательности (ACPuTTATA), которая несколько напоминает 9-нуклеотидную промоторную последовательность дрожжей (см. главу 5) [Shadel, Clayton, 1993]. Механизм взаимодействия РНК-полимеразы с промоторными последовательностями и белковыми факторами транскрипции рассмотрен в связи с вопросом инициации репликации ДНК (см. выше).

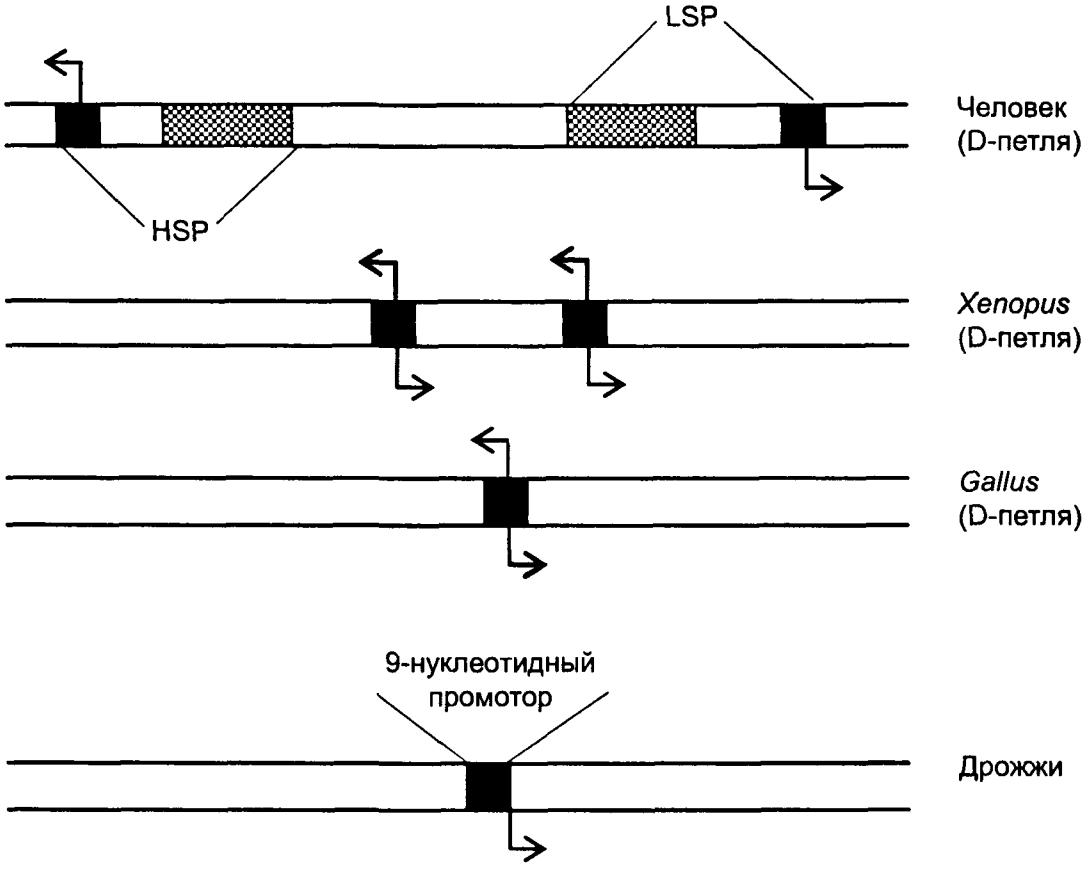


Рис. 6.7. Сравнение структуры промоторов митохондриальных ДНК трех классов позвоночных и дрожжей. Единственными основными промоторами митохондриального генома позвоночных являются промоторы D-петли, тогда как у дрожжей — множественные промоторы. Каждый из двух противоположно направленных промоторов мтДНК человека содержит две ключевые последовательности, обеспечивающие его активность. Один элемент (черный квадрат) окружает сайт инициации транскрипции (изогнутая стрелка) и совершенно необходим для транскрипции. Другой (заштрихованный прямоугольник) предшествует сайту инициации транскрипции и обеспечивает высокий уровень транскрипции. Этот второй сайт связывается с фактором инициации транскрипции мтTFA. В отличие от однонаправленных промоторов человека и дрожжей у земноводных и птиц (*Xenopus, Gallus)* промоторы двунаправленные (изображены упрощенно). У *Xenopus* оба черных квадрата — это перекрывающиеся октануклеотидные последовательности, способные инициировать транскрипцию с каждой из нитей в противоположных направлениях. У птиц октануклеотидные мотивы H- и L-нитей не перекрываются [по Shadel, Clayton, 1993]

Транскрипты различных генов, инициируемые с HSP, присутствуют в митохондриях в неодинаковом количестве. Еще в начале 1980-х годов было показано, что существуют два полицистронных транскрипта с Н-цепи мтДНК: короткий, включающий только 12S и 16S рРНК, и полный, несущий все гены Н-цепи [Montoya et al., 1983]. Количество 12S и 16S рРНК, как правило, в 50—100 раз превышает число транскриптов других генов [Larsson, Clayton, 1995].

Существуют две модели, объясняющие эти различия. Согласно первой, различия объясняются специфической терминацией транскрипции. В гене $тРНК^{Leu}$, расположенном непосредственно за 16S рРНК, выявлена последовательность, связывающаяся с белком 34 кД (mtTERF). Образующийся ДНК/белковый комплекс вызывает терминацию транскрипции. Лишь иногда полимераза проходит через данную последовательность, и синтез транскрипта продолжается [Kruse et al., 1989].

Согласно второй модели, на Н-цепи существует не один, а два сайта инициации транскрипции. Синтез короткого полицистрона (12S+16S) начинается с точки I_{H1}, расположенной выше гена $тРНК^{Phe}$, соответствующей точке инициации транскрипции предыдущей модели. Синтез длинной полицистронной молекулы начинается в точке I_{H2}, расположенной между генами $тРНК^{Phe}$ и 12S рРНК. В случае старта в I_{H1} транскрипция обычно заканчивается на 3′-конце 16S рРНК благодаря действию фактора mTERF, если же начало в точке I_{H2}, транскрипция продолжается через всю матричную молекулу [Bogenhagen et al., 1984; Montoya et al., 1983]. В соответствии со второй моделью соотношение рРНК и других транскриптов зависит от переключения точек инициации транскрипции. Недавно некоторое подтверждение второй модели было получено при изучении влияния тироидного гормона на транскрипцию мтДНК человека [Enriquez et al., 1999].

Процессинг митохондриальных транскриптов

В процессинге митохондриальных транскриптов задействованы тРНК гены. Именно по 5′- и 3′-границам этих генов происходит расщепление первичных транскриптов. Очевидно, этому способствует специфическая вторичная структура тРНК, которая узнается РНКазой Р [Anderson et al., 1981]. Все РНК, кроме 12S и тРНК, затем полиаденилируются, к тРНК добавляются недостающие из триплета ССА нуклеотиды. В последнее время получены данные о 3′-аденилировании некоторых митохондриальных тРНК у различных животных (моллюсков, птиц) [Price, Gray, 1998] и о других посттранскрипционных изменениях РНК молекул, которые рассматриваются в главе 10.

Митохондриальный геном человека

Несомненно, наиболее интенсивно исследуемым и детально изученным объектом органельной генетики является митохондриальный геном человека. Митохондриальная ДНК человека имеет все признаки, характерные для мтДНК млекопитающих: типичный размер — 16569 п.н., кольцевую структуру, 37 генов (рис. 6.8), реплицируется с образованием D-петли и экспрессируется с помощью ряда ядерных факторов [Anderson et al., 1981; Wallace, 1982; Larsson, Clayton, 1995; Wallace, 1995].

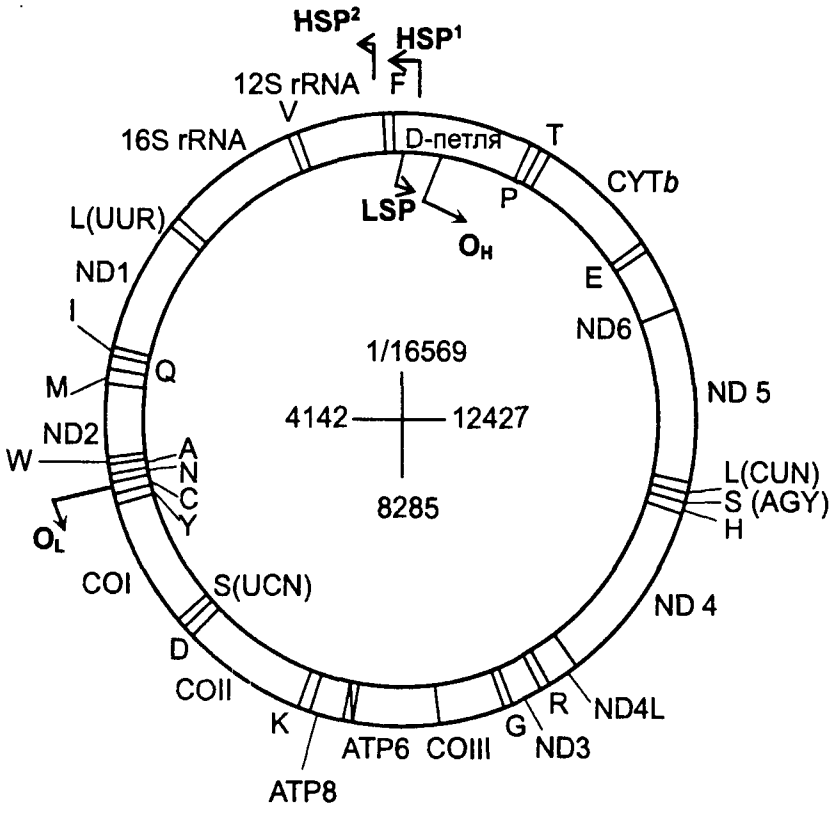


Рис. 6.8. Карта митохондриальной ДНК человека. Указаны гены субъединиц NAD-дегидрогеназы (ND1—ND6, ND4L), цитохрома *b* (CYT*b*), субъединиц цитохрома *c* (COI—COIII), субъединиц АТФ-синтазы (ATP8 и 6), рРНК (12S и 16S) и тРНК (однобуквенные символы аминокислот). Стрелками указаны промоторы транскрипции цепей (LSP, HSP^1, HSP^2) и точки инициации репликации (O_L, O_H) [по Larsson, Clayton, 1995, с поправками Taanman, 1999]

Наряду с мономерными кольцами в митохондриальных геномах человека и других млекопитающих встречаются димерные и (реже) мультимерные молекулы, которые особенно характерны для малигнизированных (злокачественных) клеток [Bogenhagen et al., 1981; Tang et al., 2000].

Кроме рассмотренного выше механизма асинхронной репликации H- и L-нитей мтДНК в митохондриях млекопитающих недавно обнаружена синхронная репликация двух цепей, начинающаяся в точке O_H и продолжающаяся в одном направлении по всей длине молекулы. Данный способ репликации характерен для клеток, восстанавливающих нормальное число молекул мтДНК после резкого их уменьшения, тогда как асинхронная репликация типична для клеток, поддерживающих число копий мтДНК при стабильном состоянии [Holt et al., 2000]. Пока неясно, являются ли эти два способа репликации независимыми и как происходит переключение с одного на другой [Tang et al., 2000].

Уровень основного транскрипционного фактора — белка h-mtTFA в клетках человека зависит от количества мтДНК, что подтверждает регулирующую роль данного белка в ДНК-репликации. Обработка клеток этидиум бромидом вызывает резкое уменьшение количества митохондриальных ДНК. Такие искусственно истощенные клетки имеют необычно низкий уровень h-mtTFA. У больных со сниженным уровнем мтДНК снижено и количество h-mtTFA, если же мтДНК в избытке, повышен и уровень h-mtTFA. Остается неясным, является ли уровень h-mtTFA непосредственной причиной изменения скорости ДНК-репликации или же в отсутствие мтДНК h-mtTFA нестабилен и разрушается [Shadel, Clayton, 1997].

Основные белки ядерного кодирования, регулирующие репликацию и транскрипцию мтДНК человека (характерные также для других видов млекопитающих), приведены в табл. 6.4.

Таблица 6.4

Продукты экспрессии основных ядерных генов, участвующих в репликации и транскрипции митохондриального генома млекопитающих [Taanman, 1999]

Фактор транскрипции и репликации	Ген	Хромосома	Источник
Эндонуклеаза G	ENDOG	9q34.1	Tiranti et al., 1997
МтДНК-полимераза γ	POLG	15q24-q26	Graves et al., 1998
МтРНК-полимераза	POLMRT	19p13.3	Tiranti et al., 1997
SSB-белок	SSBP	7q34	Tiranti et al., 1993
Митохондриальный фактор транскрипции А (мтTFA)	TFAM (TCF6)	10q21	Fisher et al., 1989; Shadel, Clayton, 1997
Факторы РНК процессинга (РНКаза MRP)	RMRP	9p21-p12	Shadel, Clayton, 1997

Поддержание необходимого количества молекул мтДНК в клетке определяется рядом факторов, которые каким-то образом взаимодействуют между собой. Неясно, как контролируется общее количество митохондрий в клетке, а также число копий митохондриальной ДНК. Очевидно лишь, что процесс этот многоступенчатый, в нем задействованы множественные механизмы. Некоторые из них включены в схему (рис. 6.9), однако полная картина, несомненно, гораздо сложнее.

Например, при биогенезе митохондрий в активно сокращающейся мышечной ткани сдвиг метаболизма АТФ/АДФ влечет за собой активацию киназ, которые фосфорилируют такие белки, как факторы транскрипции (mtTFA) и ядерный дыхательный фактор (NRF-1) [Hood, 2001]. NRF-1 в свою очередь активирует экспрессию нескольких генов, кодирующих ряд

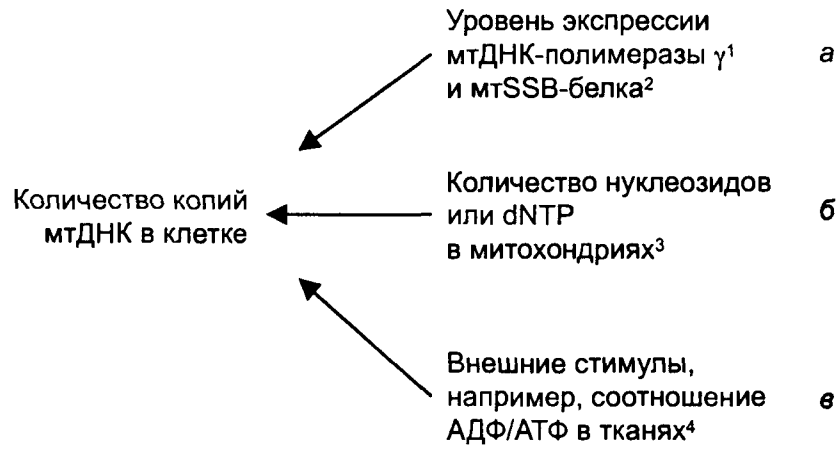


Рис. 6.9. Многоступенчатый процесс регуляции синтеза митохондриальной ДНК в клетке, включающий инициацию мтДНК-репликации (*а*), инкорпорацию тринуклеотидов (*б*) и модифицирующий эффект внешних факторов (*в*) [по данным Tang et al., 2000]

Примечание. [1]Lefai et al., 2000; Williams, Kaguni, 1995; [2]Schultz et al., 1998; [3]Reichard, 1988; Lecrenier, Foury, 1995; [4]Murdock et al., 1999.

функциональных компонентов окислительно-восстановительной цепи и одновременно ключевых элементов системы репликации—транскрипции митохондриальной ДНК (например, MRP-РНКазу) [Lefai et al., 2000]. Длительное интенсивное сокращение мышц увеличивает экспрессию ядерного гена *TFAM* и стимулирует его экспорт в митохондрии, в результате чего усиливается транскрипция и репликация митохондриальной ДНК [Hood, 2001].

* * *

В заключение отметим, что митохондриальный геном животных и особенно млекопитающих является самой интенсивно исследуемой группой внеядерных генетических систем. Чрезвычайно большой интерес к этому геному связан с новой отраслью медицины, так называемой "митохондриальной медициной", о чем пойдет речь далее в главе 14. Будут рассмотрены многочисленные случаи мутирования митохондриального генома человека, приводящие к развитию ряда тяжелейших наследственных заболеваний, а также оценена связь митохондриальных мутаций с процессами старения организма.

Несмотря на очевидные успехи митохондриальной генетики животных и человека, ряд моментов остаются невыясненными. Так, обсуждается вопрос о ***наличии рекомбинаций*** в мтДНК животных. Первоначально данные о строго материнском наследовании органельной ДНК и соматической гибридизации животных клеток свидетельствовали против рекомбинаций мтДНК животных. Однако в дальнейшем стали известны факты отцовского наследования митохондрий у животных (см. главу 1).

Появились также подробные исследования мтДНК-последовательностей в связи с различными заболеваниями, позволившие обнаружить более 200 перестроек в митохондриальном геноме человека [Fernandez-Moreno et al., 2000] (см. главу 14). Многие из обнаруженных делеций были фланкированы прямыми повторами, что указывает на вероятность рекомбинаций, ведущих к делециям [Schon et al., 1989; Mita et al., 1990]. Более того, предполагается, что наличие в мтДНК животных ГЦ-богатых последовательностей, подобно таковым в мтДНК грибов и других организмов в определенных "горячих" сайтах, связано с прикреплением фермента топоизомеразы II. Известно, что данный фермент вводит отрицательные сверхспирализованные витки (negative superhelical turns) в ДНК-кольца (при этом действует механизм разрыва обеих нитей и воссоединения); показано его присутствие в митохондриях [Mita et al., 1990]. Все эти факты позволили предположить существование рекомбинационного процесса в митохондриальных ДНК животных. Затем были обнаружены сублимоны в митохондриях человека, прежде описанные лишь для митохондрий растений и связанные с рекомбинациями: разрывами-воссоединениями по местам коротких прямых повторов с явным наличием "горячих точек", в частности, вблизи конца D-петли [Kajander et al., 2000]. Таким образом, стали появляться работы, предполагающие рекомбинации в мтДНК человека, хотя они часто содержат в своих названиях знак вопроса [Eyre-Walker et al., 1999; Macaulay et al., 1999; Wallis, 1999; Innan, Nordborg, 2002]. Отметим, что для низших животных — фитонематод — процесс внутримолекулярной рекомбинации мтДНК был доказан с использованием ПЦР-метода [Lunt, Hyman, 1997]. Субклеточная фракция митохондрий млекопитающих обладала способностью катализировать гомологичную ДНК-рекомбинацию [Thyagarajan et al., 1996], что также свидетельствует в пользу рекомбинаций мтДНК у млекопитающих, в том числе у человека.

В последние годы появились работы, посвященные механизмам контроля за делением митохондрий у разных организмов. Обнаружены динаминподобные белки — DRP-1 у *Caenorhabditis elegans* и аналогичный ему Dnm1 у дрожжей и Dlp1 у млекопитающих, которые связаны с делением митохондрий [van der Bliek, 1999, 2000; Erickson, 2000; Wong et al., 2000]. Усиление экспрессии DRP-1 по сравнению с диким типом приводит к увеличению частоты митохондриальных делений [Labrousse et al., 1999]. Как DRP-1, так и Dnm1 участвуют в делении (образовании перетяжки) наружной мембраны митохондрий (рис. 6.10). В делении же внутренней митохондриальной мембраны участвуют FtsZ-подобные белки и, возможно, еще один белок из семейства динаминов — Mgm1 [van der Bliek, 2000; Wong et al., 2000]. У мутантов по Mgm1 изменена морфология митохондрий: в одних клетках они формируют большие агрегаты, у других подвергаются чрезмер-

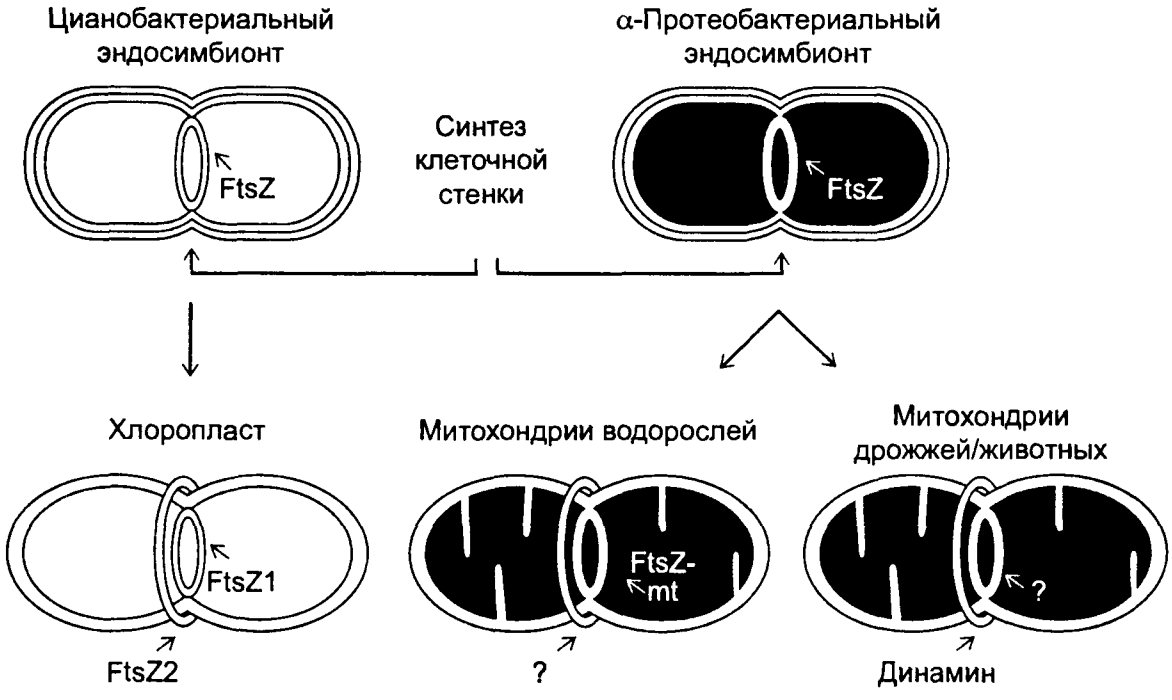


Рис. 6.10. Предполагаемые роли белков FtsZ и динамина в делении органелл [по Osteryoung, 2000]. В цианобактериальных и α-протеобактериальных эндосимбионтах — предшественниках хлоропластов и митохондрий образование как FtsZ-кольца, так и клеточной стенки в середине клетки важно для деления клетки. В процессе эволюции органелл за FtsZ закрепилась функция образования перетяжки у растений и водорослей, но не у грибов и животных. В хлоропластах высших растений и митохондрий водорослей FtsZ1 и FtsZ-mt располагаются внутри соответствующих органелл и могут быть функционально аналогичны бактериальным FtsZ. FtsZ2 в хлоропластах и динамин в митохондриях дрожжей и животных, как предполагается, функционируют на поверхности цитозоля при образовании перетяжки органелл. Знаком «?» обозначено предполагаемое, но не доказанное участие в этих процессах FtsZ-mt у водорослей и динамина у дрожжей и животных

ной фрагментации [Wong et al., 2000]. На более поздних стадиях изменения морфологии митохондрий у мутантов сопровождаются также частичной утратой митохондриальной ДНК [Shepard, Yaffe, 1999]. Эти данные свидетельствуют как об определенной гомологии с системой деления пластид и бактерий, так и об индивидуальных особенностях, присущих митохондриям. В нашу задачу не входит более подробное обсуждение этих процессов, находящихся под контролем ядерного генома.

Неясными остаются механизмы ряда других митохондриальных процессов, например регуляции репликации отдельных мтДНК в общем клеточном пуле. Если обратиться вновь к главе 1 и, в частности, к таблице 1.1, свидетельствующей, что не существует жесткой "привязки" репликации отдельных мтДНК молекул к клеточному циклу, можно предположить отсутствие такого механизма. Однако мы полагаем, что такое предположение не вполне верно — на самом деле определенная согласованность функционирования генетических систем в процессе репликации субклеточных гено-

мов существует, но она не столь жесткая, как для отдельных хромосом ядра. Взаимозависимы, несомненно, и процессы экспрессии ядерных и митохондриальных геномов. Более того, в процессе эволюции происходило и происходит перераспределение генетической информации между клеточными компартментами обычно в пользу ядра, что также влечет за собой ряд проблем согласования функций. Некоторые из этих вопросов будут рассмотрены далее в главах 7 и 8.

Литература

Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // Nature. 1981. Vol. 290. P. 457—465.

Antoshechkin I., Bogenhagen D.F., Mastrangelo I.A. The HMG-box mitochondrial transcription factor x1-mtTFA binds DNA as a tetramer to activate bidirectional transcription // EMBO J. 1997. Vol.16, No 11. P. 3198—3206.

Armstrong M.R., Block V.C., Philips M.S. A multipartite mitochondrial genome of the potato cyst nematode *Globodera pallida* // Genetics. 2000. Vol. 154. P. 181—192.

Bibb M.J., Van Etten R.A., Wright C.T., Walberg M.W., Clayton D.A. Seguence and gene organization of mouse mitochondrial DNA // Cell. 1981. Vol. 26. P. 167—180.

Bogenhagen D.F., Lowell C., Clayton D.A. Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: replication of unicircular dimer molecules // J. Mol. Biol. 1981. Vol. 148. P. 77—93.

Bogenhagen D.F., Applegate E.F., Yoza B.K. Identification of a promoter for transcription of the heavy strand of human mtDNA: in vitro transcription and deletion mutagenesis // Cell. 1984. Vol. 36. P. 1105—1113.

Boore J.L. Animal mitochondrial genomes // Nucl. Acids Res. 1999. Vol. 27. P. 1767—1780.

Castresana J., Feldmaier-Fuchs G., Yokobori S. et al. The mitochondrial genome of the hemichordate *Balanoglossus carnosus* and the evolution of the deuterostome mitochondria // Genetics. 1998. Vol. 150. P. 1115—1123.

Desjardins P., Morais R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 212. P. 599—634.

Enriquez J.A., Fernandez-Silva P., Garrido-Perez N. et al. Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol. 19. P. 657—670.

Erickson H.P. Dynamin and FtsZ: missing links in mitochondrial and bacterial division // J. Cell Biol. 2000. Vol. 148. P. 1103—1106.

Eyre-Walker A., Smith N.H., Smith M. J. How clonal are human mitochondria? // Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 1999. Vol. 266. P. 477—483.

Fan L., Sanschagrin P.C., Kaguni L., Kuhn L. The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96, No 17. P. 9527—9532.

Fernandez-Moreno M.A., Bornstein B., Petit N., Garesse R. The pathophysiology of mitochondrial biogenesis: toward four decades of mitochondrial DNA research // Mol. Genet. Metab. 2000. Vol. 71, No 3. P. 481—495.

Fisher R.P., Parishi M.A., Clayton D.A. Flexible recognition of rapidly evolving promoter sequences by mitochondrial transcription factor I // Genes and Devel. 1989. Vol. 3. P. 2202—2217.

Garesse R. Drosophila melanogaster mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations // Genetics. 1988. Vol. 118. P. 649—663.

Graves S.W., Johnson A.A., Johnson K.A. Expression, purification and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 6050—6058.

Hoffmann R.J., Boore J.L., Brown W.M. A novel mitochondrial genome for the blue mussel, *Mytilus edulis* // Genetics. 1992. Vol. 131. P. 397—412.

Holt I.J., Lorimer H.E., Jacobs H.T. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA // Cell. 2000. Vol. 100. P. 515—524.

Hood D.A. Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal miscle // J. Appl. Physiol. 2001. Vol. 90, No. 3. P. 1137—1157.

Innan H., Nordborg M. Recombination or mutational hot spots in human mt DNA? // Mol. Biol. Evol. 2002. Vol. 19, No.7. P.1122—1127.

Itoh T., Tomizawa J-I. Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1980. Vol. 77, No 5. P. 2430—2454.

Jacobs H.T., Elliott D.J., Math V.B., Farquharson A. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 202. P. 185—217.

Kajander O.A., Rovio A.T., Maiamaa K. et. al. Human mtDNA sublimons resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states // Hum. Mol. Genet. 2000. Vol. 9, No 19. P. 2821—2835.

Kruse B., Narasimhan N., Attardi G. Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination // Cell. 1989. Vol. 58. P. 391—397.

Labrousse A.M., Zapaterra M., Rube D.A., van der Bliek A.M. Caenorhabditis elegans dynamin-related protein *drp-1* controls severing of the mitochondrial outer membrane // Mol. Cell. 1999. Vol. 4. P. 815—826.

Lang B.F., Gray M.W., Burger G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes // Annu. Rev. Genet. 1999. Vol. 33. P. 351—397.

Larsson N.G., Clayton D.A. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders // Annu. Rev. Genet. 1995. Vol. 29. P. 151—178.

Lavrov D., Brown W.M. Trichinella spiralis mtDNA: a nematode mitochondrial genome that encodes a putative ATP8 and normally structured tRNAs and has a gene arrangement relatable to those of coelomate metazoans // Genetics. 2001. Vol. 157. P. 621—637.

Lecrenier N., Foury F. Overexpression of the RNR1 gene rescues *Saccharomyces cerevisiae* mutants in the mitochondrial DNA-polymerase-encoding MIP1 gene // Mol.Gen.Gen. 1995. Vol. 249. P. 1—7.

Lee D.Y., Clayton D.A. Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 30614—30621.

Lefai E., Fernandez-Moreno M. A., Alahari A. et al. Differential regulation of the catalytic and accessory subunit genes of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, No 42. P. 33123—33133.

Lunt D.H., Hyman B.C. Animal mitochondrial DNA recombination // Nature. 1997. Vol. 387. P. 247.

Macaulay V., Richards M., Sykes B. Mitochondrial DNA recombination — no need to panic // Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 1999. Vol. 266. P. 2037—2039.

Mita S., Rizzuto R., Moraes C.T. et al. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions in human mitochondrial DNA // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18, No 3. P. 561—567.

Montoya J., Gaines G.L., Attardi G. The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units // Cell. 1983. Vol. 34. P. 151—159.

Moritz C. Evolutionary dynamics of mitochondrial DNA duplication in partenogenetic geckos, *Heteronotia binoei* // Genetics. 1991. Vol. 129. P. 221—230.

Moritz C., Brown W.M. Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA sequences in lizard mitochondrial DNA // Science. 1986. Vol. 233. P. 1425—1427.

Murdock D.G., Boone B.E., Esposito L.A., Wallace D.C. Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 14229—14233.

Newman S.M., Zelenaya-Troitskaya O., Perlman P.S., Butow R.A. Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG-box protein, Abf2p // Nucl. Acids Res. 1996. Vol. 24. P. 386—393.

Okimoto R., Macfarlane J.L., Clary D.O., Wolstenholme D.R. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum* // Genetics. 1992. Vol. 130. P. 471—498.

Pont-Kingdon J., Okada N., Macfarlane J.L. et al. Mitochondrial DNA of coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondria // J. Mol. Evol. 1998. Vol. 46. P. 419—431.

Price D.H., Gray M. Editing of tRNA // Modification and editing of RNA. Washington: ASM Press, 1998. P. 289—305.

Ramirez J.L., Dawid I.B. Mapping of mitochondrial DNA in *Xenopus laevis* and *X. borealis:* the position of ribosomal genes and D-loops // J. Mol. Biol. 1978. Vol. 119. P. 133—146.

Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis // Annu. Rev. Biochem. 1988. Vol. 57. P. 349—374.

Romano L. J., Tamanoi F., Richardson C.C. Initiation of DNA replication at the primary origin of bacteriophage T7 by purified proteins: requirement for t7 RNA polymerase // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1981. Vol. 78, No 7. P. 4107—4111.

Saccone C., De Giorgi C., Pesole G., Reyes A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system // Gene. 1999. Vol. 238, No 1. P. 195—209.

Schon E.A., Rizzuto R., Moraes C.T. et al. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA // Science. 1989. Vol. 244. P. 346—349.

Schultz R.A., Swoap S.J., McDaniel L.D. et al. Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273, No 6. P. 3447—3451.

Shadel G.S., Clayton D.A. Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 16083—16086.

Shadel G.S., Clayton D.A. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates // Annu. Rev. Biochem. 1997. Vol. 66. P. 409—435.

Shepard K.A., Yaffe M.P. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance // J. Cell Biol. 1999. Vol. 144. P. 711—720.

Shimko N., Liu L., Lang F., Burger G. GOBASE: the organelle genome 2001 // Nucl. Acids Res. 2001. Vol. 29, No 1. P. 128—132.

Stanton D.J., Daehler L.L., Moritz C., Brown W.M. Sequences with the potential to form stem-and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA // Genetics. 1994. Vol. 137. P. 233—241.

Taanman J.-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication // Biochim. Biopys. Acta. 1999. Vol. 1410. P. 103—123.

Tang Y., Manfredi G., Hirano M., Schon E.A. Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long-term cultured transmitochondrial cell lines // Mol. Biol. Cell. 2000. Vol. 11, No 7. P. 2349—2358.

Thyagarajan B., Padua R.A., Campbell C. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271, No 44. P. 27536—27543.

Tiranti V., Rocchi M., DtDonato S., Zeviani M. Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB) // Gene. 1993. Vol. 126. P. 219—225.

Tiranti V., Savoia A., Forti F., et al. Identification of the gene encoding the human mito-

chondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database // Hum. Mol. Genet. 1997. Vol. 6. P. 615—625.

Van der Bliek A.M. Functional diversity in the dynamin family // Trends Cell Biol. 1999. Vol. 9. P. 96—102.

Van der Bliek A.M. A mitochondrialdivision apparatus takes shape // J. Cell Biol. 2000. Vol. 151, No 2. P. 1—4.

Wallace D.C. Structure and evolution of organelle genomes // Microbiol. Rev. 1982. Vol. 46, No 2. P. 208—240.

Wallace D.C. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging // Am. J. Hum. Genet. 1995. Vol. 57. P. 201—223.

Wallis G.P. Do animal mitochondrial genomes recombine? // Trends in Ecol. Evol. 1999. Vol. 14. P. 209—210.

Williams A.J., Kaguni L.S. Stimulation of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase by single-stranded DNA-binding protein // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270, No 2. P. 860—865.

Wolstenholme D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution // Int. Rev. Cytol. 1992. Vol. 141. P. 173—216.

Wolstenholme D.R., Macfarlane J.L., Okimoto R. et al. Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1987. Vol. 84. P. 1324—1328.

Wong E. D., Wagner J.A., Gorsich S.W. et al. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria // J. Cell Biol. 2000. Vol. 151. P. 341—352.

Ye F., Carrodequas J.A., Bogenhagen D.F. The gamma subfamily of DNA polymerases: cloning of a developmentally regulated cDNA encoding *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase γ // Nucl. Acids Res. 1996. Vol. 24, No 8. P. 1481—1488.

Zelenaya-Troitskaya O., Newman S.M., Okamoto K. et al. Function of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1998. Vol. 148. P. 1763—1776.

Глава 7

Происхождение клеточных органелл. Теория симбиоза

В ПРЕДЫДУЩИХ главах, описывая генетические системы клеточных органелл, мы не раз подчеркивали их сходство с бактериальными геномами. Эта гомология затрагивает структуру кольцевых ДНК, порядок генов и особенности организации их в полицистроны, параметры белоксинтезирующей системы, ингибирование антибиотиками и др. Все эти данные получены сравнительно недавно, однако предположения о формировании клеточных органелл в результате слияния клеток эукариот с бактериями возникли гораздо раньше.

Впервые симбиотическая гипотеза возникновения эукариотической клетки была сформулирована в 80-х годах XIX в. [Altmann, 1890; Schimper, 1883], а затем на основе новых фактов реанимирована в 1970-е годы [Margulis, 1970; Taylor, 1974]. За прошедшие 30 лет этой проблеме были посвящены многочисленные исследования [Маргелис, 1983; Margulis, 1981; Cavalier-Smith, 1987; Gillham, 1994; Gray, 1989; Martin, Müller, 1998; Lang et al., 1999]. В настоящей главе мы рассмотрим современные представления о возникновении митохондрий и хлоропластов из бактерий-предшественников и об эволюционном становлении клеточных органелл.

Ближайшие родственники митохондрий — α-протеобактерии

Поиск бактерий — предшественников митохондрий первоначально был построен на сравнительном анализе генов малой субъединицы рРНК. В результате самым вероятным предшественником оказалось семейство α-протеобактерий — *Rickettsiaceae*. В него входят такие облигатные внутриклеточные паразиты, как *Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma* [Lang et al., 1999]. После проведения сравнительного анализа ряда других высококонсервативных белков (цитохрома *b*, субъединиц цитохромоксидазы 1 и 3) были установлены три наиболее близкие к митохондриальным геномам группы α-протеобактерий: *Rhodospirillum, Bradyrhizobium* и *Rickettsia*. Члены этих трех родов чрезвычайно разнообразны по "стилю жизни": многие являются патогенами (*Rickettsia, Ehrlichia, Wolbahia, Orientia*), другие — фотосинтетики, которые растут только при анаэробных условиях (основные виды *Rhodospirillum*); некоторые виды толерантны к низким концентрациям кислорода и произрастают в гетеротрофных условиях (*Magnetospirillum*), иные гетеротрофны и эффективно растут при высоких концентрациях кислорода (*Rhizobium, Aquaspirillum*). Часть видов может фотосинтезировать при анаэробных условиях, но переходить на гетеротрофный образ жизни при высоких концентрациях кислорода (например, *Rhodospirillum rubrum*). Поскольк-

ку до сих пор ни один из геномов свободноживущих бактерий не секвенирован, мы можем лишь предполагать, что согласно варьированию образа жизни различных протеобактерий изменен и набор входящих в их ДНК генов [Lang et al., 1999].

Для того чтобы точнее представить, как образовались и начали функционировать митохондрии, необходимо идентифицировать бактериальные формы — прямых предшественников органелл. Такие бактерии, вероятно, существуют, однако поиск их весьма затруднителен. Согласно приблизительным оценкам, только 0,4% всех существующих видов бактерий в настоящее время идентифицированы и формально описаны [Lang et al., 1999; http://www.asmusa.org/acasrc/aca1.html]. Кроме того, лишь около 0,1% встречающихся в природе видов бактерий поддается культивированию на искусственных средах [Staley, Konopka, 1985], вне их сложных экологических ниш. Неидентифицированные "митохондриоподобные" бактерии, вероятно, должны быть предрасположены к симбиозу и потому скорее всего будут плохо культивироваться в лабораторных условиях [Lang et al., 1999].

Учитывая эти трудности, значительным успехом следует считать секвенирование генома *Rickettsia prowazekii* — одного из известных близких митохондриальным предшественникам видов α-протеобактерий [Andersson et al., 1998]. Данный облигатный внутриклеточный паразит является возбудителем брюшного тифа, унесшего 20—30 миллионов человеческих жизней в годы Первой мировой и несколько миллионов за время Второй мировой войн [Gross, 1996].

Геном *R. prowazekii* представляет собой кольцевую хромосому размером 1111523 п.н. Размер генома риккетсии во много раз больше любого митохондриального (рис. 7.1). В то же время он значительно уступает геному *E.coli*: 834 гена обнаружено у *R. prowazekii*, тогда как у свободноживущей кишечной палочки — 4288 [Gray, 1998]. В процессе адаптации к внутриклеточному паразитизму произошла утрата многих генов; кроме того, у риккетсий обнаружено около 24% некодирующей ДНК — больше, чем у всех изученных микроорганизмов. Очевидно, это неактивные гены, деградированные в результате мутаций, но не элиминированные из генома [Andersson et al., 1998; Gray, 1998].

Как у *R. prowazekii*, так и в митохондриальном геноме утрачены гены, кодирующие ферменты гликолиза, а также большинство генов синтеза аминокислот и нуклеотидов. Однако у риккетсий сохранены гены цикла трикарбоновых кислот и комплекса дыхательной цепи, тогда как лишь некоторые из них имеются в геноме митохондрий, остальные перенесены в ядро. В функциональном отношении риккетсии и митохондрии весьма близки, продуцируя АТФ практически тем же путем в обеих системах [Andersson et al., 1998; Gray, 1998].

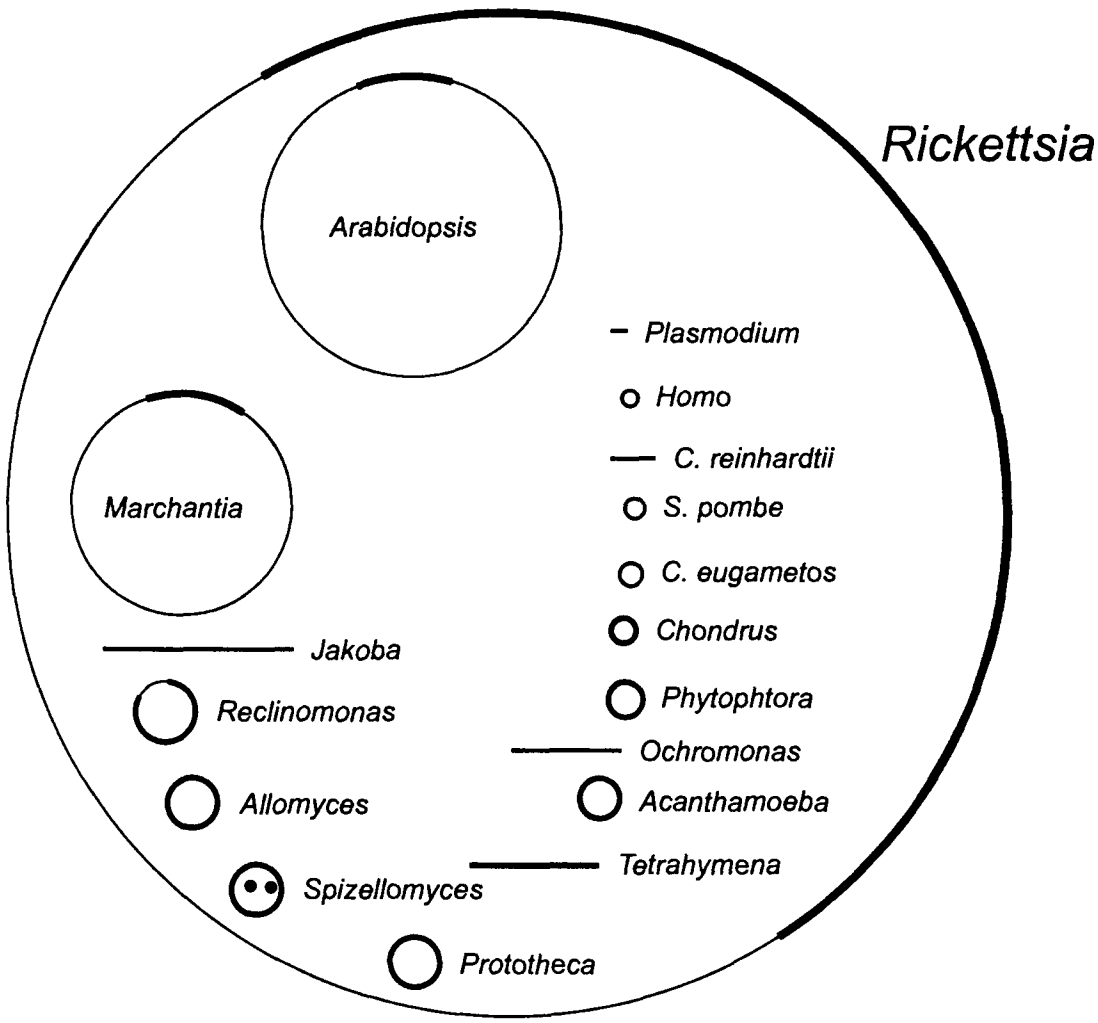


Рис. 7.1. Размер и кодирующая способность митохондриальных геномов по сравнению с α-протеобактериальным геномом *(Rickettsia)*. Представлены кольцевые и линейные геномы. Для геномов размером более 60 т.п.н. жирная дуга — ДНК, кодирующая гены с известной функцией; светлая дуга — ДНК, кодирующая гены с неидентифицированными ORF и межгенные последовательности [по Lang et al., 1999]

Все эти аналогии не означают, однако, что *R. prowazekii* является непосредственным предшественником митохондрий. Ряд генных кластеров у риккетсий и мтДНК *Reclinomonas americana* (см. далее) организованы поразному. Очевидно, и *Rickettsia,* и мтДНК *Reclinomonas* эволюционировали независимо от общего α-протеобактериального предка, при этом происходил процесс редукции генов, уникальный для каждого генома.

Митохондриальный геном *Reclinomonas americana* — бактериальный геном "в миниатюре"

К началу 90-х годов XX в. были секвенированы только три митохондриальных генома простейших: 6 т.п.н. мтДНК паразита грызунов *Plasmodium yoelii* — наименьший из всех известных митохондриальных геномов,

Таблица 7.1

Белок-кодирующие гены с идентифицированной функцией в митохондриальной ДНК *Reclinomonas americana* [по Lang et al., 1997]

Белки, ответственные за синтез АТФ и транспорт электронов	Гены
Комплекс I	*nad1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11*
Комплекс II	*sdh 2, 3, 4*
Комплекс III	*cob*
Комплекс IV	*cox 1, 2, 3*
Комплекс V	*atp 1, 6, 8, 9, **3***
Трансляция	
Белки малой субъединицы рибосомы	*rps 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 19*
Белки большой субъединицы рибосомы	*rpl 2, 5, 6, 11, 14, 16, **1, 10, 18, 19, 20, 27, 31, 32, 34***
Фактор элонгации	***tufA***
Транскрипция	
Core РНК-полимераза	***rpo A, B, C***
Сигмоподобный фактор	***rpo D***
Импорт / созревание белков	
Белок сборки цитохром оксидазы	***cox 11***
Transporter SecY-типа	***secY***
ABC-transporter	*yejR, U, V, **W***

Примечание. Выделенные гены уникальны для митохондриальной ДНК *Reclinomonas americana.*

мтДНК малярийного паразита *Plasmodium falciparum* и 40 т.п.н. свободноживущего ресничного простейшего *Paramecium aurelia* [Gray et al., 1998]. С 1992 г. начала выполняться программа секвенирования органельных геномов — OGMP (**o**rganelle **g**enome **m**egasequencing **p**rogram, http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/), в результате чего в течение пяти лет секвенированы еще 20 митохондриальных геномов простейших [Gray et al., 1998].

С точки зрения теории происхождения органелл наибольший интерес представляют результаты анализа мтДНК недавно открытого пресноводного гетеротрофного жгутикового простейшего (jakobid) *Reclinomonas americana* [Lang et al., 1997]. Jakobids имеют ряд общих черт в ультраструктурной организации с ретромонадами, группой простейших, не содержащих митохондрий [Cavalier-Smith, 1987], и относятся, несомненно, к одним из древнейших эндосимбиотических эукариот.

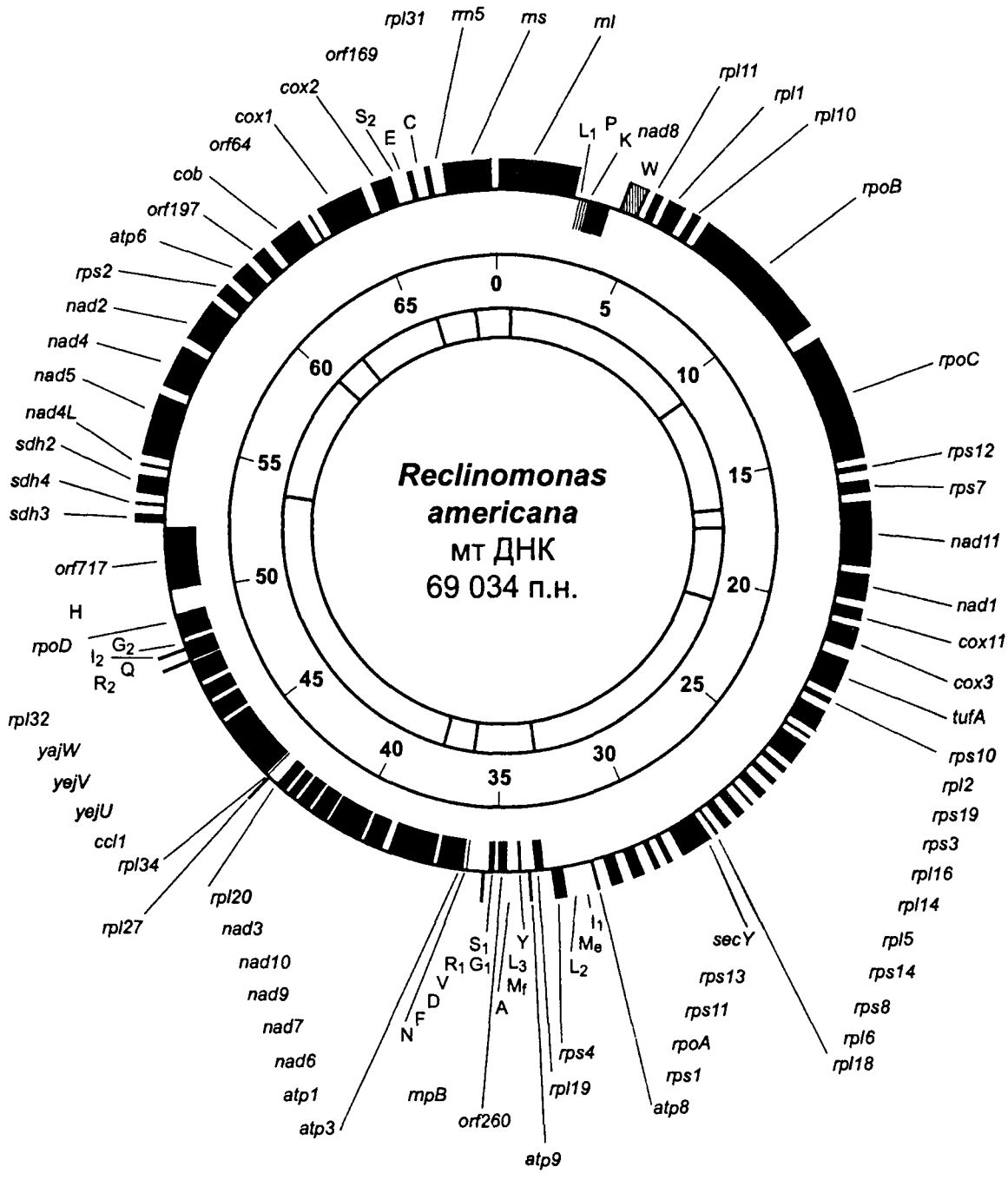


Рис. 7.2. Генетическая карта митохондриального генома *Reclinomonas americana*. На внутреннем кольце указано расположение рестрикционных сайтов *Hind III*. *orf64, orf169, orf717* мтДНК *Reclinomonas* уникальны; *orf197, orf260* гомологичны соответственно *orf25* и *orf64* генам *Marchantia polymorpha*. Гены тРНК обозначены однобуквенным аминокислотным кодом. Гены, размещенные на внешней стороне окружности, транскрибируются по часовой стрелке, на внутренней — против часовой стрелки [по Lang et al., 1997]. Ген тРНКW содержит интрон группы II

Митохондриальный геном *Reclinomonas* является наиболее генетически "насыщенным" из всех известных на сегодняшний день мтДНК (рис. 7.2). Имея сравнительно небольшой размер — 69034 п.н. (рис. 7.1), он содержит 97 генов, среди которых гены *5S рРНК*, РНК-компонент РНКазы Р и по крайней мере 18 белковых генов, не выявлявшихся ранее в митохондриях

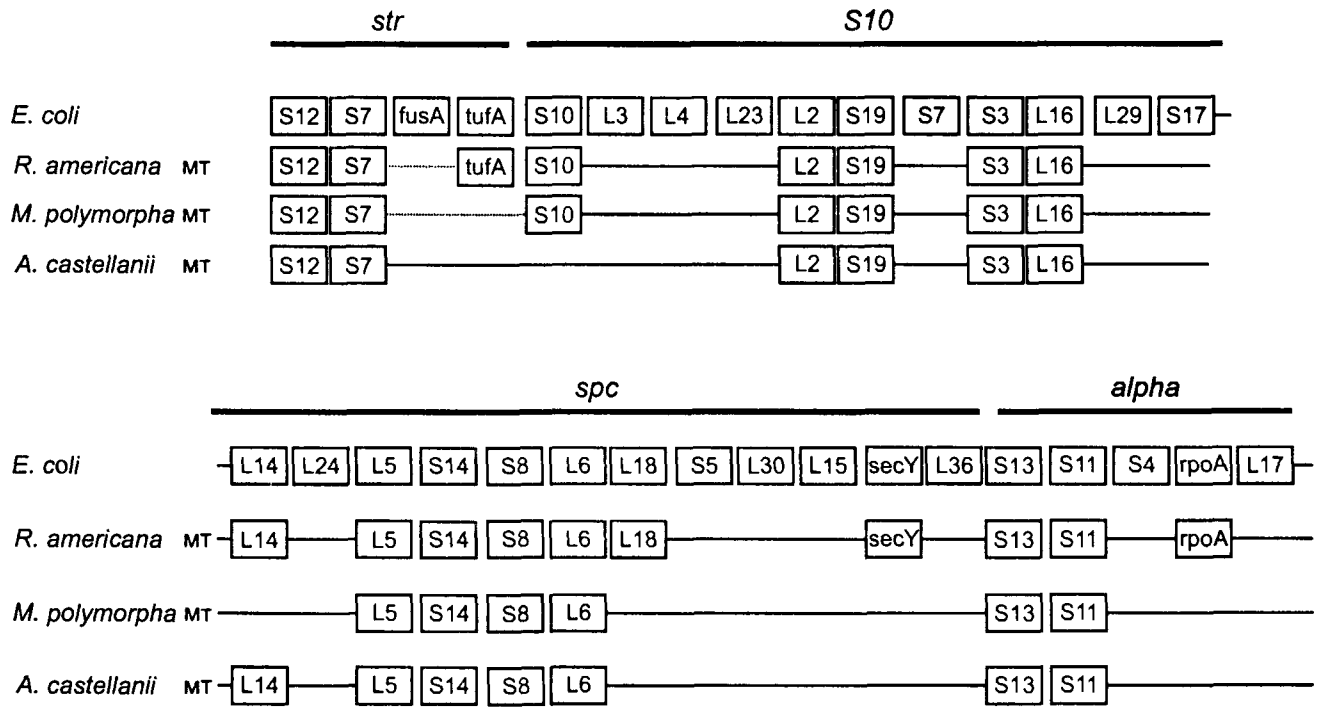


Рис. 7.3. Сохранение организации генов рибосомальных белков в митохондриальных геномах *R. americana, Marchantia polymorpha* и *Acanthamoeba castellanii* в сравнении с оперонами *E.coli*. Сплошные линии соединяют соседние гены, пунктирные линии указывают на присутствие дополнительных генов, которые не показаны [по Lang et al., 1997]

(табл. 7.1). Наиболее удивительно присутствие четырех генов (*rpoA* — *rpoD*), кодирующих 4 субъединицы бактериальноподобной РНК-полимеразы ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) [Lang et al., 1997], а также наличие уникальных для митохондриальной ДНК *R. americana* генов. Имеется еще пять белок-кодирующих генов с невыясненной функцией.

Почти все те же гены содержатся также в линейном митохондриальном геноме родственного *Reclinomonas* вида *Jakoba libera*, однако из четырех генов РНК-полимеразы два отсутствуют (*rpoA* и *rpoD*) [Lang et al., 1999; http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/jlibe/jlibe.html] У других видов ДНК митохондрий транскрибируется с помощью фагоподобной ядерно кодируемой РНК-полимеразы, не имеющей субъединиц (см. главы 4—6). Очевидно, фагоподобный фермент ядра заменил органельную подобную бактериальной РНК-полимеразу на раннем этапе эволюции митохондрий в отличие от пластид, где по-прежнему функционируют обе РНК-полимеразы (глава 3). В главе 4 приведена гипотетическая схема замены в процессе эволюции органельной РНК-полимеразы бактериального типа на фагоподобные ферменты ядерного кодирования (см. рис. 4.4) [Gray, Lang, 1998].

Еще один типично бактериальный ген, обнаруженный в мтДНК *R. americana,* гомолог SecY, кодирует компонент транспортной системы белков. *Sec* гены встречаются во всех изученных эубактериях и пластидах, выявле-

AAAACTATAAGAAATAGTTATTTAAAAA***AAAGGA***AAAAAAAA*ATG*.....*tufA*
TATGTGGGATTTCTTTGTGTGCTTAGAG***AAAGGA***ATGTATATTTT*ATG*.....*nad1*
TTAATGTTTTTAATATTTTTGATATAGT***AAAGGA***AAATAAG*ATG*.....*nad11*
TTAATTATTTAATATTTTTATTATTTTA***AAAGGA***TTCTTAT*ATG*.....*rps7*
ATTCAAAGAAAATATTATAATAATTAAT***ATGGGA***ATTTATTTT*ATG*.....*rpoB*
ATAGAAGTGTTTGTATTTTTTAATATAA***AAAGG***TTGGTATAAT*ATG*.....*nad4L*
GTTTCAAAACTTATTTTTAAGTAAAATG***AAAGGA***TATTTAT*ATG*.....*cox2*
TATAATTATAAATTCATAGAAAATAAAA***AAAAGA***TAATCGCTT*ATG*.....*cox1*
TATTGTATTTATAAATAATAAAAAAAAC***AAAGGA***AATTCAAA*ATG*.....*cox3*
* * * * * *
3' ***UUUCCU***CAAGUAGGUCGA.....*16S pPHK*

Рис. 7.4. Предполагаемые мотивы Shine-Dalgarno в генах митохондриальных белков *R. americana* (выделены жирным курсивом). Инициирующие кодоны подчеркнуты. Возможное комплементарное взаимодействие между SD-последовательностями и 3'-концом митохондриальной 16S рРНК указано звездочками. Выделенный мотив (или отличающийся от него на 1 нуклеотид) предшествует не менее чем пятидесяти белок-кодирующим генам мтДНК *R. americana* [по Lang et al., 1997]

ние их у *R. americana* предполагает наличие Sec-пути также в митохондриях [Lang et al., 1997].

Ген *tufA* — фактор регуляции трансляции — уникален для митохондриальной генетической системы *Reclinomonas*. Только в этом геноме найдено также девять новых генов белков большой субъединицы рибосом, еще один компонент электронно-транспортной цепи (*atp3*), четвертый компонент системы биосинтеза цитохрома c_1 (*yejW*), ген белка сборки цитохромоксидазы (*cox11*) [Lang et al., 1997].

Типичной для бактериального генома является выявленная у *R. americana* кластерная организация ряда генов. Особенно четко это проявляется в случае рибосомальных белковых генов — их порядок фактически повторяет организацию этих генов в четырех оперонах кишечной палочки (рис. 7.3). В митохондриальных геномах других систематических групп, несмотря на дальнейшую утрату многих генов, этот порядок в основном сохраняется [Lang et al., 1997].

Возможно, в митохондриях *Reclinomonas* сохранился и бактериальный способ инициации трансляции. Богатые пуринами последовательности типа Shine-Dalgarno (часто 5'-AAAGGA-3') расположены между 2-м и 12-м нуклеотидами выше инициирующего кодона большинства белковых генов мтДНК *Reclinomonas,* тогда как богатая пиримидинами последовательность находится на том же месте 16S рРНК, что и анти-SD-последовательность в 16S рРНК *E.coli* (рис. 7.4). Ни в одной из других изученных митохондриальных систем SD-последовательности не были найдены [Lang et al., 1997, 1999], в то время как более половины хлоропластных генов несут такие последовательности (глава 3).

Таким образом, митохондриальный геном *R. americana* является наименее редуцированным из всех известных, он содержит многие гены, не найденные ни в каких других митохондриях. Анализ данного генома позволяет точнее представить себе эволюцию транскрипционного аппарата и белкового транспорта в митохондриях и, несомненно, подтверждает симбиотическую эубактериальную природу митохондрий.

Эволюционные изменения "генетической компетентности" митохондрий

Число генов в митохондриях сильно варьирует — от 5 у апикомплекса до 97 у *Reclinomonas*. Поскольку у бактерий-предшественников число генов достигало 1000 и более, ранние этапы эндосимбиоза, очевидно, сопровождались потерей большинства генов. Утрата генов была, как правило, необратимой. Единичные исключения — приобретение новых генов митохондриями — хорошо известны и подробно описаны. Это:

- ряд тРНК генов хлоропластов в митохондриях покрытосеменных растений [Marechal-Drouard et al., 1995];
- плазмидные ДНК- и РНК-полимеразные гены в мтДНК грибов [Court, Bertrand, 1993; Hermanns, Osiewacz, 1994], растений [Dohmen, Tudzynski, 1994; Weber et al., 1995] и некоторых простейших [Takano et al., 1994];
- ген репарации ДНК (*mut S*) в мтДНК кораллов [Pont-Kingdon et al., 1995, 1998].

Гены, функции которых в эндосимбиотическом геноме перестали быть востребованными, исчезли, вероятно, очень рано — ни в одном из исследованных митохондриальных геномов не найдено никаких генов биосинтеза липидов, нуклеотидов и аминокислот [Lang et al., 1999].

Другие гены были утрачены органеллами, при этом функцию их взяли на себя ядерные гены. Примерами такой замены являются гены тРНК митохондрий: у ресничных простейших *Tetrahymena pyriformis* и *Paramecium aurelium* в митохондриальной ДНК имеется только 7 и 3 гена транспортных РНК соответственно. Отсутствующие тРНК импортируются из цитозоля и являются продуктами генов ядра [Chiu et al., 1975; Hauser, Schneider, 1995; Maréchal-Drouard et al., 1995; Tarassov, Martin, 1996]. В неоднократно рассматривавшемся примере с РНК-полимеразой происходит замещение генов органельной полимеразы эубактериального типа (мультисубъединичной) на ядерно кодируемую РНК-полимеразу фагового типа, внесенную в ядро на каком-то пока неизвестном этапе эволюции [Gray, Lang, 1998].

Наконец, произошла миграция ряда генов из митохондрий в ядро. Так, изменили свою локализацию гены многих субъединиц всех ферментных комплексов митохондрий: из 90 компонентов этих комплексов у человека

мтДНК кодирует только 13 (см. табл. 6.2; рис. 6.3) [Larsson, Clayton, 1995]. У некоторых эукариот ген *sdh1* (комплекс II, см. рис. 6.3) кодируется митохондриальным геномом. Это позволяет предполагать изначальную локализацию всех генов данного комплекса в митохондриях, хотя у человека они все уже полностью расположены в ядре [Larsson, Clayton, 1995; Gray et al., 1998]. Также кодируются ядром многочисленные белки миторибосом и другие белки, гены которых первоначально локализовались в мтДНК [Lang et al., 1999].

Процесс переноса генов в ядро продолжается и на данном этапе эволюции: у одних видов бобовых ген *cox2* находится в митохондриях, как и у прочих двудольных, тогда как у других видов того же семейства — в ядре. У сои (*Glycine soya*) имеется две копии данного гена — активная в ядре и неактивная в митохондриях, а у близкого ее родственника — коровьего гороха — митохондриальный ген уже потерян. В данном случае удалось установить не только сам факт, но и механизм переноса генов — он происходит через мРНК, на которой транскрибируется кДНК-копия, встраивающаяся в ядерный геном [Covello, Gray, 1992; Nugent, Palmer, 1991].

Вероятнее всего, митохондриальными изначально были и гены, определяющие биогенез митохондрий. Убедительные доказательства такого перемещения получены для белков теплового шока (Hsp10, Hsp70 и Cpn60), которые служат хаперонами митохондриальных генов [Ryan, Jensen, 1995; Roger et al.,1998].

Гипотезы происхождения митохондрий

В середине 80-х годов прошлого столетия эндосимбиотическая теория происхождения эукариот получила дополнительную поддержку — была открыта группа эукариотических организмов, не имеющих митохондрий. Эти организмы названы Archezoa [Cavalier-Smith, 1987] или Archaeprotista [Margulis, 1996]. Первоначально предполагалось, что в данную группу входят организмы, никогда не имевшие митохондрий: *Microsporidia* (такие, как *Vairimorpha necatris*), *Metamonada* (например, дипломонады *Giardia lamblia*) и *Parabasalia* (трихомонады, такие, как *Trichomonas vaginalis*). Организмы, отнесенные к Archezoa, характеризовались также примитивной клеточной архитектурой — слабо развитой системой эндомембран, отсутствием пероксисом и необычной рибосомальной РНК [Sogin et al., 1989; Vossbrinck et al.,1987]. Все это позволяло отнести их к потомкам эукариот-анаэробов, которые предшествовали появлению "коронной группы" — грибов, растений, животных (рис. 7.5).

Следует, однако, отметить, что отсутствие митохондрий у эукариот не

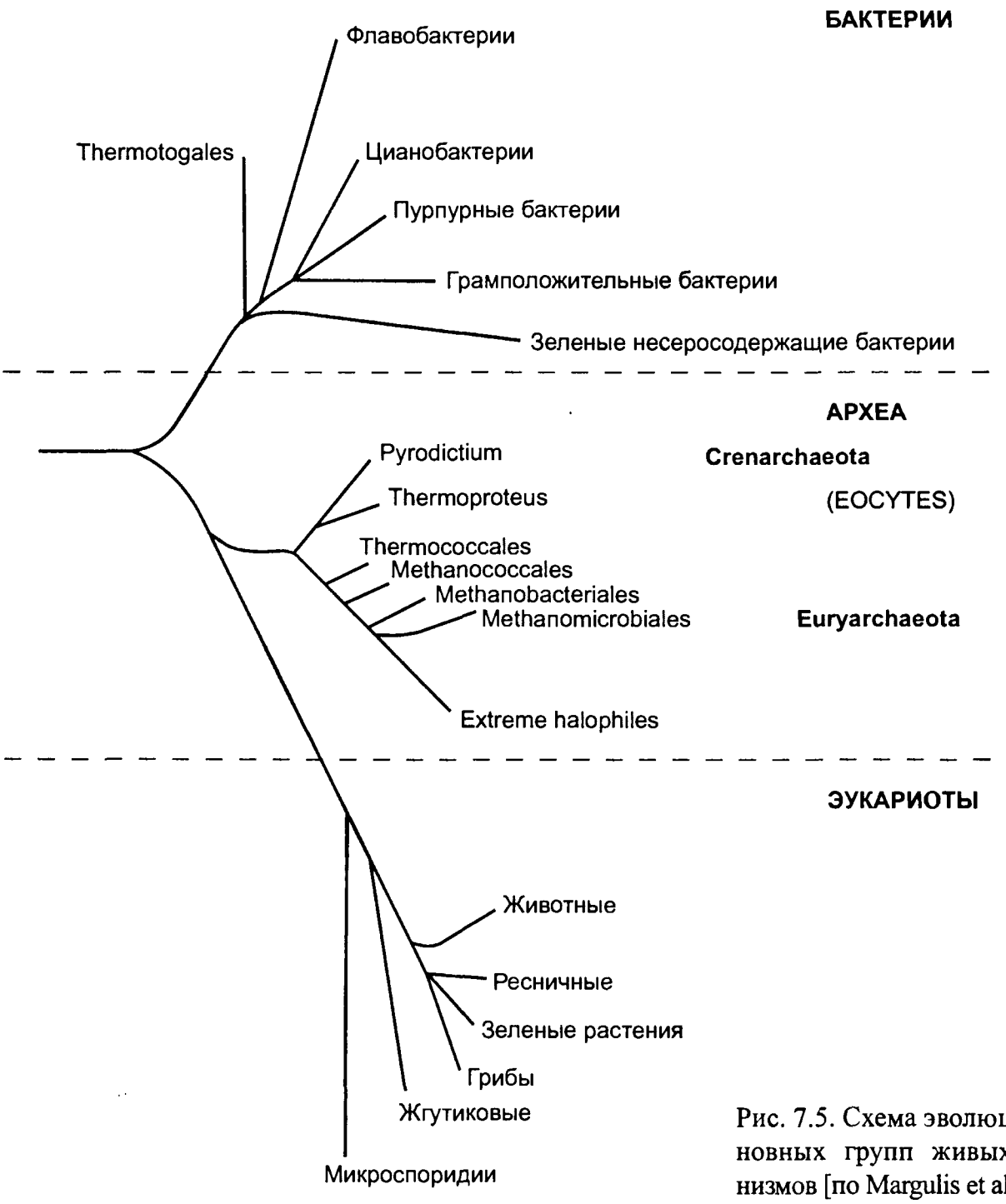


Рис. 7.5. Схема эволюции основных групп живых организмов [по Margulis et al., 1996]

обязательно свидетельствует об их эволюционной "древности": может происходить вторичная утрата митохондрий, связанная с паразитическим образом жизни. Примером такой утраты органелл является простейшее *Entamoeba histolytica* — она не имеет ни митохондрий, ни аппарата Гольджи, ни эндоплазматического ретикулума, ни пероксисом. Однако в ядерном геноме *Entamoeba* выявлены гены нескольких типично митохондриальных белков, что доказывает вторичность утраты митохондрий [Clark, Roger, 1995]. Этот факт недавно получил цитологическое подтверждение: обнаружено, что белок митохондриального типа Cpn60 у *E.histolytica* транспорти-

руется в неизвестные органеллы размером около 1 мкм — вероятно, видоизмененные митохондрии [Mai et al., 1999; Tovar et al., 1999].

В дальнейшем было показано, что белки теплового шока, связанные с биогенезом митохондрий, встречаются у всех групп Archezoa. Интересно, что у *Parabasalia* белки теплового шока транспортируются и размещаются в гидрогеносомах — органеллах, продуцирующих водород [Bui et al., 1996]. Поскольку у некоторых ресничных простейших гидрогеносомы к тому же напоминают митохондрии, логично предположить, что гидрогеносомы — это видоизмененные митохондрии [Finlay, Fenchel, 1989; Bui et al., 1996].

Водородная гипотеза происхождения первых эукариот

Гидрогеносомы встречаются у некоторых анаэробных простейших (ресничных — *Ciliatae*) и грибов-хитридиомицетов, обитающих в желудке (рубце) жвачных животных. Организмы, несущие гидрогеносомы, могут быть как свободноживущими, так и паразитическими и относиться к филогенетически различным группам. Их объединяет приспособленность к жизни в среде без кислорода или с очень малым его содержанием [Palmer, 1997]. Гидрогеносомы — это мембранно-связанные органеллы размером около 1 мк, продуцирующие водород (отсюда их название) [Müller, 1993]. Высказано предположение, что гидрогеносомы произошли от митохондрий, лишившись при этом дыхательных ферментов и мтДНК [Bui et al., 1996; Martin, Müller, 1998]. Однако недавно появилось сообщение о наличии у гидрогеносом анаэробного ресничного паразита *Nyctotherus ovalis* рибосом и молекул ДНК. Было показано, что гидрогеносомный ген рРНК малой субъединицы активно экспрессируется *in vitro* [Ahmanova et al., 1998]. Связь гидрогеносом с происхождением эукариот обсуждается в "водородной гипотезе" первых эукариот [Martin, Müller, 1998]. Согласно этой гипотезе, эукариоты возникли при ассоциации анаэробных, водород-зависимых автотрофных археобактерий (хозяев) с эубактериями (симбионтами), которые могли дышать, но выделяли водород как лишний продукт гетеротрофного метаболизма. Зависимость хозяина от водорода, выделяемого симбионтом, являлась селективной силой, приведшей к возникновению симбиотических эукариотических клеток. Возникшая протоэукариотическая клетка содержала геном, состоящий из смеси археобактериальных и эубактериальных генов, полученных от соответствующих бактерий (рис. 7.6, *а*). В дальнейшем последовал еще один эндосимбиотический акт, в результате чего возникли митохондрии [Martin, Müller, 1998; Lang et al., 1999]. К сожалению, объем и задачи нашей книги не позволяют подробнее остановиться на обсуждении данной гипотезы. Аналогичные по сути, но различающиеся по предполагаемым конкретным участникам эндосимбиотических событий

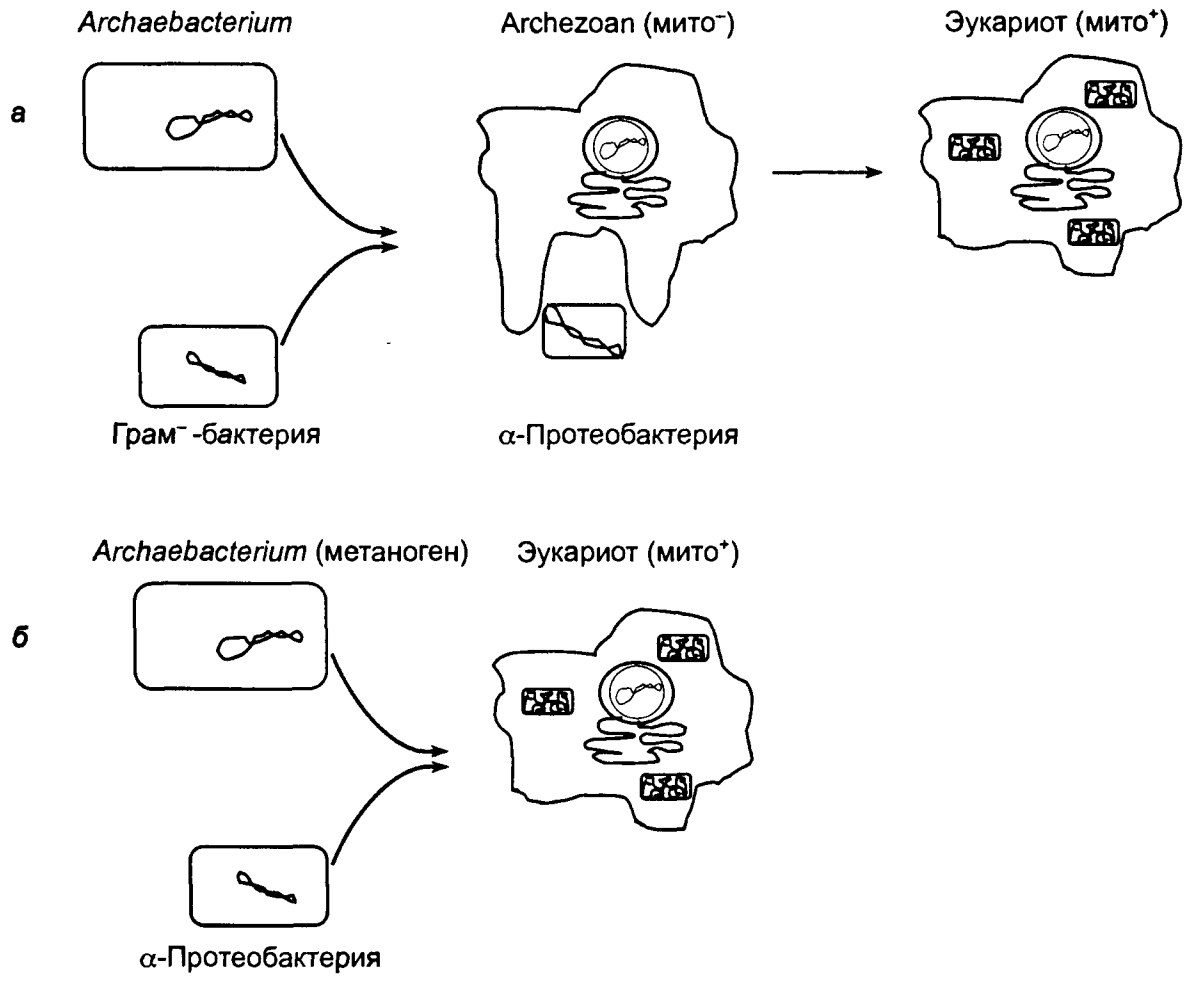


Рис. 7.6. Альтернативные гипотезы, описывающие происхождение эукариотической клетки. *а* — двухступенчатый процесс: при слиянии археобактерии и грамотрицательной бактерии изначально образуется амитохондриальный эукариот (archezoan, мито⁻), после чего митохондрии приобретаются путем эндосимбиоза с α-протеобактериями. *б* — одновременное образование эукариотического ядра и митохондрий при слиянии требующей водорода метанообразующей археобактерии (хозяина) с водородпродуцирующим симбионтом (α-протеобактерией) [по Lang et al., 1999]

гипотезы предложены в работах других исследователей [Moreira, Lopez-Garcia, 1998; Vellai et al., 1998].

Основные гипотезы, описывающие происхождение эукариотической клетки, схематически изображены на рис. 7.6. Вероятно, на ранних этапах эволюции эукариотической клетки многократно стихийно возникали ассоциации примитивных эукариотических предшественников с различными бактериями, но лишь определенный тип эндосимбиоза привел к прогрессу, в результате чего образовалось все многообразие многоклеточных эукариот (рис. 7.7). Процесс этот чрезвычайно длительный — более двух биллионов лет происходило формирование эукариотической клетки на основе прокариотической, еще биллион лет потребовался предположительно для возникновения многоклеточных организмов (рис. 7.8).

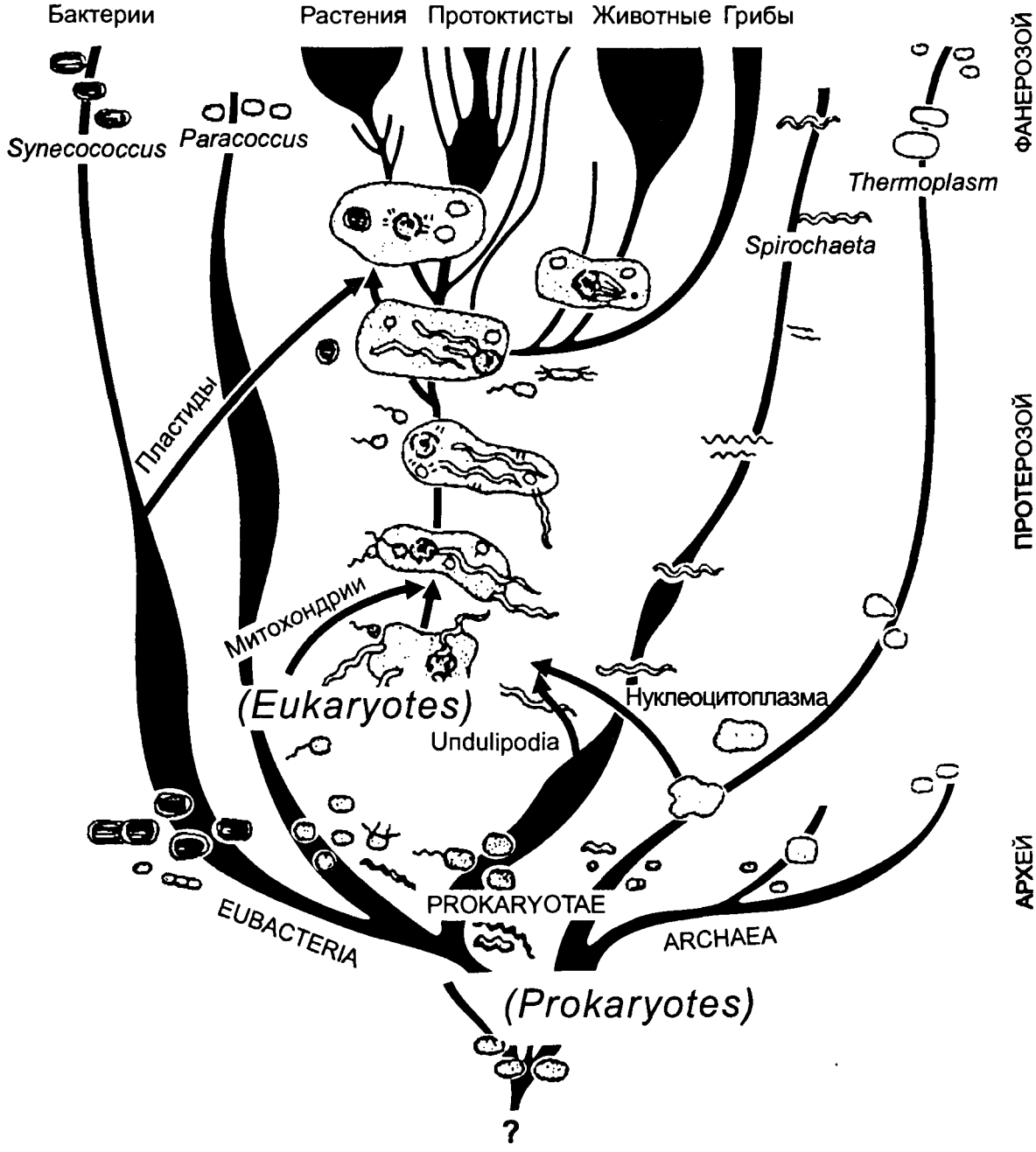


Рис. 7.7. Эволюция основных царств с отражением геологической временной шкалы [по Margulis et al., 1996]

Митохондриальный геном простейших — бесконечное разнообразие

Митохондриальная ДНК простейшего *Paramecium aurelia* была одной из первых органельных ДНК, выделенных на самых ранних этапах изучения внеядерных геномов [Suyama, Preer, 1965].

Чрезвычайное цитологическое, биохимическое и молекулярное разнообразие простейших не могло не отразиться на структуре их митохондриальных геномов. Молекулы мтДНК могут быть как линейными, так и кольцевыми, состоять, как у кинетопластных простейших, из сети сцепленных

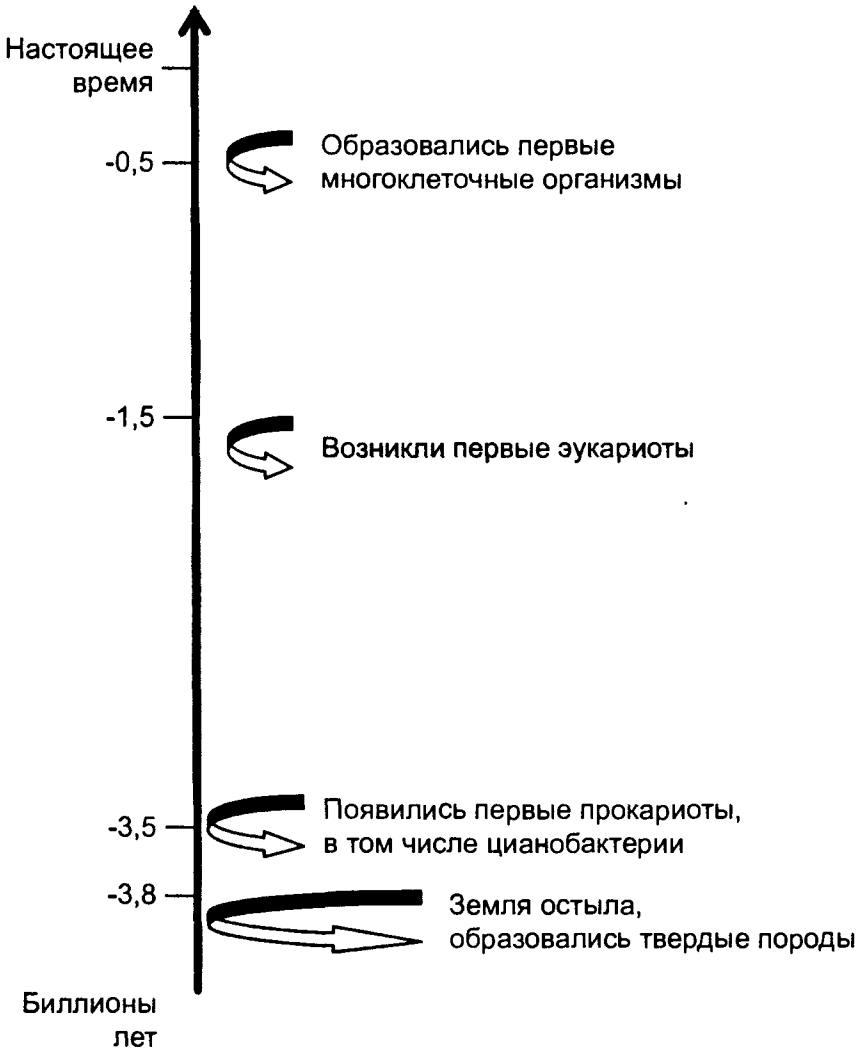


Рис. 7.8. Динамика появления на Земле основных групп живых организмов [по данным Smith, 1999]

(concatenated) колец, быть чрезвычайно разнообразными по количеству и набору входящих в них генов [Attimonelli et al., 2000; Одинцова, Юрина, 2002]. На начало 2000 г. 450 различных последовательностей мтДНК простейших включены в MitBASE (http://bio-www.ba.cnr.it:8000/Tutorials/MitBASE/protist_table.html.)

На основании имеющихся данных о секвенированных мтДНК простейших их можно разделить на три группы. Первая включает хорошо таксономически определенные типы и классы, для которых пока нет ни одного секвенированного митохондриального генома (данные на 1999 г.). Это церкомонады, эвгленовые, диатомовые, фораминиферы, глаукоцистофиты, харовые, бурые и желто-зеленые водоросли, радиолярии, миксомицеты и др. (рис. 7.9).

Другая группа простейших содержит таксономически хорошо описанные организмы, для которых известны только несколько полных последовательностей митохондриальных ДНК, чего явно недостаточно для того, чтобы охарактеризовать группу в целом. К ним относятся хоанофлагелляты, ряд зеленых и красных водорослей, некоторые жгутиковые и др. Из разнообраз-

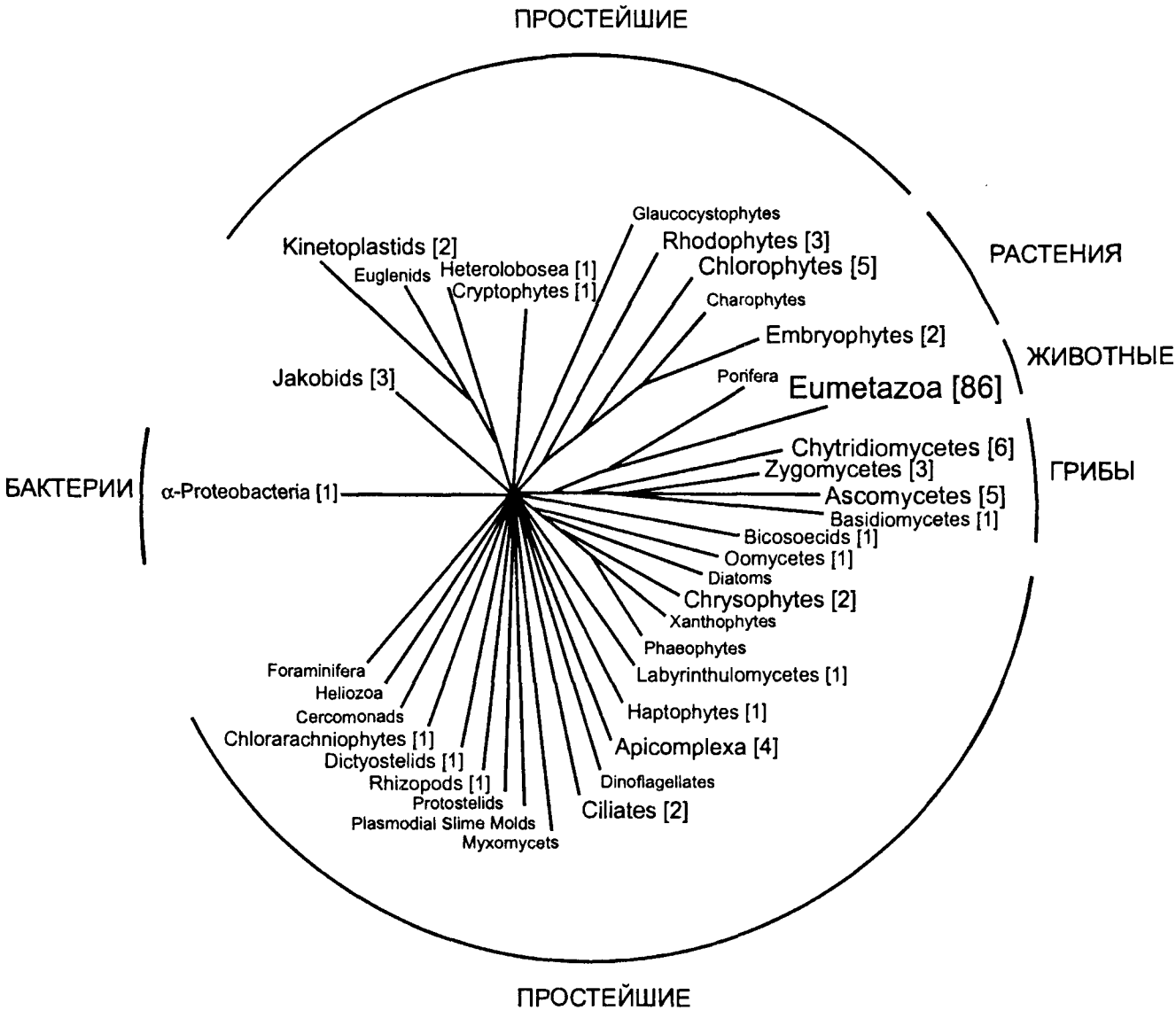


Рис. 7.9. Филогенетическое распределение известных к 1999 г. полных последовательностей митохондриальных ДНК. Цифры в квадратных скобках указывают число видов данного рода, для которых установлены полные последовательности митохондриальных геномов [по Lang et al., 1999]

ного множества простейших с дискоидальными кристами исследованы пока только трипаносомы, отличающиеся совершенно необычными свойствами мтДНК (мы рассматриваем их далее — в главе 10, которая посвящена РНК-редактированию). Два других секвенированных митохондриальных генома — амебы *Naegleria* и жгутикового *Malawimonas* — не содержат никаких особенностей, присущих мтДНК трипаносом [Lang et al., 1999].

Наконец, следует отметить, что третья группа простейших включает особи, филогенетическая принадлежность которых, а также их мтДНК не охарактеризованы, — сюда входит подавляющее большинство всех описанных простейших [Lang et al., 1999].

Очевидно, что на основе имеющихся сведений невозможно представить детальную картину эволюции митохондриальных геномов простейших —

скорее всего на этом этапе развития живых организмов было испробовано наибольшее число всевозможных вариантов, в том числе и в зависимости от разнообразия конкретных экологических условий, в которых оказывались организмы. Несомненно, по мере исследования этого огромного царства самых маленьких эукариотических организмов нам предстоит узнать много неожиданного.

В настоящее время "филогенетическая брешь" между эукариотическим и митохондриальными геномами ограничена, с одной стороны, митохондриальным геномом *Reclinomonas americana,* наиболее "бактериоподобным" из всех к настоящему времени идентифицированных, и, с другой стороны, самым "митохондриоподобным" бактериальным геномом *Rickettsia prowazekii.* Дальнейший поиск, возможно, позволит уменьшить этот разрыв, если будут найдены еще менее редуцированные митохондриальные или еще более подобные митохондриальным бактериальные геномы [Lang et al., 1999]

Происхождение пластид, особенности эволюции пластидных геномов

Подобно митохондриям, хлоропласты появились в клетке в результате эндосимбиоза. Примитивные эукариотические одноклеточные организмы, захватывая фотосинтезирующих прокариот, постепенно превратили их во внутриклеточные компоненты, продуцирующие энергию, — пластиды [Margulis, 1970; Маргелис, 1983; Gray, 1989; Douglas, Tumer, 1991; Gray, Spencer, 1996; Delwiche, Palmer, 1997; McFadden, 2001].

Анализ первых секвенированных хлоропластных ДНК указывал на эволюционное родство пластидных и бактериальных геномов [Schwartz, Kössel, 1979, 1980].

Общепринято, что предками хлоропластов являются цианобактерии. Данные о сходстве их 5S и 16S РНК появились еще в 80-е годы, а затем были многократно подтверждены для разных компонентов генома [Dyer, Bowman, 1979; Tomioka, Sugiura, 1983; Gray, 1999].

Размеры генома современных цианобактерий колеблются от 2700 т.п.н. (*Synechococcus*) до 6400 т.п.н. (*Anabaena*), тогда как величина пластидного генома варьирует от 89 т.п.н. (сифоновые водоросли *Codium*) до 292 т.п.н. (зеленая водоросль *Chlamydomonas moewusii*). В секвенированном геноме цианобактерии *Synechocystis* было идентифицировано 3229 генов [Kaneko et al., 1996]. Таким образом, как и в случае митохондрий, происходила редукция ДНК-пластид, в результате сохранилось 1—5% изначального прокариотического генома [Sugiura et al., 1998].

Полученные впоследствии полные нуклеотидные последовательности пластидной ДНК зеленых и незеленых фотосинтетических эукариот [Hallick et al., 1993; Kowallick et al., 1995; Reith, Munholland, 1995 — см. литературу к главе 2; Stirewalt et al., 1995], а также генома цианобактерии *Synechocystis* [Kaneko et al., 1996] делают возможным сравнение набора генов и их последовательности у разных систематических групп. В этом случае реально проследить эволюционные изменения генетической компетентности пластид (рис. 7.10).

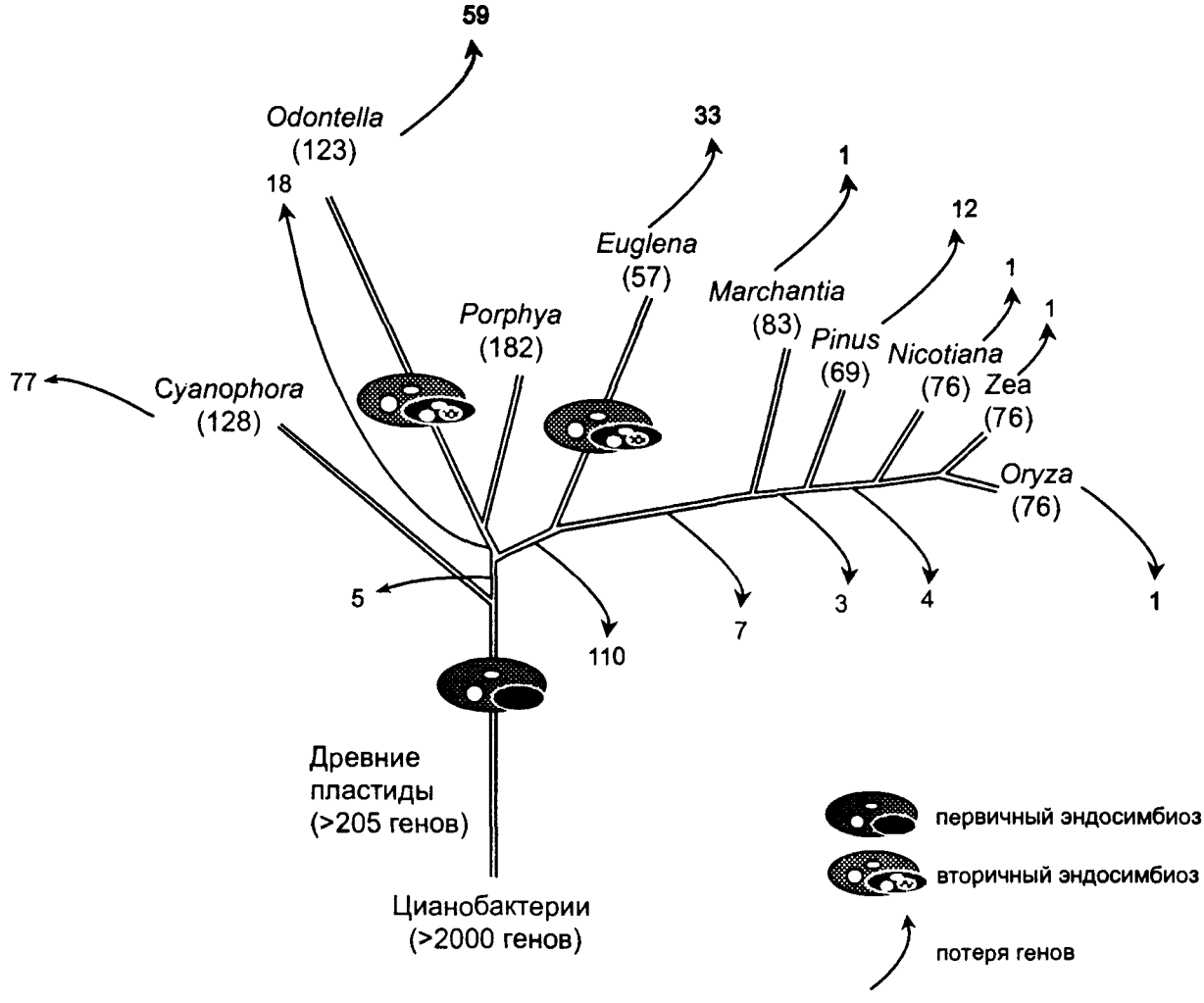


Рис. 7.10. Филогенетическое распределение генных потерь из хлоропластного генома. Цифры в скобках под названиями растений обозначают количество генов в хлоропластном геноме. Цифры у стрелок показывают число генов, потерянных из хлоропластного генома у данного организма по сравнению с предшествующим [по Martin et al., 1998]

Одним из наименее редуцированных пластидных геномов из изученных у водорослей и наземных растений представляется пластом зеленой водоросли *Nephroselmis olivaceae:* в молекуле размером 200799 п.н. идентифицировано 127 генов; их спектр также подтверждает происхождение пластид от цианобактерий [Turmel et al., 1999]. Еще более полный набор — 182 гена — обнаружен в пластоме красной водоросли *Porphyra purpurea* [Martin et al., 1998].

Совершенно необычный результат получен при исследовании пластома динофлагеллят: у *Heterocapsa triquetra* и, возможно, других динофлагеллят отдельные гены, как рРНК, так и белок-кодирующие, локализуются в мини-кольцах ДНК (2—3 т.п.н.). Каждое мини-кольцо несет по одному гену, кроме того, в некодирующей области все они содержат характерную консервативную последовательность [Zhang et al., 1999]. Такая организация пластома несколько напоминает мини-кольцевые молекулы ДНК в митохондриях мезозойских животных (см. далее в главе об РНК-редактировании), но для пластидной ДНК абсолютно уникальна [Gray, 1999].

Эндосимбиоз и первичные пластиды

Три группы — красные водоросли (*Rhodophytes*), зеленые водоросли и наземные растения (*Chlorophytes/Metaphytes*) и глаукоцистофиты (*Glaucocystophyceae*) — содержат пластиды, являющиеся результатом первичного эндосимбиоза с прокариотическим автотрофом (рис. 7.11). Такие пластиды ограничены двойной фосфолипидной мембраной и весьма сходны по множеству признаков (гены малой субъединицы рРНК, *tufA, atpB, rpoC1, psbA*), что позволяет говорить об их монофилетическом происхождении от общего предка [Gray, 1993; Gray, Spencer, 1996; Delwiche, Palmer, 1997; Douglas, 1998]. Присутствие в пластидах всех групп генных кластеров *atpA/rps2/rpo* и *psbB/NH,* не обнаруживаемых в цианобактериях, также указывает на то, что эти кластеры сформировались у некоего общего предка уже после эндосимбиотического образования пластид [Douglas, 1998].

Наиболее изученным представителем *Glaucocystophyceae* является *Cyanophora paradoxa*, своеобразные пластиды которой имеют даже свое название — цианеллы (cyanelle) [Stirewalt et al., 1995]. Эти органеллы, так же как цианобактерии, сохранили пептидогликановую стенку и сходный набор пигментов, поэтому первоначально предполагалось, что *Cyanophora* — результат недавно происшедшего "позднего" эндосимбиоза. Однако обнаружение в геноме цианелл 192 генов при размере кольцевой молекулы ДНК 135599 п.н. показало, что они являются, несомненно, ранней ветвью пластидной эволюции, сохранившей многие примитивные признаки цианобактерий, и могут считаться так называемыми "молекулярными ископаемыми" [Stirewalt et al., 1995; Hageman et al., 1999, см. литературу к главе 3].

Пигменты и общий предок пластид

В пластидах разных систематических групп имеется несколько различных пигментов светособирающего комплекса. Существуют два возможных варианта, объясняющих происхождение этих различий. Общий предок пластид мог содержать множество разных фотопигментов и связанных с ними

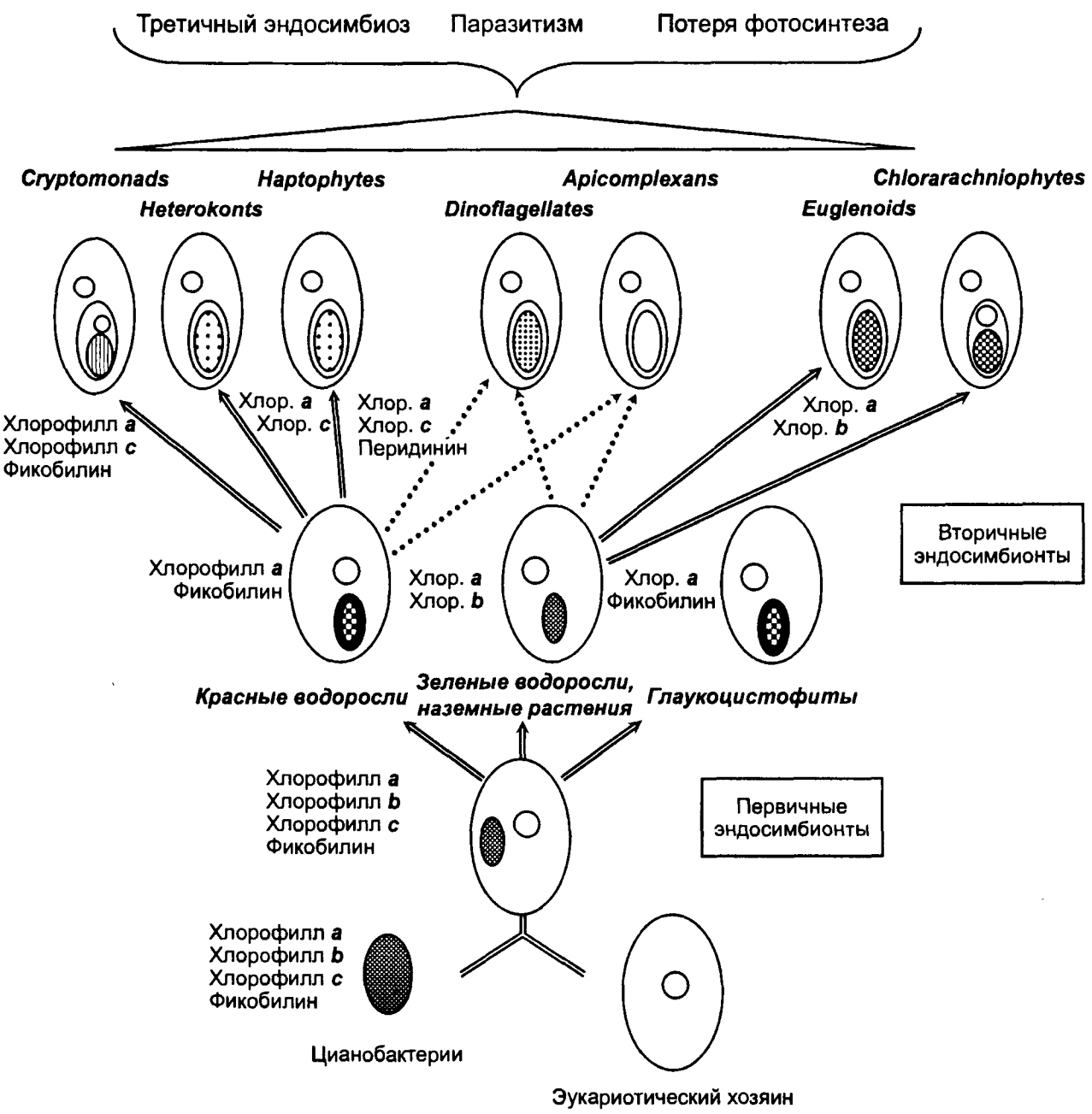


Рис. 7.11. Гипотетическая схема происхождения пластид путем первичного, вторичного и третичного эндосимбиозов. Большие овалы представляют пластиды; толщина стенки, окружающей пластиды, отражает количество мембран (одна или две, закрашенная стенка – все еще присутствует пептидогликан). Окружности — ядра (и нуклеоморфы) эукариотических хозяев различного происхождения. Обозначены пигменты, выявленные в пластидах разных ветвей эволюции и у цианобактерий. Прерывистые стрелки указывают, что пластиды *Dinoflagellates* и *Apicomplexans* могли произойти как от красных водорослей, так и от ветви "зеленые водоросли/наземные растения" [по Douglas, 1998]

светособирающих систем, но только один тип сохранялся в каждой филогенетической ветви после эндосимбиоза [Bryant, 1992]. По другому сценарию, новые пигменты могли образовываться из первоначально существующей хлорофилл *a*/фикобилиновой системы в ходе эволюции. Полученные недавно данные о широком разнообразии пигментных комбинаций у про-

хлорофитных представителей цианобактерий, криптомонад и желто-зеленой водоросли *Mantoniella squamata* поддерживают первую гипотезу [Douglas, 1998]. В пользу этого предположения свидетельствуют и данные о наличии в пластидах красных водорослей *Porphyridium cruentum* (*Rhodophyta*) наряду с фикобилисомами хлорофилл *a*-содержащего комплекса, белки которого иммунологически сходны с хлорофилл *a/b*-светособирающими комплексами высших растений и фукоксантин-хлорофилл *a/c*-антенными комплексами желто-зеленых водорослей (*Chromophyta*). Таким образом, с большой вероятностью можно предположить, что светособирающие комплексы всех фотосинтезирующих эукариот имели монофилетическое происхождение, а хлоропласты — общего предка [Wolfe et al., 1994].

Пластиды и повторные эндосимбиозы

Эндосимбиотические процессы с участием пластид неоднократно совершались в процессе эволюции и, возможно, происходят по сей день. Так называемые вторичные эндосимбиозы возникают при поглощении фаготрофными простейшими уже не цианобактерий, а эукариотических одноклеточных водорослей, несущих первичные пластиды (рис. 7.12) [Douglas, 1998]. Таким путем, как полагают, приобрели пластиды несколько групп водорослей, в том числе динофлагелляты, эвгленовые, бурые, диатомовые, золотисто-коричневые (golden-brown) флагелляты, криптомонады и хлорарахниофиты (см. рис.7.11) [McFadden et al., 1994; McFadden, 2001]. Из этих водорослей только у криптомонад и хлорарахниофитов сохранились остатки ядер их эукариотических эндосимбионтов в виде так называемых нуклеоморфов (N′ на рис. 7.12). Криптомонады произошли путем повторного эндосимбиоза от красных, а хлорарахниофиты — от зеленых водорослей [Douglas, 1998].

Методом полимеразной цепной реакции удалось показать наличие у этих водорослей двух малых цитоплазматических рРНК генов; путем гибридизации *in situ* показана экспрессия одного из них нуклеоморфом, тогда как другой ген экспрессировался ядром клетки-хозяина [McFadden et al., 1994]. Возникновение вторичных эндосимбиотических пластид и нуклеоморфов происходило приблизительно 500—200 млн лет назад [Zauner et al., 2000].

Нуклеоморфы — "пластидные ядра"

Несмотря на то что нуклеоморфы выявлены у двух различных систематических групп водорослей, независимо приобретших вторичных эндосимбионтов — *Cryptomonada* и *Chlorarachniophyceae*, в обоих случаях у них имеется по три редуцированные хромосомы. Общий размер нуклеоморфно-

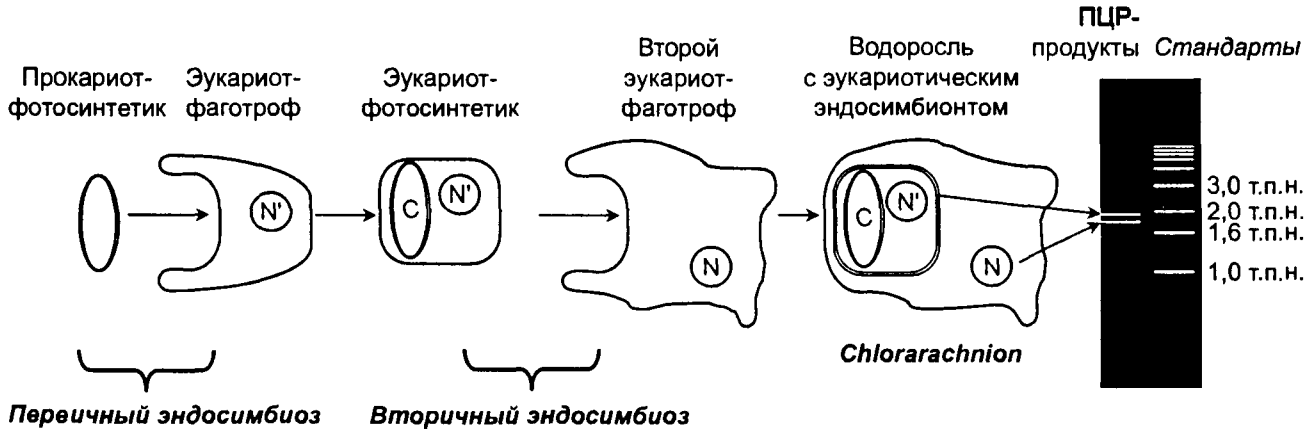


Рис. 7.12. Гипотетическое приобретение хлоропластов во время двух последовательных эндосимбиотических событий. Эукариот захватывает прокариота-фотосинтетика, что приводит к образованию хлоропласта с двойной мембраной (С), как это наблюдается у красных и зеленых водорослей и наземных растений. В процессе вторичного эндосимбиоза клетка водоросли поглощается другим эукариотом, в результате чего образуется хлоропласт с четырьмя мембранами. Ядро (N′) и цитоплазма захваченной клетки локализованы между второй и третьей мембранами хлоропласта. Как показывает ПЦР-анализ рРНК генов, амплифицируется как ген ядра хозяина (N), так и ген редуцированного ядра эндосимбионта (N′) [по McFadden et al., 1994]

го генома *Chlorarachniophyceae* достигает 13 т.п.н., он весьма компактен, гены перекрываются, некоторые из них котранскрибируются. Все семь белковых генов несут миниатюрные интроны [Zauner et al., 2000]. Нуклеоморфы одного из видов криптомонад *Guillardia theta* содержат по три миниатюрные хромосомы. Весьма интересно, что теломеры этих хромосом существенно отличаются от таковых других эукариот: вместо типичного гексамерного повтора (обычно TTAGGG) они несут повтор последовательности $(AG)_7(AAG)_6A$. В отличие от *Chlorarachniophyceae* ни один из 38 белок-кодирующих генов нуклеоморфов *Guillardia* не содержит интронов. Плотность расположения генов на хромосоме (один на 0,8 т.п.н.) является наивысшей из всех встречающихся для любых клеточных геномов [Zauner et al., 2000].

Почему нуклеоморфы сохранились у данных групп, в то время как у всех остальных изученных вторичных эндосимбионтов они отсутствуют? Очевидно, причиной этого должно быть сохранение в них некоторых генов (хотя бы одного), изначально находившихся в ядре водоросли первичного эндосимбионта (N′ на рис. 7.12), необходимых для жизни пластид и не перенесенных в ядро нового хозяина (N). У *Cryptomonada* уже удалось обнаружить два таких необходимых для пластид гена. Один из них — белок FtsZ — прокариотический белок, участвующий в делении клеток, его хлоропластная локализация доказана для высших растений и мхов. Другой ген

rub кодирует белок rubredoxin — железосодержащий переносчик электронов. Был также идентифицирован в нуклеоморфах ген *sut2,* который может участвовать в переносе сульфатов в пластиды. Все остальные гены, обнаруженные в этих редуцированных "реликтовых" ядрах, необходимы для поддержания и репликации самих нуклеоморфов [Zauner et al., 2000].

Подобная же ситуация, вероятно, наблюдается и у *Chlorarachniophyceae*: показана активность в пластидах нуклеоморфного гена субъединицы протеазы *clpP* [Gilson, McFadden, 1996]. Другие гены нуклеоморфов этой группы также кодируют компоненты системы транскрипции и трансляции, но не метаболические ферменты [Zauner et al., 2000].

Таким образом, нуклеоморфы представляют собой уникальные образования, несущие ряд типичных черт эукариотического ядерного генома: хромосомы с теломерами, гистоновые и тубулиновые гены и, вероятно, способность к митотическому делению. В то же время ряд черт нуклеоморфов (короткие межцистронные последовательности, перекрывающиеся и котранскрибирующиеся гены) типичны для органельных геномов и связаны, несомненно, с их внутрипластидной локализацией и особой функцией [Zauner et al., 2000].

Геномы облигатных внутриклеточных паразитов и нуклеоморфы

По размеру генома нуклеоморфы (555 т.п.н. у криптомонады *Guillardia theta*) весьма близки к облигатным внутриклеточным паразитам (580 т.п.н у *Mycoplasma genitalium,* 1,111 т.п.н у *Rickettsia prowazekii*). Однако у внутриклеточных паразитов совершенно иной набор генов — они сохраняют способность кодировать целый ряд метаболических ферментов. В этом и состоит фундаментальное различие: бактерии, являясь облигатными внутриклеточными паразитами, тем не менее остаются независимыми в генетическом плане организмами, в то время как водоросль, ядро которой сохранилось в виде нуклеоморфа криптомонад, давно перестала быть самостоятельным организмом. Она интегрировалась в новую химерную клетку, приобретя способность импортировать необходимые белки из цитоплазмы и обмениваться метаболитами. При этом гены метаболических систем самой водоросли — предка — были постепенно утеряны, кроме тех, которые обеспечивают экспрессию генов, кодируемых нуклеоморфом. У других систематических групп, которые также получили пластиды красных водорослей путем вторичного эндосимбиоза (см. рис. 7.11), все пластидные гены были перенесены в ядро, и нуклеоморф оказался утраченным в процессе эволюции [Zauner et al., 2000].

Зеленое животное Elysia chlorotica — уникальный симбиоз

Термин "симбиоз" при введении его в биологию в XIX в. означал "непохожие организмы, живущие вместе". Длительное существование хлоропластов водоросли в клетках морских слизней *E. chlorotica* (аскоглоссовые моллюски, *Gastropoda*) делает этот симбиоз совершенно уникальным. *E. chlorotica* не единственный вид, участвующий в таком симбиозе: из 86 видов аскоглоссовых 82% имеют зеленую окраску, связанную с хлоропластами. Не у всех видов, однако, хлоропласты длительно существуют в организме, проявляя фотосинтетическую активность [Rumpho et al., 2000].

Обычно моллюск прокалывает или срезает крупные клетки сифоновых водорослей, все содержимое клеток водоросли отбрасывается, за исключением пластид, которые путем фагоцитоза попадают в клетки пищеварительной системы. Так, пластиды *Vaucheria litorea* существуют вне растительной клетки в течение как минимум 9 месяцев, успешно при этом фотосинтезируя и выполняя для животного-хозяина сразу две функции — питания и защиты. Зеленая окраска, которую благодаря хлоропластам приобретают моллюски, делает их незаметными среди водорослей, с другой стороны, продукты фотосинтеза являются исходными для синтеза защитных компонентов и обильной слизи, также оберегающей моллюсков [Mujer et al., 1996; Rumpho et al., 2000]. Как было показано, разные виды водорослей могут быть донорами пластид в симбиозе с моллюсками [Clark et al., 1990].

Как могут пластиды длительно функционировать в отсутствие взаимодействия с клеточным ядром водоросли? Было обнаружено, что после 8 месяцев культивирования пластиды *E. chlorotica* все еще содержали хлоропластную ДНК и транскрипты двух хлоропластных генов, *psbA* и *16S рРНК*. Обнаружены также белки фотосистем, синтезируемые пластидами — D1, D2, CP43, был показан их активный синтез в течение 8 месяцев [Mujer et al., 1996; Rumpho et al., 2000]. Все попытки обнаружить в симбионтах какие-либо следы ядер водорослей не увенчались успехом [Rumpho et al., 2000]. Таким образом, для объяснения столь длительного автономного функционирования пластид можно предположить, что:

- пластиды *V. litorea* обладают необычно высоким уровнем автономии;
- сами пластиды и их белки необычно стабильны;
- минимальный набор белков, необходимый для поддержания активности пластид, меньше, чем предполагалось;
- происходит переадресование белков митохондрий или каких-либо других белков моллюсков с такой же или родственной функцией в пластиды;
- имеется латеральный перенос генов из водорослей в моллюски [Rumpho et al., 2000].

Дальнейшие исследования помогут установить, каким именно путем достигается столь длительное успешное автономное от собственного ядра существование пластид в клетках тела моллюсков.

* * *

В заключение отметим, что последнее десятилетие XX в. принесло существенный прогресс в понимание процессов возникновения клеточных органелл и их структурной организации. Расшифровка первичной структуры ДНК митохондрий и хлоропластов у разных систематических групп позволила воссоздать ряд важнейших этапов формирования мультигеномной клетки эукариот.

Тем не менее ряд моментов, сопровождающих появление внутриклеточных компартментов и их взаимодействие, до сих пор остаются неясными. Так, согласно данным геологии, палеонтологии и молекулярной биологии [Feng et al.,1997; Lang et al., 1999; Han, Runnegar, 1992; Knoll, 1992; Shixing, Huineng, 1995], эукариоты возникли 2 биллиона лет назад. Попытки датировать возникновение митохондрий с помощью молекулярных методов дают цифры, изменяющиеся от 0,9 [Ocham, Wilson, 1987] до > 1,5 биллиона лет [Sicheritz-Pontén et al., 1998]. Таким образом, остается неясным важнейший вопрос: сформировались ли митохондрии одновременно с образованием эукариотической клетки или позднее?

Данные о наличии в ядре "амитохондриальных" организмов генов, кодирующих типичные митохондриальные белки, свидетельствуют о вторичной потере митохондрий этими видами [Clark, Roger, 1995]. Скорее всего будут пересмотрены прежние эволюционные представления об "амитохондриальных эукариотах", однако пока выводы делать преждевременно — требуются дополнительные исследования.

Литература

Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. 319 с.

Одинцова М.С., Юрина Н.П. Геном митохондрий протистов // Генетика. 2002. Т. 38, № 6. С. 773—788.

Ahmanova A., Voncken F., van Allen T. et al. A hydrogenosome with a genome // Nature. 1998. Vol. 396. P. 527—528.

Altmann R. Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig: Viet, 1890.

Andersson S.G., Zomorodipour A., Andersson J.O. et al. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria // Nature. 1998. Vol. 396. P. 133—140.

Bryant D.A. Puzzles of chloroplast ancestry // Curr. Biol. 1992. Vol. 2. P. 240—242.

Bui E.T., Bradley P.J., Johnson P.J. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 9651—9656.

Cavalier-Smith T. The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts and microbodies // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987. Vol. 503. P. 55—71.

Cavalier-Smith T. Eukaryotes with no mitochondria // Nature. 1987. Vol. 326. P.332—333.

Chiu N. Chiu A., Suyama Y. Native and imported transfer RNA in mitochondria // J. Mol. Biol. 1975. Vol. 99. P. 37—50.

Clark C.G., Roger A.J. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1995. Vol. 92. P. 6518—6521.

Clark K.B., Jensen K.R., Stirts H.M. Survey for functional kleptoplasty among west Athlantic ascoglossa (=ascoglossa; Mollusca: Opisthobranchia) // Veliger. 1990. Vol. 33. P. 339—345.

Covello P.S., Gray M.W. Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome *c* oxidase *(cox2)* in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer // EMBO J. 1992. Vol.11. P. 3815—3820.

Court D.A., Bertrand H. Expression of the open reading frames of a senescence-inducing, linear mitochondrial plasmid of *Neurospora crassa* // Plasmid. 1993. Vol. 30. P. 51—66.

Delwiche C.F., Palmer J.D. The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis // Origin of Algae and their Plastids. Vienna; New York.: Springer-Verlag, 1997. P. 53—86.

Dohmen G., Tudzynski P. A DNA-polymerase-related reading frame *(pol–r)* in the mtDNA of *Secale cereale* // Curr. Genet. 1994. Vol. 25. P. 59—65.

Douglas S.E. Plastid evolution: origins, diversity, trends // Curr. Opin. Genet. Dev. 1998. Vol. 8. P. 655—661.

Douglas S.E., Tumer S. Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor // J. Mol. Evol. 1991. Vol. 33. P. 267—273.

Dyer T.A., Bowman C.M. Nucleotide sequences of chloroplast 5S ribosomal ribonucleic acid in flowering plants // Biochem. J. 1979. Vol. 183. P. 595—604.

Feng D.-F., Cho G., Doolittle R.F. Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 13028—13033.

Finlay B.J., Fenchel T. Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria // FEMS Microbial. Lett. 1989. Vol. 65. P. 311—314.

Gillham N.W. Organelle genes and genomes. New York.: Oxford University Press, 1994. 424 p.

Gilson P., McFadden G.I. The miniaturized nuclear genome of a eukaryotic endosymbiont contains genes that overlap, genes that are cotranscribed, and the smallest known spliseosomal introns // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 7737—7742.

Gray M.W. The evolutionary origins of organelles // Trends Genet. 1989. Vol. 5. P. 294—299.

Gray M.W. Origin and evolution of organelle genomes // Curr. Opin. Genet. Dev. 1993. Vol. 3. P. 884—890.

Gray M.W. Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection // Nature. 1998. Vol. 396. P. 109—110.

Gray M.W., Lang B.F. Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases // Trends Microbiol. 1998. Vol. 6. P. 1—3.

Gray M.W., Lang B.F., Cedergren R. et al. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNA // Nucl. Acids Res. 1998. Vol. 26, No. 4. P. 865—878.

Gray M.W., Spencer D.F. Organellar evolution // Evolution of Microbial Life. Cambridge: Cambridge University Press. 1996. Vol. 54. P. 109—126.

Gross L. How Charles Nicolle of the Pasteur Institute discovered that epidemic typhus is transmitted by lice: reminiscences from my years at the Pasteur Institute in Paris // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 10539—10540.

Han T.-M., Runnegar B. Megascopic eukaryotic algae from the 2.1-billion-year-old Negaunee iron-formation Michigan // Science. 1992. Vol. 257. P. 232—235.

Hauser R., Schneider A. tRNAs are imported into mitochondria of *Trypanosoma brucei* independently of their genomic context and genetic origin // EMBO J. 1995. Vol. 14. P. 4212—4220.

Hermanns J., Osiewacz H.D. Three mitochondrial unassigned open reading frames of *Podo-*

spora anserine represent remnants of a viral-type RNA polymerase gene // Curr. Genet. 1994. Vol. 25. P. 150—157.

http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/

http://www.asmusa. org/acasrc/aca1.html "The microbial world: foundation of the biosphere"

Kaneko T., Sato S., Kotani H. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions // DNA Res. 1996. Vol. 3. P.109—136.

Knoll A.H. The early evolution of eukaryotes: a geological perspective // Science. 1992. Vol. 256. P. 622—627.

Lang B.F., Burger G., O'Kelly C.J. et al. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature // Nature. 1997. Vol. 387. P. 493—497.

Lang B.F., Gray M.W., Burger G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes // Ann. Rev. Genet. 1999. Vol. 33. P. 351—397.

Larsson N.G., Clayton D.A. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders // Ann. Rev. Genet. 1995. Vol. 29. P. 151—178.

Mai Z., Ghosh S., Frisardi M. et al. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica* // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol.19. P. 2198—2205.

Maréchal-Drouard L., Small I., Weil J.-H., Dietrich A. Transfer RNA import into plant mitochondria // Methods Enzymol. 1995. Vol. 360. P. 310—327.

Margulis L. Origin of eukaryotic cells. New Haven, CT: Yale University Press, 1970. 349 p.

Margulis L. Symbiosis in Cell Evolution. San Francisco: Freeman, 1981. 419 p.

Margulis L. Archaeal-eubacterial merges in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P.1071—1076.

Martin W., Müller M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote // Nature. 1998. Vol. 392. P. 37—41.

Martin W., Stoebbe B., Goremykin V. et al. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts // Nature. 1998. Vol. 393. P. 162—165.

McFadden G.I. Chloroplast origin and integration // Plant Physiology. 2001. Vol.125. P. 50—53.

McFadden G.I., Gilson P.R., Hofmann C.J.B. et al. Evidence that an amoeba aquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 3690—3694.

Moreira D., Lopez-Garcia P. Symbiosis between methanogenic Archaea and δ-Proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis // J. Miol. Evol. 1998. Vol. 47. P. 517—530.

Mujer C.V., Andrews D.L., Manhart J.R. et al. Chloroplast genes are expressed during intracellular symbiotic association of *Vaucheria litorea* plastids with the sea slug *Elysia chlorotica* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 12333—12338.

Müller M. The hydrogenosome // J. Gen. Microbiol. 1993. Vol.139. P. 2879—2889.

Nugent J.M., Palmer J.D. RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution // Cell. 1991. Vol. 66. P. 473—481.

Ocham H., Wilson A.C. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes // J. Mol. Evol. 1987. Vol. 26. P. 74—86.

Palmer J.D. Organelle genomes: going, going, gone! // Science. 1997. Vol. 275. P. 790—791.

Pont-Kingdon G.A., Okada N.A., Macfarlane J.L. et al. A coral mitochondrial *mutS* gene // Nature. 1995. Vol. 375. P. 109—111.

Pont-Kingdon G.A., Okada N.A., Macfarlane J.L. et al. Mitochondrial DNA from one of the coral *Sarcophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: o possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondrion // J. Mol. Evol. 1998. Vol. 46. P. 419—431.

Roger A.J., Svärd S.G., Tovar J. et al. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia:* evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1998. Vol. 95. P. 229—234.

Ryan K.R., Jensen R.E. Protein translocation across mitochondrial membranes: What a long strange trip it is // Cell. 1995. Vol. 83. P. 517—519.

Rumpho M.E., Summer E.J., Manhart J.R. Solar-powered sea slugs. Mollusc/algal chloroplast symbiosis // Plant Physiol. 2000. Vol.123. P. 29—38.

Schimper A.F.W. Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Fabrkörner (1. Teil) // Bot. Z. 1883. Bd. 41. S. 105—114.

Schwartz Z., Kössel H. Sequencing of the 3'-terminal region of a 16S rRNA gene from *Zea mays* chloroplast reveals homology with *E.coli* 16S rRNA // Nature. 1979. Vol. 279. P. 520—522.

Schwartz Z., Kössel H. The primary structure of 16S rDNA from *Zea mays* chloroplast is homologous to *E.coli* 16S rRNA // Nature. 1980. Vol. 283. P. 739—742.

Shixing Z., Huineng C. Megascopic multicellular organisms from the 1700-million-year Tuanshanzi Formation in the Jixian area, north China // Science. 1995. Vol. 270. P. 620—622.

Sicheritz-Pontén T., Kurland C.G., Anderson S.G.E. A phylogenetic analysis of the cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1365. P. 545—551.

Smith H. B. Interorganellar communication and the onus of being eukaryotic // Plant Cell. 1999. Vol.11. P. 1605—1608.

Sogin M.L., Gunderson J.H., Elwood H.J. et al. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia* // Science. 1989. Vol. 243. P. 75—77.

Staley J.T., Konopka A.E. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // Annu. Rev. Microbiol. 1985. Vol. 39. P. 321—346.

Stirewalt V.L., Michalowski C.B., Loffelhardt W. et al. Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa* // Plant Mol. Biol. Reporter. 1995. Vol.13. P. 327—332.

Sugiura M., Hirose T., Sugita M. Evolution and mechanisms of translation in chloroplasts // Ann. Rev. Genet. 1998. Vol. 32. P. 437—459.

Suyama Y., Preer J.R. Mitochondiral DNA from protozoa // Genetics. 1965. Vol. 52. P. 1051—1058.

Takano H., Kawano S., Kuroiwa T. Complex terminal structure of a linear mitochondrial plasmid from *Physarum polycephalum:* three terminal inverted repeats and an ORF encoding DNA polymerase // Curr. Genet. 1994. Vol. 25. P. 252—257.

Tarassov I.A., Martin R.P. Mechanisms of tRNA import into yeast mitochondria: an overview // Biochimie. 1996. Vol. 78. P. 502—510.

Taylor F.J.R. Implication and extensions of the Serial Endosymbiosis Theory of the origin of eukaryotes // Taxon. 1974. Vol. 23. P. 229—258.

Tomioka N., Sugiura M. The complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans* // Mol. Gen. Gen. 1983. Vol. 191. P. 46—50.

Tovar J., Fisher A., Clark C.G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica* //Mol. Microbiol. 1999. Vol. 32. P. 1013—1021.

Turmel M., Otis S., Lemieux C. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea:* insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96. P. 10249—10253.

Vellai T., Takacs K., Vida G. A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes // J. Mol. Evol. 1998. Vol. 46. P. 499—507.

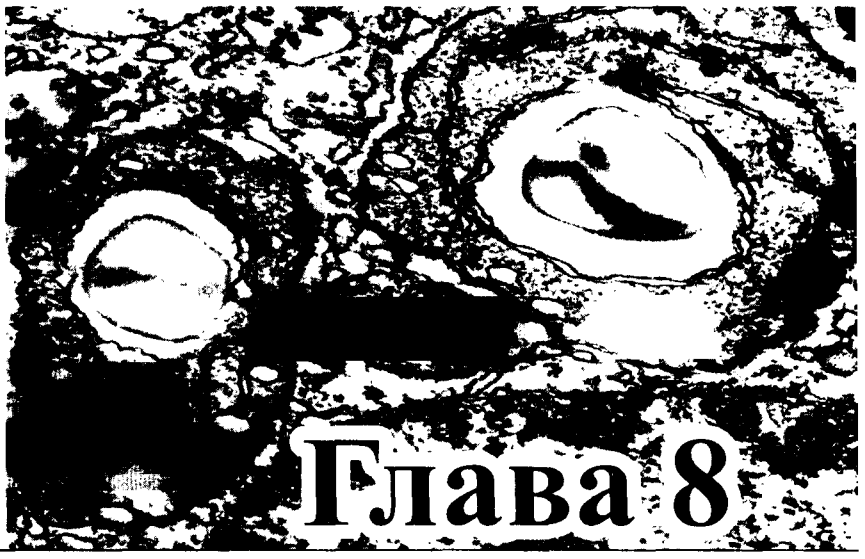
Vossbrinck C.R., Maddox J.V., Friedman S. et al. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes // Nature. 1987. Vol. 362. P. 411—414.

Weber B., Börner T., Weihe A. Remnants of a DNA polymerase gene in the mitochondrial DNA of *Marchantia polymorpha* // Curr. Genet. 1995. Vol. 27. P. 488—490.

Wolfe G.R., Cunningham F.X., Durnford D. et al. Evidence for a common origin of chloroplasts with light-harvesting complexes of different pigmentation // Nature. 1994. Vol. 367. P. 566—568.

Zauner S., Fraunholz M., Wastl J. et al. Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2000. Vol. 97, No.1. P. 200—205.

Zhang Z., Green B.R., Cavalier-Smith T. Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes // Nature. 1999. Vol. 400. P. 155—159.



Глава 8

Перемещение органельных генов в ядро. Взаимодействие клеточных геномов

ОБРАЗОВАНИЕ эукариотической клетки сопровождалось значительной реконструкцией входящих в нее компонентов. Изначально автономные организмы, предшественники органелл, потеряв "независимость", утратили надобность в большинстве своих генов. Так, секвенированный геном свободноживущей сине-зеленой водоросли *Synechocystis* sp. PCC6803 состоит из 3168 генов [Kaneko et al., 1996, см. литературу к главе 7], в то время как геном пластид — не более чем из 300, а чаще всего — менее чем из 100 генов [Herrmann, 1997; Sugiura et al., 1998, см. литературу к главе 7]. Гены, необходимые для функционирования органелл, в подавляющем большинстве случаев локализованы вне органелл, переместившись в ядро. Хромосомы современных пластид содержат менее 5% всех генов клетки, столько же или меньше генов содержится и в митохондриях большинства организмов [Herrmann, 1997; Palmer et al., 2000]. По современным оценкам исследователей, общее число белков, связанных со структурой пластид и регуляцией их экспрессии, составляет от 2000 до 5000 [Martin, Herrmann, 1998]. Эукариотизм привел к перемещению и утрате значительного числа генов и к установлению ядерного доминирования в регуляции всех клеточных процессов [Allen, Raven, 1996; Blanchard, Lynch, 2000; Herrmann, 1997]. В данной главе мы рассмотрим ряд моментов, связанных с внутриклеточной координацией и перераспределением генетического материала.

Редукция органельных геномов

В процессе эволюции судьба органельных генов могла развиваться по трем сценариям: 1) часть генов, кодировавших белки, необходимые свободноживущим предкам органелл, оказались навсегда утерянными; 2) многие гены были перенесены в ядро; 3) небольшой набор генов сохранился в органеллах — 50—200 в пластидах и 5—60 в митохондриях [Stoebe et al., 1998; Gray et al., 1998; Palmer et al., 2000].

Массивная утрата генов органелл по сравнению с организмами-предшественниками, связанная с переходом к эндосимбиозу, отражена в обобщенном виде на рис. 8.1. Очевидно, что в геномах как пластид, так и митохондрий остаются прежде всего гены двух основных категорий: 1) кодирующие белки биоэнергетических мембран (фотосинтеза и дыхания), 2) участвующие в экспрессии органельных генов. Из 3168 генов *Synechocystis* только 46 сохранились во всех секвенированных пластидных геномах, при этом 44 из них относятся к двум вышеперечисленным группам (табл. 8.1) [Race et al., 1999].

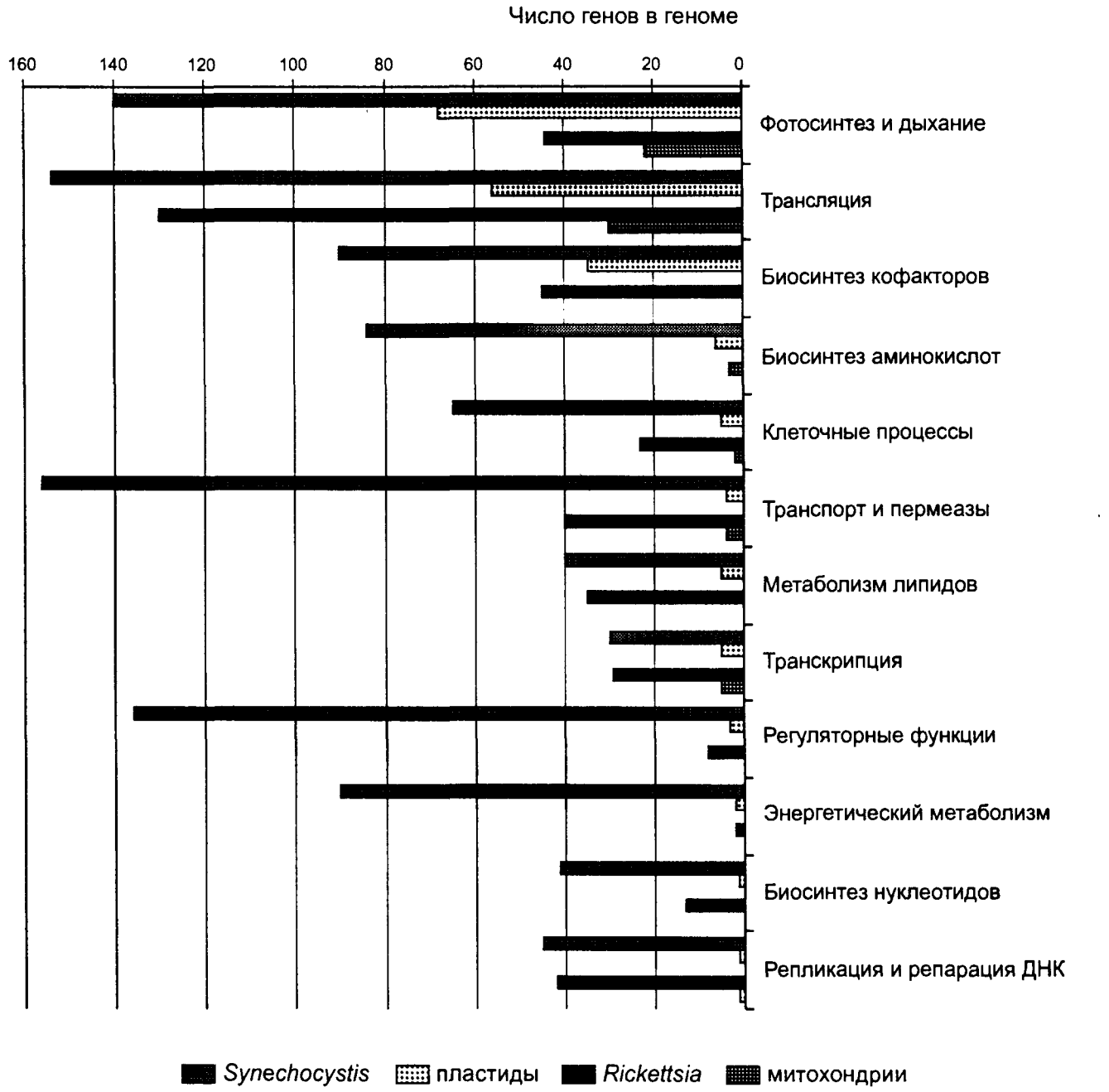


Рис. 8.1.Типы генов в органеллах и у свободноживущих предшественников [по Race et al., 1999] и число генов различных функциональных групп в геномах пластид и митохондрий в сравнении с таковым свободноживущих эубактериальных предшественников, цианобактерии *Synechocystis* и α–протеобактерии *Rickettsia prowazekii*

На основании всех имевшихся к 1998 г. данных о секвенированных пластидных геномах водорослей и высших растений было построено филогенетическое дерево "генных потерь" (см. рис. 7.10). Оказалось, что утраты одних и тех же генов параллельно в независимых филогенетических ветвях происходят гораздо чаще, чем уникальные потери определенных генов. Очевидно, последствия утраты различных генов неравнозначны, чем и определяется во многом ход редукции органельных геномов [Martin et al., 1998].

Таблица 8.1

Уменьшение количества пластидных генов, кодирующих белки, по сравнению с геномом сине-зеленой водоросли *Synechocystis* [по Race et al., 1999]

Геном	Транспорт электронов и связанные процессы					Экспрессия генов		Другие гены	Всего
	PSII	Cyt b_6/f	PSI	АТФаза	фиксация CO_2	РНК-полимераза[а]	рибосомные		
Synechocystis	25	8	12	9	24	12	53	3025	3168
Любой пластидный геном[б]	16	7	12	8	2	4	48	159	256
Все пластидные геномы[б]	13	2	4	5	1	3	16[в]	2[г]	46

[а] Включая сигма-факторы.

[б] На основании 10 секвенированных функционально полноценных пластидных геномов (*Plasmodium* и *Epifagus* исключены из анализа) [Kaneko et al., 1996; Martin et al., 1998].

[в] С учетом *Chlorella* не 16 [Martin et al., 1998], а 15 генов.

[г] Открытые рамки считывания с неизвестной функцией: *ycf4* и *ycf9*.

Как в случае хлоропластного, так и митохондриального геномов в самих органеллах остаются гены, кодирующие основные белки фотосинтетических реакционных центров (24 гена) и интегральных компонентов дыхательной цепи (гены *cytb* и *cox2*) [Herrmann, 1997; Gray et al., 1998; Race et al., 1999; Sugiura et al., 1998, см. литературу к главе 7].

Существует несколько гипотез, с помощью которых делаются попытки объяснить сохранение именно этих генов в органеллах. В митохондриях обычно локализуются гены, чьи продукты имеют много гидрофобных трансмембранных доменов. Согласно "гидрофобной" гипотезе, транспорт таких белков через мембраны чрезвычайно сложен, поэтому кодирующие их гены сохраняются в соответствующих органеллах. Действительно, *cytb* и *cox2* являются самыми гидрофобными митохондриальными белками [Gray et al., 1998; Martin, Schnarrenberger, 1997].

Другая гипотеза сохранения в органеллах ряда генов — "токсическая" — предполагает, что при переносе определенных генов из их исконных компартментов продукты этих генов в цитозоле или других органеллах могут оказаться токсичными для нового окружения [Martin, Schnarrenberger, 1997]. Экспериментальных подтверждений данной гипотезы пока не получено [Palmer et al., 2000].

Третья гипотеза базируется на предположении о важности окислительно-восстановительного регулирования генной активности в органеллах. Та-

кие данные были получены для хлоропластных генов, участвующих в фотосинтетических процессах. Функционально эти гены связаны с чрезвычайно "опасными" участками цепей электронного транспорта: если возникает нехватка структурных компонентов цепи, электроны передаются несоответствующим акцепторам или поступают от "неправильных" доноров. Это может приводить к фотооксидации или к образованию высокотоксичных супероксидных радикалов [Allen, Raven, 1996; Race et al., 1999]. Доказательства редокс-регуляции экспрессии органельных генов получены пока только для пластид, но не для митохондрий [Palmer et al., 2000].

Подробный анализ эволюционных изменений митохондриальных геномов покрытосеменных растений, выполненный на представителях 278 родов из 191 семейства, показал общую закономерность: у разных растений потеряно 10 из 14 генов белков рибосом (всего 200 случаев) и лишь 2 случая потери генов дыхательной цепи — *cox2* у *Vigna* и *nad3* у *Piperaceae*. Исключение составил малый ген *sdh4* — наблюдалось 10 независимых потерь этого гена в разных семействах. При этом в ряде семейств, включая наиболее древние, сохранились все 14 генов белков рибосом, тогда как в других, эволюционно более молодых, потеряно по 10 и более генов. Вероятно, какие-то пока неизвестные факторы вызывают быструю редукцию генов в этих семействах [Palmer et al., 2000].

Изменение локализации органельных генов

Редукция органельных геномов часто сопровождается не полной утратой отдельных генов, а переносом их в ядро.

После включения органельного гена в ядерную ДНК необходимо пройти еще ряд этапов, чтобы достичь экспрессии этого гена и возврата в органеллы кодируемого им продукта. Этот продукт может быть ферментом, не имеющим субъединичной структуры, как, например, локализованная в пластидах глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, ген которой стал ядерным [Martin, Schnarrenberger, 1997], либо представлять собой субъединицу мультимерной белковой молекулы, как в случае рибулозодифосфаткарбоксилазы, малая субъединица которой у большинства видов растений кодируется ядром, тогда как большая — пластидной ДНК [Kawashima, Wildman, 1972; Herrmann, 1997]. Отметим, что в пластидных геномах *Porphyra* (*Rhodophyta*) и бурых водорослей обнаружены гены как большой, так и малой субъединиц рибулозодифосфаткарбоксилазы [Reith, Munholland, 1995, см. литературу к главе 2]. Очевидно, данная эволюционная ветвь сохранила исходную пластидную локализацию генов обеих субъединиц.

Локализация генов в разных компартментах клетки характерна также для таких мультимерных молекул, как пластидная ацетил-СоА-карбоксилаза

[Sasaki et al., 1995], Clp-протеаза [Adam, 1996], митохондриальная цитохромоксидаза [Unseld et al., 1997, см. литературу к главе 4], для тилакоидных мембран пластид [Herrmann et al., 1991], для белков рибосом, тРНК и др. (см. литературу к главам 2, 4, 5). Как уже отмечалось в главе 4, значительная часть тРНК генов митохондрий некоторых низших и всех высших растений импортируется из ядра, при этом ряд тРНК генов имеет пластидное происхождение [Brennicke et al., 1993; Marienfeld et al., 1999, см. литературу к главе 4] — яркий пример обмена информацией не только с ядром, но и между пластидами и митохондриями.

Из всех известных пластидных генов наиболее мобильным является ген *infA,* кодирующий фактор инициации трансляции IF1. Показано, что хотя данный ген у большинства из 300 исследованных видов покрытосеменных функционирует в пластидном геноме, он становился нефункционирующим или утрачивался независимо приблизительно в 24 родах покрытосеменных [Millen et al., 2001]. У четырех видов (в том числе у сои и арабидопсиса) показаны перенесенные в ядро и функционирующие там копии *infA* с хлоропластными транзитными пептидами, что указывает на ре-импорт IF1 фактора в пластиды. Определение последовательности нуклеотидов как самих генов, так и транзитных пептидов свидетельствует о том, что эти четыре переноса генов из хлоропластов в ядро произошли независимо друг от друга в ходе эволюции покрытосеменных [Millen et al., 2001].

В предыдущей главе рассматривались нуклеоморфы водорослей — вторичных эндосимбионтов, являющиеся примером крайне редуцированных геномов "пластидных ядер", передавших большинство генов в ядро. В этих организмах произошла, очевидно, двухступенчатая передача генов: вначале из первичных пластид в ядра (ставшие позднее нуклеоморфами), затем, после вторичного эндоцитосимбиоза (см. рис.7.11), в ядро клетки-хозяина [Herrmann, 1997].

Удивительно, но некоторые ферменты современных хлоропластов являются не цианобактериальными, а скорее протеобактериальными белками, кодируемыми генами митохондриальной природы. Очевидно, данные гены были перенесены из митохондрий в ядро, а продукты этих генов, присоединив соответствующие транзитные пептиды, оказались в пластидах, где заменили цианобактериальных предшественников [Martin, Schnarrenberger, 1997]. Гипотетическая схема такого «трехступенчатого» взаимодействия представлена на рис. 8.2.

"Многоступенчатый" переход совершил ген рибосомального белка — *rps13.* У представителей многих rosids ген *rps13* отсутствует в митохондриальном геноме, не обнаруживается мт-копия этого гена и в ядре *Arabidopsis*, сои, хлопка. Вместо нее эти rosids содержат измененную копию *rps13* гена

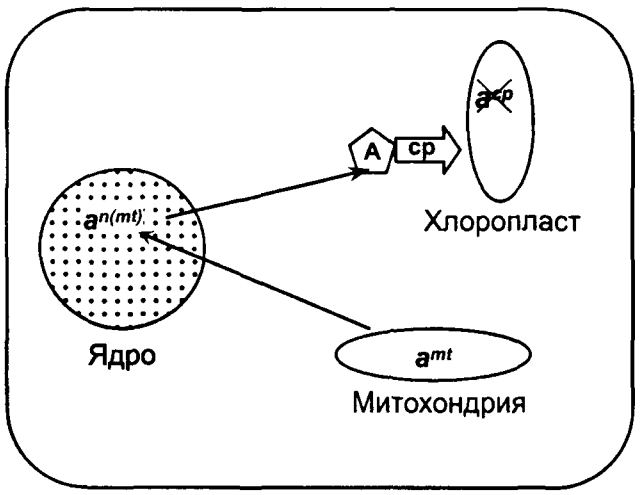


Рис. 8.2. Ген митохондриального происхождения может кодировать белок, импортируемый в пластиды, по гипотетической схеме: условный гена *a* перенесен из митохондрий в ядро $a^{mt} \rightarrow a^{n}$. Продукт гена (A), приобретя транзитный пептид (cp), импортируется в хлоропласты, тогда как гомологичный ген пластид a^{cp} в процессе эволюции элиминируется

хлоропластного происхождения; показано, что продукт экспрессии этого гена у всех трех изученных видов импортируется *in virto* в изолированные митохондрии, но не в пластиды. Очевидно, ген *rps13* был утерян из мтДНК и заменен дуплицированной ядерной копией, имеющей исходное пластидное происхождение, на ранних этапах эволюции rosids [Adams et al., 2002]. Что касается митохондриального гена *rps8*, то его не удалось обнаружить ни в митохондриях, ни в ядре ни одного из изученных покрытосеменных. Вместо утерянного в процессе эволюции гена *rps8* в ядре четырех представителей покрытосеменных и одного — голосеменных найден его измененный аналог, кодирующий цитоплазматический белок *rps15A*. Показано, что продукт данного гена успешно импортируется *in virto* в митохондрии *Arabidopsis* и томатов. Вероятно, в данном случае потеря митохондриального гена *rps8* и успешная замена его на измененный вариант ядерного аналога *rps15* произошли еще у общего предка голо- и покрытосеменных [Adams et al., 2002].

Важнейшим условием, при котором транслокация генов в ядро не приведет к отрицательным для клетки последствиям, является возможность импорта в органеллы белков, которые кодируются этими генами. Перенос белков через двойную мембрану органелл, отщепление транзитных пептидов и регуляция внутриорганельной локализации "пришельцев" осуществляются сложной системой импорта белков [Martin, Herrmann, 1998; Schatz, Dobberstein, 1996], детальное рассмотрение которой не входит в нашу задачу. В конце этой главы будут рассматриваться лишь некоторые ключевые моменты, связанные с импортом белков в митохондрии и особенностями регуляции внутриклеточного распределения ферментов.

На схеме (рис. 8.3) представлены уже выявленные и предполагаемые пути передачи генетической информации в клетках эукариот — первичных и вторичных эндосимбионтов.

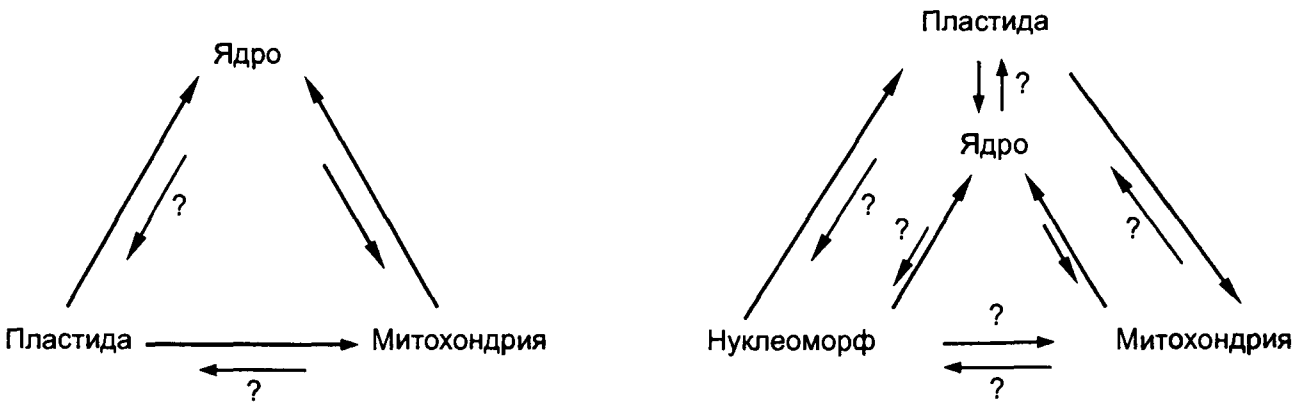


Рис. 8.3. Внутриклеточный перенос генетической информации, сопровождающий эволюцию эукариотической клетки в первичных и терминальных вторичных системах (слева) и в промежуточных вторичных эндоцитобиотических системах (справа) [по Herrmann, 1997]

Механизм переноса органельных генов в ядро

Процесс переноса генов в ядро начинается с перемещения отдельных копий органельной ДНК. У дрожжей плазмидная ДНК транспортируется из митохондрий в ядро с частотой $5 \cdot 10^{-6}$ на клеточную генерацию [Thorsness, Fox, 1990]. Однако большинство из этих мтДНК остаются вне хромосом и лишь менее 1% этой ДНК встраивается в ядерный геном [Thorsness, Weber, 1996].

Вероятность переноса ДНК из митохондрий в ядро зависит от генотипа: у разных штаммов дрожжей частота импорта в ядро плазмидной митохондриальной ДНК различалась в четыре раза. Интересно, что у тех же штаммов отклонение температурных условий от оптимальных в ту или иную сторону также приводит к увеличению частоты передачи плазмиды в ядро (табл. 8.2) [Thorsness, Fox, 1990].

Таблица 8.2

Частота переноса плазмиды рМК2 из митохондрий в ядро у различных штаммов дрожжей [по Thorsness, Fox, 1990]

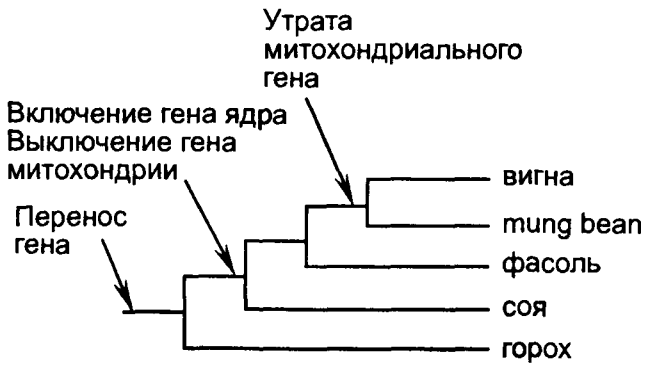
Штамм	Температура культивирования, °С	Частота переноса на клетку на генерацию
PTY2	30	$2 \cdot 10^{-5}$
PTY16	30	$9 \cdot 10^{-5}$
PTY 17	30	$4 \cdot 10^{-5}$
PTY17	37	$10 \cdot 10^{-5}$
PTY17	14	$8 \cdot 10^{-5}$

Поскольку встраивание нередко приводит к разрушению ядерных генов (73% генома дрожжей занимают белок-кодирующие области), частота интегрирования в геном гораздо ниже частоты инсерций. Анализ геномных ядерных последовательностей дрожжей позволил выявить несколько участков митохондриальной ДНК, ни один из которых не составлял полного гена [Blanchard, Smith, 1996]. В ядерных геномах животных и растений, подобно дрожжевым, также встречаются фрагменты митохондриальных генов, размер которых обычно не превышает 150 п.н. [Blanchard, Smith, 1996]. Однако существуют и мультигенные блоки пластидных и митохондриальных генов в ядерном геноме. Например, у кошачьих в ядре обнаружен митохондриальный сегмент размером 7,9 т.п.н., являющийся следствием переноса участка митохондриального генома в ядерный и его многократной амплификации [Lopez et al., 1994]. Неожиданный результат был получен при анализе нуклеотидной последовательности второй хромосомы ядра *Arabidopsis thaliana* — оказалось, что эта хромосома содержит фактически полную копию митохондриального генома данного вида, при этом некоторые участки представлены несколькими копиями [Lin et al., 2000; Stupar et al., 2001]. Мультигенные блоки митохондриальной ДНК были выявлены также при выполнении проекта секвенирования генома человека. Являются ли эти транслоцированные фрагменты полноценными функционирующими ядерными генами, пока неясно [Blanchard, Smith, 1996; Blanchard, Lynch, 2000].

Следует подчеркнуть, что одни систематические группы, например растения, имеют значительно больше некодирующих участков в ядерной ДНК, соответственно и транспортированных из органелл генов в ядрах у них больше, чем в компактных ядерных геномах, например *Saccharomyces cerevisiae* или *Caenorhabditis elegans* [Blanchard, Lynch, 2000].

Как фактически осуществляется перенос ДНК? Наиболее вероятно, что это происходит посредством РНК-комплементарных копий [Covello, Gray, 1992; Nugent, Palmer, 1991; Wichmann, Schuster, 1995]. Обратной транскрипции подвергается митохондриальная мРНК-молекула после редактирования (см. главу 10); этот процесс теоретически может происходить в самих органеллах, в цитоплазме или уже в ядре. На следующем этапе ДНК встраивается в ядерный геном — это происходит путем репарации двунитчатых разрывов, как показано для дрожжей [Ricchetti et al., 1999], а возможно, и какими-то другими способами.

Показано, что ядерные копии гена *cox2,* перенесенного у коровьего гороха из митохондрий в ядро, больше напоминают отредактированные мРНК-матрицы этого гена, чем его митохондриальные ДНК-аналоги: нуклеотидные замены произошли в 23 точках из 30 редактируемых (см. "РНК-редактирование", глава 10) [Nugent, Palmer, 1991]. На рис. 8.4 представлена эволюционная схема переноса в ядро гена *cox2.*



ген		РНК	
мт	ядро	мт	ядро
–	+	–	+
–	+	–	+
+	+	–	+
+	+	–	+
+	+	+	–

Рис. 8.4. Схема функционального переноса гена *cox2* в процессе эволюции покрытосеменных. Филогенез основан на морфологических данных. Таблица справа отражает внутриклеточное распределение генов *cox2* и указывает, какой из них экспрессируется у каждого растения [по Nugent, Palmer, 1991]

Следует отметить, что в ядре до сих пор не найдено ни одной отредактированной последовательности пластидных генов [Blanchard, Lynch, 2000], возможно, это связано с гораздо менее интенсивным редактированием генов пластид по сравнению с митохондриальными у растений.

Насколько длителен в естественных условиях процесс переноса генов в ядро? Теоретические расчеты, основывающиеся на частоте мутаций в отдельных клеточных компартментах и других параметрах, оценивают время переноса генов в ядро в среднем в несколько миллионов лет. Однако реальная продолжительность такого переноса, например, для генов митохондриального *cox2* и пластидного *rpl22* по меньшей мере 60 миллионов лет [Nugent, Palmer, 1991; Blanchard, Lynch, 2000]. С чем связана такая растянутость процесса во времени? При экспериментальном встраивании в ядро пластидных генов наблюдается очень слабая их экспрессия (3—10% от нормального уровня) [Kanevski, Maliga, 1994]. Вероятно, при спонтанном переносе копий органельных генов в ядро они вначале также слабо экспрессируются, и отбор действует в пользу сохранения органельных копий. Постепенно ядерные копии дуплицируются, их экспрессия усиливается; со временем надобность в органельных копиях отпадает, и они утрачиваются в процессе эволюции [Blanchard, Lynch, 2000].

При анализе митохондриальных геномов покрытосеменных были обнаружены отдельные группы родов, для которых характерны значительно большие скорости переноса в ядро рибосомальных генов, чем для других покрытосеменных. Почему через 2 биллиона лет после возникновения митохондрий в них еще остались "легко транспортируемые" в ядро гены, тогда как животные утратили их по крайней мере 0,6 биллиона лет назад, еще до того, как стали животными? По причинам, пока непостижимым,

перенос генов из органелл в ядро у растений продолжается, в то время как в течение всего долгого периода эволюции многоклеточных животных не произошло ни одного функционального переноса [Palmer et al., 2000].

Экспрессия транслоцированных генов

После включения участка органельной ДНК в ядерный геном должен произойти ряд процессов, которые обеспечат работу этого гена. Прежде всего он должен экспрессироваться в соответствии с потребностью клетки и организма в целом, продукт данного гена должен присоединять транзитный пептид, который обеспечит трансмембранный транспорт и возвращение его в органеллы [Blanchard, Lynch, 2000; Palmer et al., 2000]. Несмотря на все сложности, эти процессы происходят практически во всех систематических группах. Так, после появления наземных растений по крайней мере 11 митохондриальных генов (*cox2, cox3, rps2, rps7, rps10, rps11, rps12, rps14, rps19, rpl6, sdhC*) и один пластидный ген (*rpl22*) успешно переместились в ядро [Martin, Herrmann, 1998; см. также литературу к главе 4: Brennicke et al., 1993; Marienfeld et al., 1999]. Перенос гена *rps10* изучался при анализе 277 различных видов покрытосеменных — показано 26 независимых потерь этого гена из митохондрий и появление соответствующих копий в ядре [Adams et al., 2000].

Для некоторых белков, гены которых были перенесены из митохондрий в ядро, удалось установить источник транзитного пептида. Так, бывший митохондриальный ген *rps11* начал функционировать в ядре после присоединения к нему перед его белок-кодирующей областью N-терминального участка гена субъединицы цитохромоксидазы в результате рекомбинации ядерной ДНК. Удивительно, но в ядре была обнаружена еще одна копия гена *rps11,* однако с другим N-терминальным участком — митохондриальной субъединицы АТФазы. Вероятно, дупликация гена *rps11* произошла в ядре, после чего дуплицированные гены приобрели разные N-концевые последовательности. Митохондриальная копия гена *rps11* не функционирует (содержит внутренний стоп-кодон), хотя ген транскрибируется и редактируется [Kadowaki et al., 1996].

Митохондриальный ген *rps14* у риса и кукурузы интегрируется в интрон ядерного гена сукцинатдегидрогеназы (SDH), и оба белка синтезируются под контролем ядерного генома путем альтернативного сплайсинга (рис. 8.5). В данном случае органельный ген стал активной ядерной копией, получив N-терминальную область от ранее локализовавшегося в ядре гена *SDH* митохондриального фермента [Kubo et al., 1999; Figueroa et al., 1999]; тем са-

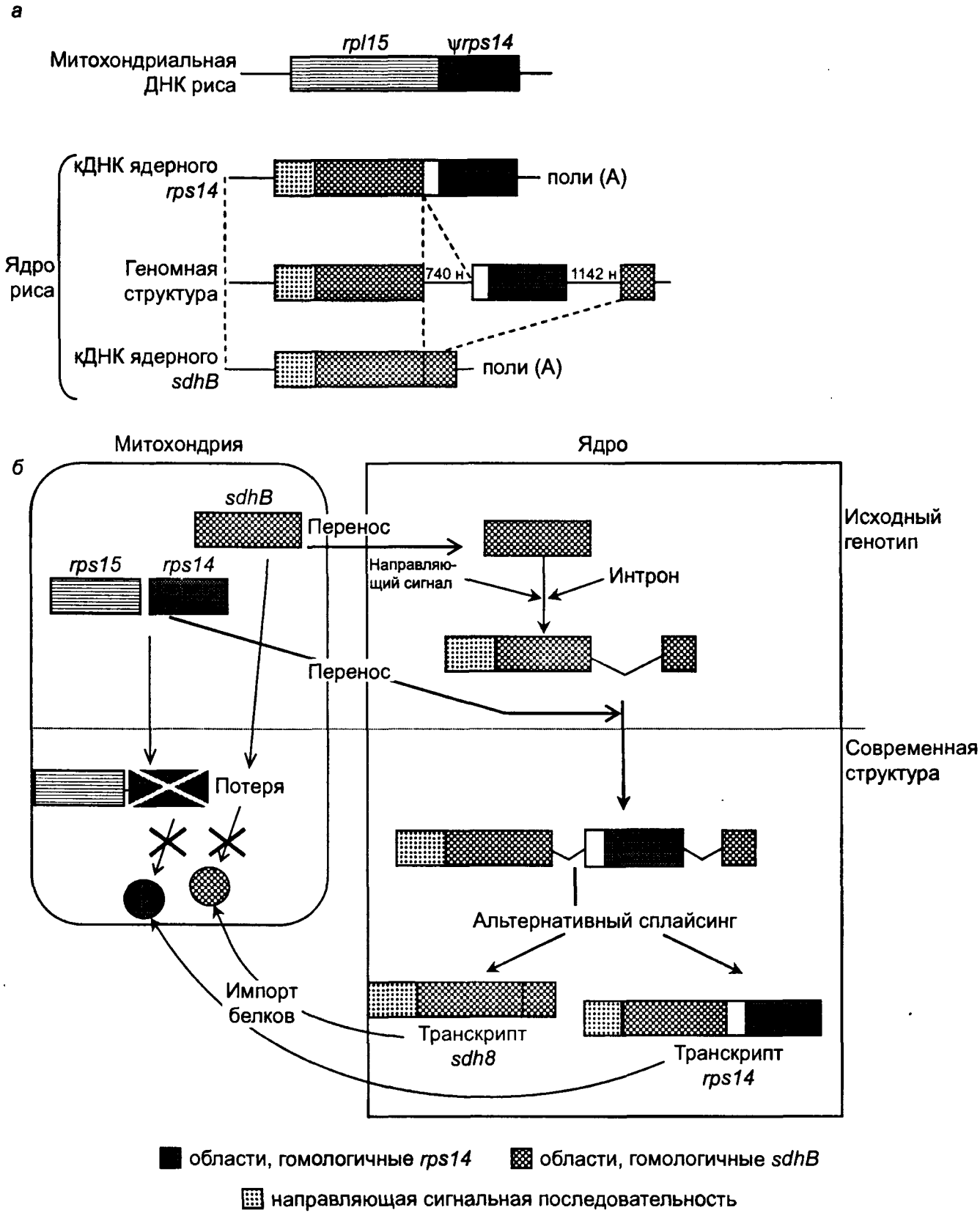


Рис. 8.5. Модель переноса генов *rps14* и *sdhB* из митохондрий в ядро [по Kubo et al., 1999]. *а* — схематическая структура генов риса — рибосомального *rps14* и одной из субъединиц сукцинатдегидрогеназы. ψ*rps14* — нетранслируемая копия гена в митохондриях. *б* — модель переноса: ранее в ядро переместился ген *sdhB*, он приобрел направляющую и интрон, в который позднее встроился ген *rps14*. Пре-мРНК генов подвергаются альтернативному сплайсингу, соответствующие белки импортируются в митохондрии

мым были решены проблемы регуляции и направленного импорта в митохондрии продукта экспрессии ставшего ядерным гена *rps14*.

У *Neurospora* и *Aspergillus* имеются как ядерный, так и митохондриальный гены *atp9*, каждый из них фукционирует в определенные периоды жизненного цикла [Bittner-Eddy et al., 1994]. Однако чаще всего происходит инактивация органельной копии с последующей ее потерей [Palmer et al., 2000].

При определении, какая из копий — ядерная или органельная — сохранится, а какая будет инактивирована, участвуют как селективные процессы, так и элемент случайности. Если мутация инактивирует раньше ядерный ген, тогда органельная копия остается единственно функционирующей, и ген, имеющий копии в обоих компартментах клетки, в реальности вновь становится органельным [Palmer et al., 2000]. Именно такая ситуация была отмечена при анализе ядерных и митохондриальных копий гена *cox2*.

Процесс переноса генов из органелл был подробно исследован у 25 родов семейства бобовых. Оказалось, что у некоторых родов этого семейства митохондриальная копия гена *cox2* была потеряна или не функционировала. У других родов сохранилась митохондриальная копия, но не экспрессировалась ядерная, а у третьих и та, и другая экспрессировались с различной интенсивностью. Возможно, изменение экспрессии ядерного и/или органельного генов происходит в рамках тканеспецифической регуляции. В разных случаях механизмы блокирования экспрессии генов *cox2* были различными: разрушающие ген делеции и инсерции, нарушение транскрипции или РНК-редактирования, вплоть до полной потери гена [Adams et al., 1999; Palmer et al., 2000].

Перенесенный в ядро ген *cox2* был активирован с помощью присоединения специфической предпоследовательности, предваряющей кодирующую белковую часть COX2. Было показано, что митохондриально-направляющая предпоследовательность белка COX2 необычно длинная (136 аминокислотных остатков) и состоит из трех функциональных зон. Первые 20 аминокислот составляют митохондриально-направленный полипептид, центральный участок (104-аминокислотный полипептид) непосредственно связан с импортом белка COX2 через мембрану митохондрий и, наконец, 12 аминокислот, имеющих изначально митохондриальное происхождение, необходимы для правильной укладки импортированного в митохондрии белка. По мере выполнения каждой из функций соответствующие аминокислотные блоки отщепляются: последний 12-членный участок удаляется из COX2 белка уже внутри митохондрий [Daley et al., 2002].

Регуляция экспрессии также может осуществляться как на трансляционном (оба транскрипта существуют, но лишь один дает начало функцио-

нальному белку), так и на посттрансляционном уровнях (targeting, модификации белков, сборка в активный комплекс) [Blanchard, Lynch, 2000], что позволяет обеспечивать тонкую настройку клетки на соответствующие внешние сигналы.

Происходит ли обратный перенос генов из ядра в органеллы?

Скорость фактического переноса ДНК в ядро, как показано для дрожжей, по крайней мере на несколько порядков выше, чем из ядра в митохондрии [Thorsness, Fox, 1990; Thorsness, Weber, 1996]. Причины этого следует искать в механизмах экспрессии и системах регуляции. Каждый митохондриальный ген, физически перенесенный в ядро, имеет шанс со временем стать функционирующим, тогда как вероятность обратного процесса чрезвычайно мала. Кроме того, регуляторные механизмы не в состоянии обеспечить регуляцию экспрессии генов, перенесенных в органеллы из ядра, в отличие от обратного переноса [Palmer et al., 2000].

Вместе с тем, как обсуждалось в главе 4, митохондрии высших растений аккумулируют значительное количество ядерной и пластидной ДНК; при этом шесть хлоропластных генов тРНК экспрессируются в митохондриях *Arabidopsis* [Palmer et al., 2000] и семь — в митохондриях риса [Miyata et al., 1998]. Ни об одном функционирующем ядерном гене в митохондриях растений пока не сообщалось.

Известен лишь один спорный случай обнаружения в митохондриальной ДНК кораллов ядерного гомолога гена репарации *mutS* [Pont-Kingdon et al., 1995; Pont-Kingdon et al., 1998]. Согласно выдвинутой гипотезе, данный ген был изначально локализован в митохондриях, затем биллионы лет тому перенесен в ядро, где в результате дупликаций образовалось семейство генов *msh,* и, наконец, один из генов этого семейства вновь интегрировался в митохондриальный геном у предков октокораллов [Culligan et al., 2000, цит. по Blanchard, Lynch, 2000].

Кроме экспрессируемых генов в ядре имеется большое количество "разнородной" (promiscuous) ДНК органельного происхождения [Pichersky et al., 1991; Ayliffe, Timmis, 1992; Brennicke et al., 1993, см. литературу к главе 4]. Значительное количество пластидных и ядерных ДНК выявлено и в митохондриях [Schuster, Brennicke, 1988]. Все эти факты позволяют предполагать, что процесс передачи ДНК между компартментами клетки происходит нередко, однако импортируемая ДНК не всегда интегрируется, только часть переданных последовательностей эволюционно закрепляется в новой локализации и нормально экспрессируется. Предполагается, что в опреде-

ленных случаях передача ДНК может происходить между всеми компартментами (см. рис.8.3), хотя ряд вариантов (обозначенных "?") пока не доказан [Herrmann, 1997].

Почему гены органелл переносятся в ядро?

Мы не можем в настоящее время дать убедительное объяснение тому, какие факторы определяют перемещение в ядро органельных генов, а также почему в разных таксонах эти перемещения осуществляются с совершенно различной скоростью. С пополнением банков секвенированных геномов ядра и органелл разных систематических групп и усовершенствованием методов манипулирования отдельными генами появится возможность более точной оценки масштабов этого феномена, определения способов адаптации органельных генов к регуляторным механизмам ядра, а также, возможно, удастся понять, что "выталкивает" эти гены из "насиженных мест" и заставляет искать "лучшей доли" в ядре. Одна из недавно предложенных гипотез о связи высокого содержания АТ-пар в органеллах и миграции генов в ядро [Howe et al., 2000] любопытна, но не представляется доказательной и универсальной для объяснения этой загадки природы.

Согласно другой гипотезе, первыми переместились в ядро гены, контролирующие регуляторные функции, и лишь после этого гены, кодирующие ферменты и структурные белки [Martin, Herrmann,1998]. Примером такого порядка транслокации являются σ-факторы для РНК-полимеразы пластид (см. главу 3) и сложные мультимерные белки хлоропластов. Так,γ-субъединица хлоропластной АТФазы (atpC) выполняет регуляторную роль в АТФазном комплексе. Четыре структурные субъединицы АТФазы — atpA, atpB, atpE и atpF у всех наземных растений кодируются пластидной ДНК (см. главу 2), в то время как пятая (регуляторная) atpC у всех исследованных растений кодируется ядерным геномом, т.е. является, очевидно, первым из генов данного комплекса, перенесенных в ядро [Herrmann, 1997]. Та же тенденция структурно-функциональной локализации выявляется у хлоропластной *Clp*-протеазы: каталитическая субъединица ClpP у всех изученных высших растений кодируется хпДНК, тогда как регуляторная ClpC является ядерно кодируемой [Martin et al., 1998]. Самый известный пример — пластидно кодируемая каталитическая большая субъединица РДФК — *rbcL* и ядерно кодируемая регуляторная малая субъединица — *rbcS*. Возможно, эти примеры отражают общую тенденцию постепенной концентрации в ядре функций регуляции всех клеточных геномов [Martin, Herrmann, 1998].

По мнению ряда исследователей, важным фактором миграции является то, что органельные гены подвергаются большему риску мутировать, чем

ядерные гены, из-за продуцирования мутагенных свободных радикалов кислорода [Allen, Raven, 1996] (подробнее об органельных мутациях см. главу 9).

Интересно, что искусственный перенос когда-то бывших хлоропластными ядерных генов в обратном направлении — в пластиды — может сопровождаться усилением экспрессии этих генов [Zhang et al., 2001].

Взаимодействие геномов ядра и органелл

Практически в каждой из предшествующих глав так или иначе речь шла о взаимодействии клеточных геномов. Совместное кодирование отдельных субъединиц белков либо отдельных белков сложных мультикомпонентных комплексов (рибосомы, мембраны тилакоидов пластид, мембраны митохондрий и др.), кодирование ядром ДНК- и РНК-полимеразных генов органелл, регуляция транскрипции и трансляции органельных генов с помощью специфических ядерно кодируемых факторов, процессинг, сплайсинг интронов органельных генов, РНК-редактирование и многие другие процессы осуществляются под двойным ядерно-органельным контролем.

В данном разделе мы рассмотрим ряд не обсуждавшихся в предшествующих главах моментов, демонстрирующих совместное участие генетических систем эукариотической клетки в ее жизнедеятельности.

Контроль ядра за делением и развитием хлоропластов

Обнаружение у *Arabidopsis* серии ядерных мутантов *arc* (***a**ccumulation **a**nd **r**eplication **c**of the **c**hloroplast* — накопление и репликация хлоропластов) продвинуло исследователей в понимании молекулярных основ ядерного контроля деления пластид [Pyke, Leech, 1992, 1994]. Из всех мутантов *arc* лишь у *arc6* нарушения деления наблюдаются уже на стадии пропластид, остальные мутанты вызывают редукцию числа хлоропластов на клетку в мезофилле. Ген, мутировавший в *arc6,* гомологичен гену белка FtsZ, участвующему в делении бактерий [Osteryoung, Vierling, 1995]. Белок FtsZ полимеризуется подобно цитоскелетным элементам эукариот и является, вероятно, предшественником тубулина [Erickson, 1995]. В этом случае возникает интригующее предположение, что механизм деления органелл принципиально не изменился от прокариот до растений [Leon et al., 1998].

Развитие хлоропластов из пропластид происходит под воздействием внешних сигналов, прежде всего света, и требует координированной экспрессии ядерных и пластидных генов. Зависимость экспрессии ядерных генов, кодирующих хлоропластные белки, от стадии развития пластид впервые была

показана еще в середине 80-х годов [Mayfield, Taylor, 1984]. Регуляция осуществляется посредством фоторецепторов: фитохромов, синих/УФ-А криптохромов и УФ-А и -В рецепторов [Leon et al., 1998]. Ряд продуктов ядерных генов являются частью системы передачи сигналов, они соединяют световое воздействие с развитием пластид и растений в целом [Chory, 1993; Duckett, Gray, 1995; Quail et al., 1995].

Выделены ядерные мутанты — *det-*, *fus-* и *cop*-классов, которые при прорастании в темноте морфологически сходны с выращенными на свету проростками и характеризуются измененной экспрессией нескольких ядерных и пластидных фотогенов [Quail et al., 1995]. Исследование этих мутантов позволило значительно глубже понять процессы ядерно-пластидного взаимодействия.

Пластиды мутантов *det1, cop1* и *cop9* в темноте развивают систему тилакоидов, хотя и не накапливают хлорофилла. Данные мутанты, а также ряд мутантов класса *fus* вызывают превращение амилопластов в хлоропласты, таким образом кардинально нарушая фотоморфогенный путь развития [Kwok et al., 1996]. Другие, например мутант *det2,* не влияют на программу развития хлоропластов [Chory et al., 1991].

Ряд генов, измененных в указанных мутантах, были клонированы; предполагается, что продукты этих генов служат ядерными регуляторами при реализации онтогенетической программы развития растений [Chamovitz et al., 1996]. Наиболее подробно изучен белок — продукт гена *cop1* — он служит негативным регулятором транскрипции, непосредственно взаимодействуя с предшествующими ДНК-последовательностями генов, которые им регулируются. Другие гены, такие, как *cop8, cop9, cop11*, действуют, вероятно, аналогичным образом [Wei, Deng, 1996].

Как показано, при отсутствии света ядерные "фотогены", контролирующие преимущественно компоненты фотосинтетическиго аппарата, полностью блокированы или экспрессируются на крайне низком уровне [Gilmartin et al., 1990]. Переход к нормальному освещению приводит к 100-кратному увеличению экспрессии ядерных и хлоропластных "фотогенов" проростков [Thompson, White, 1991]. Мутанты *gun1* (**g**enome **un**coupled) с нарушенной ядерно-пластидной координацией экспрессируют ряд ядерных фотогенов в условиях, когда развитие пластид подавлено. Несмотря на это, при переносе на свет они вначале резко отстают по накоплению хлорофилла и превращению этиопластов в хлоропласты. Лишь через 72 часа после начала освещения эти показатели достигают контрольных уровней [Mochizuki et al., 1996].

У *Arabidopsis* были выделены мутанты *cue,* позволившие идентифицировать позитивные регуляторы при развитии хлоропластов из этиопластов

под действием света [Li et al., 1995]. Большинство продуктов генов *cue* модулируют уровень экспрессии определенных ядерных фотогенов. *CUE1* кодирует белок PPT — фосфат/фосфоенолпируват транслокатор внутренней мембраны хлоропластов, необходимый на ранних стадиях развития хлоропластов; нарушение его синтеза непосредственно отражается на сигналах, которые поступают из пластид и изменяют экспрессию ядерных фотогенов [Fisher et al., 1997; Leon et al., 1998] (см. раздел "Пластиды и регуляция экспрессии ядерных генов"; о пластидных мутациях читай также в главе 9).

Ядерные гены, необходимые для синтеза специфических белков пластид

Совместное кодирование двумя генетическими системами ряда белковых молекул невозможно без координированной экспрессии соответствующих генов. Показано, например, что у *Chlamydomonas* нарушение синтеза малой субъединицы РДФК *(Rubisco)* приводит к подавлению трансляции кодируемой хлоропластной ДНК большой субъединицы [Khrebtunkova, Spreitzer, 1996; Rodermel et al., 1996]; скорость трансляции *petA* мРНК уменьшается при повреждении гена *petD* [Choquet et al., 1998]. Подавление трансляции в хлоропластах *Chlamydomonas* приводит к тому, что преимущественно транслируются мРНК, кодирующие рибосомальные белки [Liu et al., 1989], аналогичная картина зафиксирована для нефотосинтезирующих пластид корней шпината [Deng, Gruissem, 1988].

Интересно, что у кукурузы нарушение трансляции atpB в пластидах не отражается на уровне другой субъединицы — atpA [McCormac, Barkan, 1999]. У низшего же растения *Chlamydomonas* ген *thm24,* нарушающий синтез atpB, приводит также к подавлению трансляции atpA, хотя мРНК последнего накапливается нормально, т.е. наблюдается репрессия какого-то из посттранскрипционных этапов [Drapier et al., 1992]. Данные, полученные на *Chlamydomonas,* были использованы для формулирования модели "контроль постоянством синтеза" ("control by epistasy of synthesis"), согласно которой наличие одной субъединицы каждого фотосинтетического ферментного комплекса контролирует синтез остальных субъединиц [Choquet et al., 1998]. Пока не совсем ясно, справедлив ли хотя бы частично этот принцип для высших растений.

Недавно удалось определить, что экспрессию хлоропластного гена *atpB* кукурузы контролирует ядерный ген *atp1.* Мутация в гене *atp1* резко подавляет трансляцию *atpB,* причем скорость транскрипции и уровень мРНК *atpB* сохраняются неизменными [McCormac, Barkan, 1999]. Еще один ядерный ген высших растений — *crp1,* участвующий в регуляции трансляции конкретных пластидных генов, был рассмотрен в главе 3.

Уникальность гена *atp1* среди изученных генов высших растений в том, что он необходим для регуляции синтеза одного белка, AtpB. Мутации других известных ядерных генов наземных растений нарушают синтез нескольких (иногда многих) пластидных генов. У водоросли *Chlamydomonas,* напротив, было найдено множество ядерных мутаций, изменяющих экспрессию отдельных пластидных генов [Leon et al., 1998; Goldschmidt-Clermont, 1998]. В главе 3 уже упоминались специфические гены ядра, которые необходимы для трансляции пластидных генов фотосистем I и II: *psbA, psbC, psaB, atpA.* Эти отличия в регуляции могут отражать фундаментальные различия в организации пластидных генов, выработавшиеся в процессе эволюции низших и высших растений. Так, например, гены АТФ-синтазы у высших растений собраны в две полицистронные транскрипционные единицы (см. главу 2), в то время как у *Chlamydomonas* эти гены разбросаны по всей пластидной ДНК [Woessner et al., 1987]. Необходимы дальнейшие исследования организации и регуляции экспрессии геномов высших и низших растений для проверки этого предположения.

Прогресс в данной области знаний, вероятно, приведет к обнаружению множества других генов ядра, регулирующих трансляцию пластидных генов. В основном регуляция экспрессии пластидного генома осуществляется с помощью позитивно действующих регуляторных белков ядра [Goldschmidt-Clermont, 1998; Barkan, Goldschmidt-Clermont, 2000].

Пластиды и регуляция экспрессии ядерных генов

Регулирующая роль ядерных генов в функционировании пластид представляется бесспорной и многократно подчеркивалась в данной книге. Насколько верно обратное — зависит ли экспрессия ядерных генов от процессов, происходящих в пластидах?

В главе 3, в разделе "Свет активирует трансляцию...", мы затронули вопрос о регуляции светом трансляции пластидных генов. Как известно, на раннем этапе онтогенеза развитие высших растений определяется светом: в темноте образуются этиолированные растения с длинными гипокотилями, малыми нераскрытыми семядолями и другими морфологическими особенностями. Такие растения содержат этиопласты и характеризуются крайне низким уровнем экспрессии ядерных фотосинтетических генов. При выращивании на свету у проростков наблюдаются короткие гипокотили, раскрытые разросшиеся семядоли с фотосинтетически компетентными хлоропластами и высоким уровнем экспрессии ядерных генов [Sullivan, Gray, 1999].

Была высказана гипотеза, что пластиды индуцируют какой-то сигнал, необходимый для экспрессии фотосинтетических генов ядра [Oelmüller, 1989; Susek, Chory, 1992; Surpin, Chory, 1997]. Действительно, обработка нор-

флуразоном (вызывающим фотодеструкцию хлоропластов) проростков горчицы приводила к снижению уровня транскриптов ряда ядерных генов — белка светособирающего комплекса *Lhcb* и малой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы *RbcS*. Сходные эффекты наблюдались при обработке проростков горчицы на ранних стадиях развития хлорамфениколом — ингибитором пластидной трансляции [Oelmüller et al., 1986b]. Воздействие на проростки ячменя тагетитоксином — ингибитором пластидной транскрипции — также снижало уровень ядерных транскриптов *Lhcb* и *RbcS* [Rapp, Mullet, 1991].

Однако, если хлорамфеникол или другие ингибиторы пластидной трансляции (линкомицин или эритромицин) применяли спустя более чем 48—72 часа от начала прорастания, эффекта на экспрессию ядерных генов не было. Вероятно, пластидный сигнал формируется с участием какого-то продукта ранней экспрессии пластидного генома (до 48—72 часов от начала прорастания) [Sullivan, Gray, 1999]. Точная природа этого сигнала и механизм активации ядерных фотосинтетических генов пока неясны. Было высказано предположение, что свет и пластидный сигнал каким-то образом взаимодействуют, продуктом этого взаимодействия служит пока неизвестный трансдействующий на промоторы ядерных фотогенов фактор [Kusnetsov et al., 1996; Puente et al., 1996].

Более детальное исследование взаимодействия пластид и света при регуляции экспрессии фотогенов стало возможным при использовании мутантов гороха *lip1,* у которых нарушен фотоморфогенез. При выращивании в темноте такие мутанты имеют невытянутый короткий стебель, развитые листья с частично сформированными пластидами и характеризуются активно транскрибируемыми фотосинтетическими генами [Frances et al.,1992]. Обработка мутантных растений линкомицином или эритромицином приводила к подавлению транскрипции ядерных фотогенов в побегах, выращенных не только на свету, но и в темноте. Аналогичный результат получен при использовании фотоморфогенных мутантов *cop1-4 Arabidopsis* [Deng et al.,1991; Sullivan, Gray, 1999]. Изменяли экспрессию ядерных генов и пластиды некоторых бесхлорофильных мутантов [Palomares et al., 1993], а также этиолированные и FR- (far red) выращенные проростки [Oelmüller et al., 1986a; Oelmüller et al., 1986b]. Таким образом, пластидный сигнал может регулировать, по крайней мере в некоторых случаях, экспрессию ядерных генов и в отсутствие света [Sullivan, Gray, 1999]. Подтверждение этого было получено при изучении этиолированных проростков риса: обработка растущих в темноте проростков ингибирующим пластидную трансляцию стрептомицином препятствует экспрессии генов *RbcS* и *POR* (протохлорофиллидредуктаза) [Yoshida et al., 1998].

Показано, что экспрессия одних генов (*CAB* и хлорофилл-связывающего белка — CP24-апопротеина) в большей степени изменяется при повреждении пластид по сравнению с другими генами, которые не кодируют хлорофилл-связывающих белков (*RBCS, PC, FNR, PSAF, ATPC;* гены 33 и 23 кД тилакоидных белков) [Batschauer et al., 1986; Bolle et al., 1994].

Пластидный сигнал требуется ядерному геному постоянно; он исчезает быстро после повреждения пластид [Oelmüller et al., 1986b] и действует, вероятно, лишь в пределах данной ткани или даже клетки, чьи органеллы его продуцируют [Bolle et al., 1994]. Согласно последним данным, существуют множественные сигнальные пути от хлоропластов к ядру, включающие биосинтетические предшественники хлорофилла, фотосинтетический транспорт электронов и транспорт сахаров [Brown et al., 2001].

Недавно были идентифицированы два белка биосинтеза и трансмембранного транспорта хлорофилла (H-субъединица Mg-хелатазы и ABC-белок), которые также регулируют экспрессию четырех фотосинтетических генов ядра, участвуя таким образом в передаче сигнала из пластид в ядро [Mochizuki et al., 2001; Müller et al., 2001]. При анализе результатов, полученных на фотоморфогенных мутантах, чрезвычайно интересен вопрос о механизме регуляции органоспецифической экспрессии ядерных генов фотосинтеза. К сожалению, объем книги не позволяет нам детально останавливаться на этой проблеме, мы отсылаем интересующегося читателя к работам, посвященным данному вопросу [Li et al., 1993; Sullivan, Gray, 1999].

* * *

Итак, рассмотренные примеры демонстрируют направленное воздействие пластид на экспрессию ядерных генов, связанных с фотосинтезом, с помощью еще не известного сигнала(ов). Очевидно, что сигнал(ы) воспринимается геноспецифичными, весьма дивергентными цис-регуляторными элементами промоторов ядерных фотогенов. Высококонсервативные области были выявлены в промоторах генного семейства *CAB* даже у растений разных видов [Bolle et al., 1994]. При анализе многих промоторов идентифицировано несколько цис-действующих светозависимых элементов, при этом не удалось обнаружить у них какой-либо универсальной последовательности [Argüello-Astorga, Herrera-Estrella, 1998]. Вероятно, как свет, так и пластидные сигналы действуют на одни и те же цис-элементы промоторов ядерных генов, кодирующих белки хлоропластов [Kusnetsov et al., 1996].

Интересно, что в тканях с поврежденными пластидами отмечено также нарушение экспрессии ядерных генов *NIA*, кодирующих цитоплазматический фермент нитратредуктазу и не относящихся к фотогенам [Börner et

al.,1986]. Хотя функционально фермент связан с пластидами, регуляция в данном случае осуществляется, очевидно, непосредственным воздействием азотными метаболитами на гены *NIA,* т.е. с помощью совершенно другого механизма [Vincentz et al., 1993; Bolle et al., 1994].

Взаимодействие геномов ядра и митохондрий у дрожжей

Взаимодействие геномов ядра и митохондрий охватывает большое количество ядерных генов, продукция которых необходима для сборки и функционирования митохондрий, и сравнительно небольшое число генов самих органелл [Mueller, Getz, 1986; Costanzo, Fox, 1990, см. литературу к главе 5].

Координация экспрессии геномов ядра и митохондрий изучается у всех групп организмов, однако наиболее детально механизм взаимодействия описан для дрожжей [Grivell, 1989; Parikh et al., 1987; Liao, Butow, 1993].

Как уже обсуждалось в главе 5, пока не удалось обнаружить ядерных генов, контролирующих транскрипцию специфических митохондриальных генов дрожжей. Решающую роль в регуляции экспрессии генов митохондрий играют специфические белки — активаторы трансляции — они взаимодействуют с 5′UTR-областями митохондриальных транскриптов. Такие активаторы кодируются ядром и обнаружены почти для всех митохондриальных генов. В свою очередь активаторы трансляции регулируются экзогенными факторами, что позволяет адаптировать трансляцию белков митохондрий к изменяющимся условиям (см. главу 5).

В отличие от митохондриальных для ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, были обнаружены и активаторы транскрипции; подобно активаторам трансляции, они регулируются экзогенными факторами.

У нефотосинтезирующих эукариот критическим регулятором клеточных процессов ассимиляции энергии является цитохром *c* оксидаза (цитохром *c* редуктаза), а глюкоза и кислород — основными средовыми факторами, определяющими уровень этого фермента [Zitomer, Lowry, 1992].

Фермент цитохром *c* редуктаза состоит из девяти субъединиц, лишь одна из которых кодируется митохондриальной ДНК. Остальные, как, например, цитохром *c* — акцептор электронов комплекса, кодируются ядерным геномом и импортируются из цитоплазмы. Организация начального участка гена *CYC1,* кодирующего цитохром *c*, подробно рассмотрена в ряде работ; показано, что данный ген имеет две контрольные области, которые активируют транскрипцию, — UAS1 и UAS2. К первой присоединяется белок — активатор транскрипции HAP1, он регулирует транскрипцию гена *CYC1* в аэробных условиях. Имеется ряд доказательств, что белок HAP1 контролирует экспрессию и других ядерных генов митохондриальных белков и участвует в координированном переключении клеточного метаболизма при переходе дрожжей от анаэробных условий к аэробным и обратно [Grivell, 1989].

Удивительным является то обстоятельство, что белок HAP1 способен к высокоспецифичному связыванию с регуляторными последовательностями различных генов, обладая при этом различной эффективностью. Так, присоединение к UAS1 гена *CYC1* приводит к 300-кратному повышению скорости транскрипции, к тому же эффект зависит в сильной степени от присутствия гема, тогда как в случае присоединения HAP1 к UAS гена *CYC7* эффект как минимум в 10 раз ниже, причем зависимость от гема минимальна. Механизм этой специфичности неясен [Grivell, 1989].

Вторая контрольная область ключевого гена *CYC1* — UAS2, активируемая при переходе культуры дрожжей к неферментируемому источнику углерода, также регулируется белками — активаторами транскрипции HAP2 и HAP3. Как и в случае HAP1, данные белки активируют транскрипцию не только гена *CYC1,* но и других ядерных генов (*HEM1, COX4*), входящих в цитохром *c* редуктазный митохондриальный комплекс [Grivell, 1989]. Сложная организация UAS-областей ядерных генов дрожжей напоминает во многом энхансеры высших эукариот [Parikh et al., 1987].

Дерепрессия геномов дрожжей при переводе клеток на среду без глюкозы приводит к увеличению общего количества митохондриальных РНК всех типов: мРНК, тРНК, рРНК, хотя динамика этого процесса несколько замедлена по сравнению с реакцией ядерных транскриптов. При этом количество митохондриальных геномов на клетку у одних штаммов увеличивается в 4—5 раз, тогда как у других остается прежним. Данные различия несомненно находятся под контролем ядерного генома. Так, мутация гена *SNF1,* кодирующего протеин-киназу, приводит к нарушению митохондриальной транскрипции при дерепрессии и блокирует увеличение числа копий митохондриальной ДНК по сравнению с изогенной линией дикого типа [Ulery et al., 1994]. Мутация ядерного гена *reg1* разобщает процесс активации транскрипции и увеличения числа генных копий мтДНК при дерепрессии; к конституционной дерепрессии митохондриальных транскриптов приводит мутация в ядерном гене *URR1.* Возможно, все эти три гена — *SNF1, REG1* и *URR1* действуют опосредованно через продукт ядерного гена *ABF2* — белок, связывающийся с митохондриальной ДНК [Jaehning, 1993; Ulery et al., 1994].

Митохондрии регулируют экспрессию ядерных генов

Функциональное состояние митохондрий способно влиять на экспрессию ядерного генома. Этот феномен впервые был показан в работе на изогенных линиях дрожжей, различающихся структурой митохондриального генома, и назван "ретроградной регуляцией" [Parikh et al., 1987].

Были исследованы четыре изогенные линии дрожжей, одна из которых

имела полноценный митохондриальный геном, у другой имелась делеция в гене *oxi2,* третья сохранила лишь 700 п.н. от всего митохондриального генома, наконец, у четвертой митохондриальная ДНК полностью отсутствовала. Выращивание на раффинозе позволяло всем линиям сохранять жизнеспособность, при этом не происходило репрессии генома, как в случае выращивания на глюкозе. Было показано, что экспрессия некоторых ядерных генов различалась не только между нормальными и мутантными штаммами, но и у мутантных штаммов между собой, тогда как другие гены не зависели от изменений в мтДНК [Parikh et al., 1987].

Каков может быть механизм такой обратной регуляции? Возможно, продукт митохондриального гена экспортируется и функционирует вне органеллы, являясь, например, негативным регулятором одного или нескольких генов. Однако, пока прямого экспорта ни белков, ни РНК из митохондрий показано не было [Parikh et al., 1987], природа передаваемого фактора, так же как и в случае пластидного сигнала, остается неясной.

Наиболее изученным примером ретроградной регуляции является изменение экспрессии гена *CIT2*, который кодирует пероксисомную изоформу цитрат-синтазы (CS2). Важно отметить, что данная изоформа имеет 75%-ное сходство с митохондриальной цитрат-синтазой (CS1), кодируемой другим ядерным геном *CIT1*. Очевидно, оба эти гена — результат дупликации общего предка — гена *CIT* [Liu, Butow, 1999], бывшего у каких-то древних эукариот митохондриальным.

Оказалось, что при митохондриальных дисфункциях, например в клетках c^0 petites, не имеющих мтДНК или несущих мутацию в каком-то из генов, контролирующих ферменты цикла Кребса, экспрессия гена *CIT1* не меняется, тогда как гена *CIT2* — увеличивается в 30—40 раз. Данная ретроградная регуляция осуществляется с помощью специальных генов группы *RTG* (**retrograde**) — *RTG1, RTG2* и *RTG3* [Liu, Butow, 1999].

Для понимания функциональной связи между нарушением функции митохондрий и активацией гена *CIT2* отметим, что пероксисомная изоформа цитрат-синтазы (CS2) катализирует первую реакцию глиоксилатного цикла. Данный цикл предназначен для превращения углеродных компонентов, образующихся, например, при окислении жирных кислот с длинными углеводородными цепями, в такие промежуточные продукты метаболизма, как сукцинат, которые используются далее в цикле Кребса. Очевидно, что при дисфункции митохондрий активация глиоксилатного цикла в результате активирования гена *CIT2* дает компенсаторный эффект, что позволяет более эффективно использовать соединения углерода для биосинтетических процессов [Sekito et al., 2000].

Гены *RTG1* и *RTG3* кодируют специфические факторы активации транс-

крипции гена *CIT2,* продукт гена *RTG2* — белок неизвестной функции. Если митохондрии функционируют нормально, экспрессия гена *CIT2* низкая, а продукты генов — факторы Rtg1p и Rtg3p — локализуются в цитоплазме. Однако при нарушении функции митохондрий Rtg1p и Rtg3p в виде комплекса обнаруживаются в ядре, где активируют транскрипцию гена *CIT2* (рис. 8.6). Основную роль при этом играет Rtg3p; Rtg1p либо переносится через поры ядерной мембраны пассивно, либо в комплексе с Rtg3p. Rtg2p всегда остается в цитоплазме, он воспринимает митохондриальный сигнал и контролирует дефосфорилирование и перемещение в ядро Rtg3 [Sekito et al., 2000].

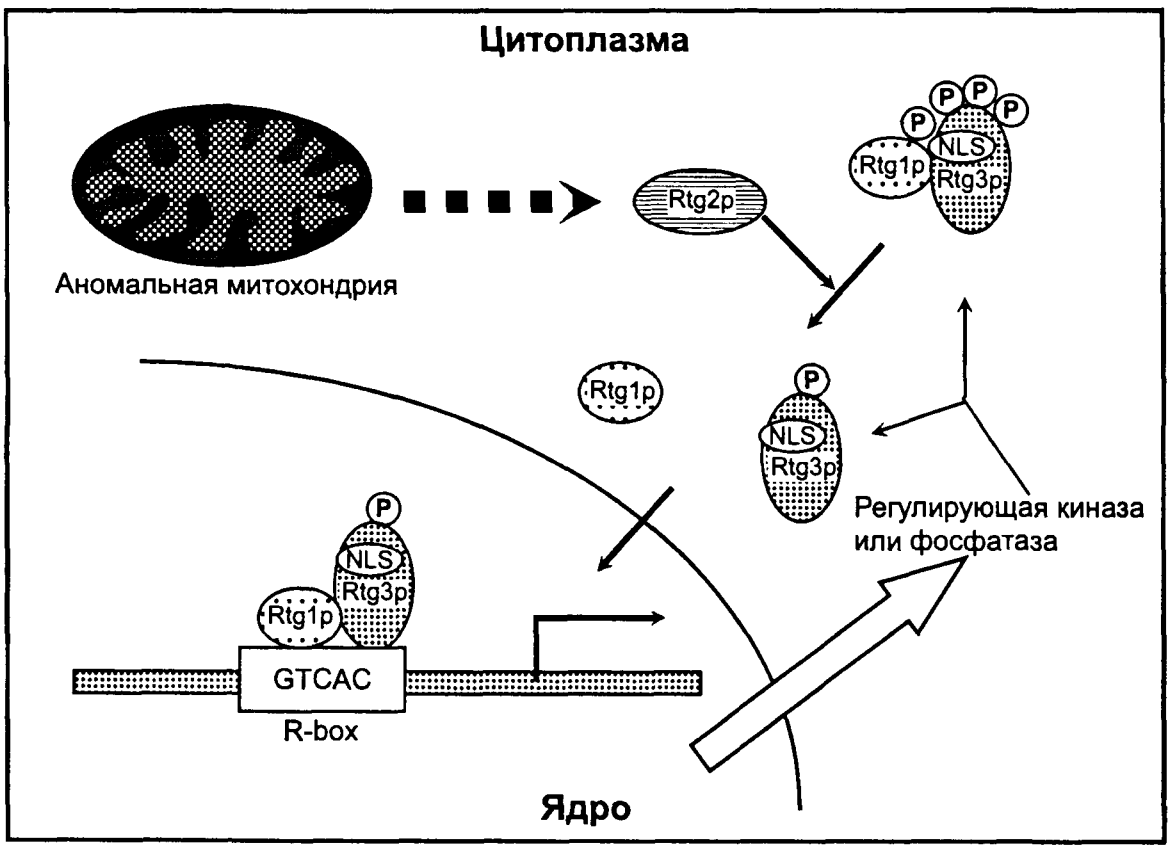


Рис. 8.6. Модель контроля передачи сигнала от митохондрии к ядру. В клетках с аномальными митохондриями пунктирная стрелка — сигнал (например, уровень глутамата, синтезируемого в цикле трикарбоновых кислот), который посредством Rtg2p передается от митохондрии к цитоплазматическому комплексу Rtg1p — Rtg3p (фосфорилированному). Комплекс в результате диссоциирует, при этом Rtg3p дефосфорилируется. Rtg1p и Rtg3p затем транслоцируются в ядро и собираются для активации транскрипции на R-box-сайте гена-мишени. Уровень фосфорилирования цитоплазматического Rtg3p чувствителен к ответной реакции (большая светлая стрелка), так что отсутствие Rtg1p — Rtg3p-зависимой транскрипции в ядре активирует дальнейшее дефосфорилирование цитоплазматического Rtg3p и перемещение его в ядро. Неясно, происходит ли дефосфорилирование Rtg3p в результате инактивации киназы или активации фосфатазы [по Sekito et al., 2000]

RTG гены вовлечены также в ретроградный контроль экспрессии цитоплазматической лактатдегидрогеназы, кодируемой геном *DLD3* [Chelstowska et al., 1999], и в контроль экспрессии четырех генов цикла Кребса: *CIT1, ACO1, IDH1, IDH2* [Liu, Butow, 1999].

Ретроградный контроль существует не только у дрожжей. Данный феномен обнаружен также у *Neurospora*, у животных и в культуре клеток человека. Очевидно, что "ретроградная регуляция" является типичным механизмом клеточной реакции на изменение митохондриальной функции [Liao, Butow, 1993]. Ретроградную регуляцию иногда рассматривают как реакцию на стресс, цель которой — приспособить клетку к изменению состояния митохондрий [Liu, Butow, 1999].

На клетках животных было показано, что изменение экспрессии ряда митохондриальных генов или уменьшение содержания мтДНК приводит к изменению спектра ядерных мРНК [Poyton, McEwen, 1996]. В культуре клеток мышей снижение количества мтДНК или добавление митохондриальных ядов вызывало повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, что сопровождалось активацией одних и подавлением других генов [Biswas et al., 1999]. Мутантные мыши, не содержащие сердечно-мышечной изоформы переносчика адениновых нуклеотидов (такие животные используются как модель для изучения митохондриальных болезней, см. главу 14), характеризуются значительными нарушениями экспрессии ряда генов как ядра, так и митохондрий [Graham et al., 1997; Murdock et al., 1999].

У млекопитающих идентифицированы ядерные дыхательные факторы (NRF), которые связаны с многочисленными генами, регулирующими митохондриальные функции [Scarpulla, 1997; Au, Scheffler, 1998].

Взаимодействие геномов ядра и митохондрий у растений

Растения, пожалуй, обладают наиболее сложной системой кооперации субклеточных геномов, поскольку содержат пластиды, способные продуцировать как кислород, так и углеводы — субстрат для дыхания. Вследствие этого митохондрии растительных клеток выполняют более разнообразные функции, чем митохондрии грибов или животных [Mackenzie, McIntosh, 1999]. Количество белков, импортируемых в митохондрии из цитозоля для нормального функционирования клеток, оценивается в 4000 [Emanuelson et al., 2000].

Как и у других эукариот, регуляция числа копий митохондриальной ДНК в клетке, а также трансмиссия митохондрий находятся под ядерным контролем. Гены, которые контролируют данные процессы, идентифицированы

у растений двух видов: это ген *CHM* у *Arabidopsis* и ген *Fr* — у бобов [Mackenzie, McIntosh, 1999].

Результаты исследования эффекта дозы ядерных генов на экспрессию митохондриальных генов кукурузы показали, что на этот процесс влияют многие участки ядерного генома. Была использована изящная модель: серия транслокационных линий, создающая дозовый эффект по каждому из 14 хромосомных плеч [Auger et al., 2001]. Обнаружена как положительная, так и отрицательная зависимость: увеличение дозы ядерных генов снижает экспрессию одних и повышает ее у других митохондриальных генов. Показана также тканеспецифичность этих эффектов: при анализе эмбриональных тканей дозовые эффекты были положительны лишь в пяти случаях и отрицательны в 33, тогда как в эндосперме в 32 случаях увеличение дозы ядерных генов оказывало положительный эффект на конкретные гены митохондрий и в 20 случаях — отрицательный. Те гены, которые положительно реагировали на дозовый эффект хромосом в эндосперме, как правило, давали отрицательную реакцию в эмбриональной ткани и наоборот. Влияние очень большого количества ядерных факторов на одни и те же митохондриальные гены говорит, несомненно, о множественных механизмах ядерно-митохондриального взаимодействия [Auger et al., 2001].

Ретроградная регуляция обнаружена для митохондриально-ядерных взаимоотношений у растений — был охарактеризован фермент, ядерно кодируемая альтернативная оксидаза (*AOX*), которая окисляет субстрат без синтеза АТФ. Показано накопление транскриптов *AOX* при холодовом или кислородном стрессах [Vanlerberghe, McIntosh, 1997]. Ингибирование цитохромной цепи митохондрий антимицином А специфически индуцировало экспрессию одного (*AOX1*) из трех генов семейства *AOX* у сои [Finnegan et al., 1997]. Чрезвычайно интересен факт, что обработка митохондриальными ядами — цианидами или антимицином А чувствительных к вирусам растений табака может вызывать у них устойчивость, которая снимается ингибитором *AOX* [Chivasa, Carr, 1998].

Возможно, что ядерный ген *Rf2*, кодирующий альдегид-дегидрогеназу у кукурузы, способен изменять митохондриальную функцию в онтогенезе пыльников при ЦМС [Mackenzie, McIntosh, 1999]. Более подробно ЦМС у растений обсуждается в главе 11.

Несмотря на ряд установленных фактов, мы пока находимся на зачаточном уровне понимания процессов регуляции взаимодействия геномов ядра и митохондрий у растений по сравнению с таковой у дрожжей и млекопитающих, у которых факторы, регулирующие экспрессию ядерных генов митохондрий, были выделены, клонированы и изучены [Mackenzie, McIntosh, 1999].

Импорт белков в митохондрии

Количество ядерно кодируемых белков, необходимых для деления и роста митохондрий и реализации всех метаболических процессов, исчисляется сотнями, а по некоторым данным, несколькими тысячами [Emanuelsson et al., 2000]. Все эти белки должны попасть в органеллы, преодолев при этом одну или обе митохондриальные мембраны. В процессе эволюции эукариотической клетки сформировалась сложная система трансмембранного транспорта в органеллы. К середине 90-х годов уже было обнаружено 18 белков, непосредственно участвующих в передаче белков-предшественников в митохондрии [Ryan, Jensen, 1995].

Один из этих белков — Hsp70s — относится к группе белков теплового шока. Предполагается, что его функция — препятствовать преждевременному или неправильному сворачиванию вновь синтезируемых белков, которые должны транспортироваться в митохондрии. Многие митохондриальные белки нуждаются в присутствии других цитозольных факторов, так называемых "import chaperones" [Ryan, Jensen, 1995]. Так, в цитоплазме был обнаружен MSF — митохондриальный стимулирующий фактор, имеющий три основных отличия от других хаперонов: 1) специфически распознает митохондриальные сигналы импорта, 2) непосредственно направляет белки-предшественники к рецепторам на митохондриальной поверхности и 3) активно диссоциирует белковые агрегаты [Hachiya et al., 1995].

MSF может также определить выбор митохондриального рецептора (рис. 8.7). У дрожжей на наружной митохондриальной мембране (OM) обнаружено четыре белка, функционирующие как рецепторы: Mas20p, Mas22p, Mas37p и Mas70p. Mas20p и Mas22p тесно связаны между собой и с комплексом белков, называемым GIP и участвующим в более поздних этапах импорта. Mas37p и Mas70p образуют гетеродимер, нежестко связанный с комплексом GIP [Ryan, Jensen, 1995]. Эксперименты *in vitro* выявили специфичность рецепторов: одни предшественники использовали Mas20p и Mas22p, другие — Mas37p и Mas70p. Оказалось также, что MSF направляет предшественников к Mas37p — Mas70p-димеру, при этом регулирующую роль играет АТФ. В отсутствие АТФ комплекс-предшественник MSF связан с митохондриальной поверхностью через Mas37p — Mas70p (рис.8.7). Добавление АТФ высвобождает MSF, а транспортируемая молекула переносится на следующую ступень [Hachiya et al., 1995]. Фактор, аналогичный MSF, используется для транспорта белков в эндоплазматический ретикулум (signal recognition particle). Оба этих фактора фактически являются адапторами между синтезом белков и их последующей транслокацией через мембраны [Ryan, Jensen, 1995].

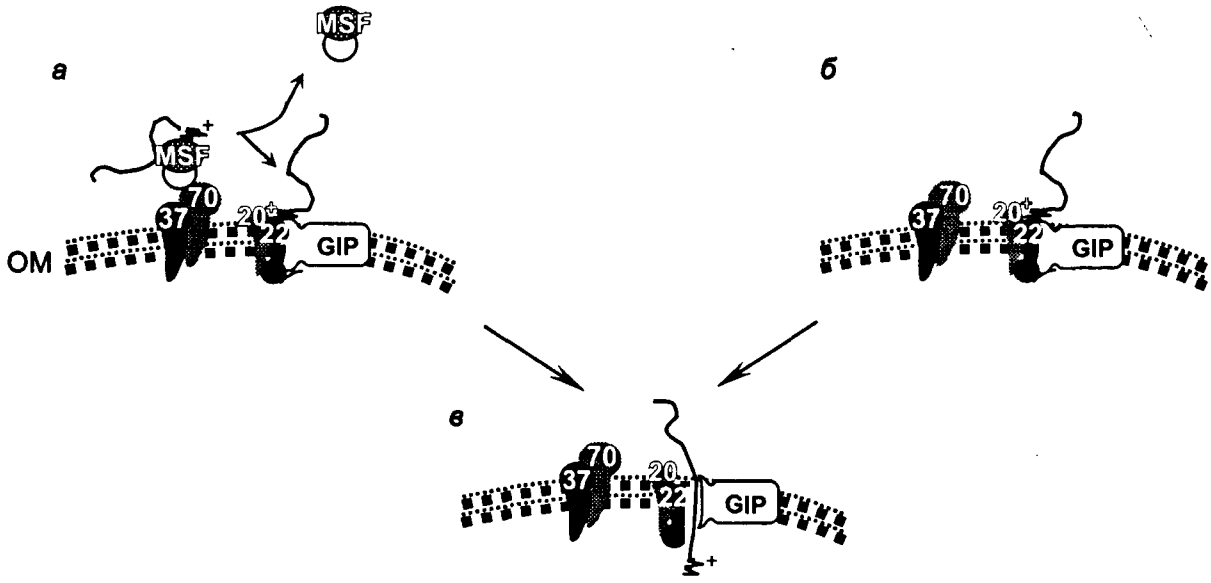


Рис. 8.7. Митохондриальный стимулирующий фактор (MSF) определяет, какой из рецепторов наружной мембраны будет использоваться переносимым через мембрану предшественником [Ryan, Jensen, 1995]. *а* — связывающийся с MSF предшественник взаимодействует с рецепторами Mas37p и Mas70p. После АТФ-гидролиза MSF диссоциирует, и предшественник переносится на Mas20p и Mas22p; *б* — не взаимодействующий с MSF предшественник связывается, минуя Mas37p и Mas70p, непосредственно с Mas20p и Mas22p. Направляющий митохондриальный сигнал, который содержит несколько основных аминокислот (знак+), изображен зигзагом; *в* — после связывания с рецепторами предшественник переносится через наружную мембрану при участии Mas22p и GIP. GIP представляет собой комплекс по крайней мере из пяти белков

В экспериментах с предшественником адрендоксина (pAd) было показано, что, связываясь с MSF, белок использует и Mas37p — Mas70p-, и Mas20p—Mas22p-рецепторы (рис. 8.7, *а*). Однако, если pAd искусственно расплести (unfold) мочевиной и добавить к реакционной смеси, он связывается сразу с Mas20p—Mas22p-рецепторами (рис.8.7,*б*). Использование схемы *а* характерно для транспорта предшественников нескольких мембранных белков, содержащих множественные трансмембранные "сшивки". Эти гидрофобные белки имеют склонность к агрегации, и MSF, вероятно, обеспечивает им "импорт-компетентную" конформацию [Ryan, Jensen, 1995].

После связывания с рецепторами белки-предшественники транспортируются в межмембранное пространство. Mas22p в отличие от остальных рецепторных белков имеет два гидрофильных домена, один из которых ориентирован на цитозоль, второй — на трансмембранное пространство. Очевидно, именно Mas22p инициирует перемещение белков через наружную мембрану, направляя предшественника от наружного домена к внутреннему (рис.8.7, *в*).

Перенос через наружную мембрану, как было показано, обратим: оче-

видно, белки проходят пассивно через мембранную пору или канал. И только активная система транспорта через внутреннюю мембрану обеспечивает окончательную доставку белков-предшественников [Mayer et al., 1995]. Так же как и в переносе через наружную мембрану, здесь задействован ряд белков: Mim17p, Mim23p и Mim44p. Четвертым является митохондриальный компонент семейства белков теплового шока — mHsp70p (рис. 8.8). После попадания предшественника в транслокационный канал он связывается с mHsp70p, что делает транспортировку необратимой [Ungerman,1994]. Процесс требует затрат энергии (АТФ-гидролиз) — связанные между собой mHsp70p и Mim44p фактически выполняют роль "транслокационного мотора", перекачивающего молекулы-предшественники во внутреннее пространство митохондрий [Glick, 1995].

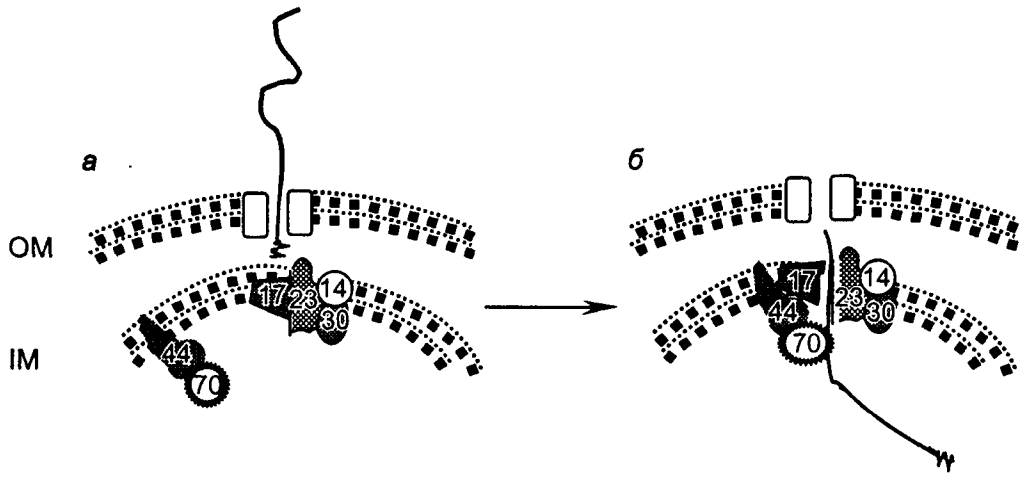


Рис. 8.8. Белки Mim и mHsp70p кооперируются в процессе транслокации белков через внутреннюю мембрану IM [по Ryan, Jensen, 1995]. *а* — Mim20p, Mim17p, Mim14p и Mim30p образуют комплекс. Mim44p и mHsp70p могут быть нежестко или непостоянно связаны с комплексом. *б* — в момент, когда белок-предшественник пересекает наружную мембрану ОМ, предшествующая последовательность узнается комплексом и образуется или открывается пассивный канал. Белок-предшественник втягивается в матрикс комбинированным действием Mim44p и mHsp70p

Несмотря на то что существует определенная автономность в системах транспорта через наружную и внутреннюю мембраны митохондрий, *in vivo* данные системы, несомненно, взаимодействуют [Ryan, Jensen, 1995]. Кроме того, процесс импорта белков митохондриями не является конститутивным. Так, на трансгенных растениях табака было показано, что импорт белков в митохондрии может значительно усиливаться и приводить к аккумуляции большой биомассы растениями при искусственной гиперэкспрессии гена mtHsp70 [Wood et al., 1998]. Уменьшение митохондриального импорта белков наблюдалось при старении растений сои, при этом регуляция

происходила не с помощью mtHSP70, а по какому-то иному механизму [Murcha et al., 1999].

После перенесения импортируемых белков через митохондриальные мембраны специальные пептидазы освобождают их от сигнальных пептидов [Braun, Schmitz, 1999].

Активно исследуются системы трансмембранного митохондриального транспорта (TOM и TIM) и встраивания белков в мембраны у животных [Mihara, 2000; Kanaji et al., 2000].

Внутриклеточное распределение ферментов — механизмы регуляции

Информация о структуре более 90% митохондриальных белков кодируется ядром и транслируется на цитоплазматических рибосомах [Grivell, 1989]. При этом ряд митохондриальных белков не имеет в ядре собственных генов, а транслируется с тех же матриц, что и цитоплазматические белки. Для локализации таких белков существует несколько регуляторных механизмов (рис. 8.9).

В первом случае дрожжевой ген тРНК-синтетазы одной из аминокислот — гистидина, локализованный в ядре, образует две различающиеся по длине мРНК. Митохондриальная, более длинная, отличается от цитоплазматической лишь наличием дополнительной последовательности на своем 5′-конце. Белок, транслирующийся с этой последовательности, начинается с дистального AUG-кодона и содержит N-конец (предпоследовательность), определяющий "митохондриальный сигнал". Более короткая мРНК не имеет этого сигнала и является цитоплазматической. Мутация в области предпоследовательности приводит к фенотипу с дыхательной недостаточностью, однако не влияет на цитоплазматическую HTS. Мутация участка за вторым AUG-кодоном приводит к потере цитоплазматической гистидин-тРНК-синтетазы и летальности [Grivell, 1989].

Ген *MOD5* другого фермента, изопентенил-пирофосфат-тРНК-изопентенилтрансферазы, как и HTS, содержит в 5′-районе два инициирующих трансляцию кодона AUG, способных направлять синтез двух отличающихся по длине на 11 аминокислот белковых молекул (рис. 8.9). Ввиду того что первый AUG-кодон находится очень близко от 5′-конца мРНК, а фланкирующие его последовательности имеют слабое сродство с консенсусной последовательностью, определяющей инициацию трансляции, вероятность синтеза более длинного (митохондриального) белка гораздо меньше, чем более короткого (ядерного), что на рисунке отражено с помощью линий различной толщины [Grivell, 1989].

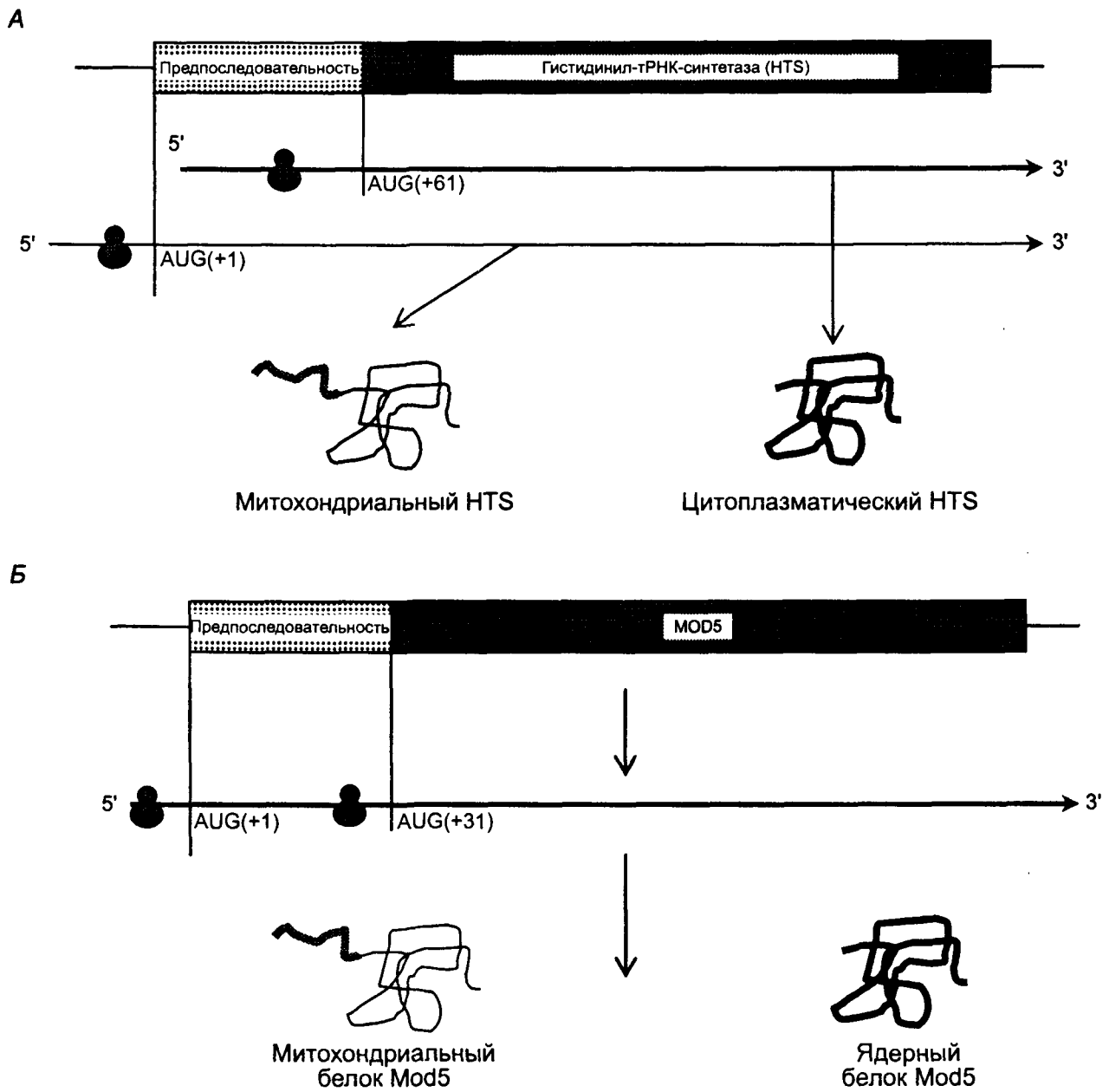


Рис. 8.9. "Один ген — один фермент — два предназначения". Две различные стратегии, используемые дрожжевой клеткой для достижения дифференциального синтеза двух белков с различной локализацией в клетке. *А* — синтез митохондриальной и цитоплазматической форм гистидинил-тРНК-синтетазы, кодируемой геном *HTS1,* с использованием дифференциальной транскрипции, в результате образуются две мРНК и два белка, различающиеся 5′ -концами. *Б* — синтез митохондриальной и ядерной форм изопентенил-пирофосфат-тРНК- изопентилтрансферазы, кодируемой геном *Mod5*, с одной мРНК. В этом случае близость первого кодона к 5′ - концу мРНК приводит к гораздо более частой инициации трансляции со второго (+31)AUG-кодона. Относительные количества синтезируемых молекул отражены схематически различной толщиной линий, отражающих мРНК или белки [по Grivell, 1989]

Первый вариант регуляции используется в дрожжевых клетках также для других белков двойной локализации: *TRM1, LEU4, FUM1, VAS1* [Grivell, 1989] и является, очевидно, более универсальным.

* * *

Доминирующая роль ядра в эукариотической клетке неопровержимо доказана генетическими исследованиями у одноклеточных эукариот, растений и животных. Тем не менее генетическая информация, хранящаяся в пластидах и митохондриях, уникальна и необходима для жизнедеятельности клетки и организма в целом. В данной главе мы представили ряд сведений, позволяющих оценить степень взаимозависимости клеточных геномов. Наличие собственных генетических систем в митохондриях и пластидах приводит к кажущимся расточительным затратам ресурсов и энергии. Но, несомненно, они же позволяют клетке быстрее и эффективнее реагировать на происходящие во внешней среде процессы, обеспечивая успешное онтогенетическое развитие организма и его взаимодействие с окружающим миром.

Литература

Adam Z. Protein stability and degradation in chloroplasts // Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 32. P. 773—783.

Adams K.L., Song K., Roessler P.G. et al. Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96. P. 13863—13868.

Adams K.L., Daley D.O., Qiu Y.L. et al. Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants // Nature. 2000. Vol. 408. P. 302—305.

Adams K.L., Daley D.O., Whelan J., Palmer J.D. Genes for two mitochondrial ribosomal proteins in flowering plants are derived from their chloroplast or cytosolic counterparts // Plant Cell. 2002. Vol. 14, No.4 . P. 931—943.

Allen J.F., Raven J.A. Free-radical-induced mutations vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles // J. Mol. Evol. 1996. Vol. 42. P. 482—492.

Argüello-Astorga G., Herrera-Estrella L. Evolution of light-regulated plant promoters // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. Vol. 49. P. 525—555.

Au H.C., Scheffler I.E. Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene: both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required // Eur. J. Biochem. 1998. Vol. 251. P. 164—171.

Auger D.L., Newton K.J., Birchler J.A. Nuclear gene dosage effects upon the expression of maize mitochondrial genes // Genetics. 2001. Vol. 157. P. 1711—1721.

Ayliffe M.A., Timmis J.N. Plastid DNA sequence homologies in the tobacco nuclear genome // Mol. Gen. Gen. 1992. Vol. 236. P. 105—112.

Barkan A., Goldschmidt-Clermont M. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression // Biochimie. 2000. Vol. 82, No. 6–7. P. 559—572.

Batschauer A., Mösinger E., Kreuz K. et al. The implication of a plastid-derived factor in the transcriptional control of nuclear genes encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein // Eur. J. Biochem. 1986. Vol. 154. P. 625—634.

Biswas G., Adebanjo O.A., Freedman B.D. et al. Retrograde Ca2+ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 522—533.

Bittner-Eddy P., Monroy A.F., Brambl R. Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa* // J. Mol. Biol. 1994. Vol. 235. P. 881—897.

Blanchard J.L., Lynch M. Organellar genes. Why do they end up in the nucleus? // Trends Genet. 2000. Vol. 16, No. 7. P. 315—320.

Blanchard J.L., Smith G.W. Pervasive migration of organellar DNA to the nucleus in plants // J. Mol. Evol. 1999 Vol. 41. P. 397—406.

Blanchard J.L., Smith G.W. Mitochondrial DNA migration events in yeasts and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution patterns // Mol. Biol. Evol. 1996. Vol. 13. P. 537—548.

Bolle C., Sopory S., Lübberstedt T. et al. The role of plastids in the expression of nuclear genes for thylakoid proteins studied with chimeric β-glucuronidase gene fusions // Plant Physiol. 1994. Vol.105. P. 1355—1364.

Börner T., Mendel R.R., Schiemann J. Nitrate reductase is not accumulated in chloroplast-ribosome-deficient mutants of higher plants // Planta. 1986. Vol.169. P. 202—207.

Braun H.P., Schmitz U.K. The protein-import apparatus of plant mitochondria // Planta. 1999. Vol. 209. P. 267—274.

Brown E. C., Somanchi A., Mayfield S.P. Interorganellar crosstalk: new perspectives on signaling from the chloroplast to the nucleus // Genome Biology. 2001. Vol. 2, No.8. P. 10211—10214.

Chamovitz D.A., Wei N., Osterlund M.T. et al. The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch // Cell. 1996. Vol. 86. P. 115—121.

Chelstowska A., Liu Z., Jia Y. et al. Signaling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast // Yeast. 1999. Vol. 15. P. 1377—1391.

Chivasa S., Carr J.P. Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic plants expressing salicylic acid hydrolase // Plant Cell. 1998. Vol.10. P. 1489—1499.

Choquet Y., Stern D.B., Wostrikoff K. et al. Translation of cytochrome *f* is autoregulated through 5'untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1998. Vol. 95. P. 4380—4385.

Chory J., Nagpal P., Peto C.A. Phenotypic and genetic analysis of *det2,* a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* // Plant Cell. 1991. Vol. 3. P. 445—459.

Chory J. Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants // Trends Genet. 1993. Vol. 9. P. 167—172.

Covello P.S., Gray M.W. Silent and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome oxidase (*cox2*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer // EMBO J. 1992. Vol. 11. P. 3815—3820.

Daley D.O., Adams K.I., Clifton R. et al. Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2 // Plant J. 2002. Vol. 30, No. 1. P.11—21.

Deng X.W., Gruissem W. Constitutive transcription and regulation of gene expression in nonphotosynthetic plastids of higher plants // EMBO J. 1988. Vol. 7. P. 3301—3308.

Deng X. W., Caspar T., Quail P.H. cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis* // Genes Dev. 1991. Vol. 5. P.1172—1182.

Drapier D., Girard-Bascou J., Wollman F.-A. Evidence for nuclear control of the expression of the *atpA* and *atpB* chloroplast genes in *Chlamydomonas* // Plant Cell. 1992. Vol. 4. P. 283—295.

Duckett C.M., Gray J.C. Illuminating plant development // Bioessays. 1995. Vol. 17. P. 101—103.

Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence // J. Mol. Biol. 2000. Vol. 300. P. 1005—1016.

Erickson H.P. FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? // Cell. 1995. Vol. 80. P. 367—370.

Figueroa P., Gomez I., Holuigue L. et al. Transfer of *rps14* from the mitochondrion to the nucleus in maize implied integration with a gene encoding the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase and expression by alternative splicing // Plant J. 1999. Vol.18. P. 601—609.

Finnegan P.M., Whelan J., Millar A.H. et al. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase // Plant Physiol. 1997. Vol. 114. P. 455—466.

Fisher K., Kammerer B., Gutensohn M. et al. A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter // Plant Cell. 1997. Vol. 9. P. 453—462.

Frances S. White M.J. Edgerton M.D. et al. Initial characterization of a pea mutant with light-independent photomorphogenesis // Plant Cell. 1992. Vol. 4. P. 1519—1530.

Hachiya N., Mihara K., Suda K. et al. Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import // Nature. 1995. Vol. 376. P. 705—709.

Herrmann R.G., Oemüller R., Bichler J. et al. The thylakoid membrane of higher plants: genes, their expression and interaction // Plant Molecular Biology. New York: Plenum Press. 1991. P. 411—427.

Herrmann R.G. Eukaryotism, towards a new interpretation // Eukaryotism and Symbiosis. Vien: Springer-Verlag, 1997. P. 73—118.

Howe C.J., Barbrook A.C., Lockhart P.J. Organelle genes — do they jump or are they pushed? // Trends Genet. 2000. Vol. 16. P. 65—66.

Gilmartin P.M., Sarokin L., Memelink J., Chua N.-H. Molecular light switches for plant genes // Plant Cell. 1990. Vol. 2. P. 369—378.

Glick B.S. Can Hsp70 protein act as a force-generating motors? // Cell. 1995. Vol. 80. P. 11—14.

Goldschmidt-Clermont M. Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells // Int. Rev. Cytol. 1998. Vol. 177. P. 115—180.

Graham B.H., Waymire K.G., Cottrell B. et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardyomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of adenine nucleotide translocator // Nat. Genet. 1997. Vol. 16. P. 226—234.

Gray M. W., Lang B.F., Cedergren R. et al. Genome structure and gene content in protists mitochondrial DNAs // Nucl. Acids Res. 1998. Vol. 26. P. 865—878.

Grivell L.A. Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis // Eur. J. Biochem. 1989. Vol. 182, No.1. P. 477—493.

Jaehning J. Mitochondrial transcription: is a pattern emerging? // Mol. Microbiol. 1993. Vol. 8. P. 1—4.

Kadowaki K., Kubo N., Ozawa K., Hirai A. Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signals // EMBO J. 1996. Vol.15. P. 6652—6661.

Kanaji S., Iwahashi J., Kida Y. et al. Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane // J. Cell. Biol. 2000. Vol. 151. P. 277—288.

Kaneko T., Sato S., Kotani H. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Cynechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions // DNA Res. 1996. Vol. 3. P. 109—136.

Kanevski I., Maliga P. Relocation of the plastid *rbcL* gene to the nucleus yields functional ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 1969—1973.

Kawashima N., Wildman S.G. Studies of fraction I protein. IV. Mode of inheritance of primary structure in relation to whether chloroplast or nuclear DNA contains a code for chloroplast protein // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 262. P. 42—49.

Khrebtunkova I., Spreitzer R.J. Elimination of the Chlamydomonas gene family that encodes

the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 13689—13693.

Kubo N., Harada K., Hirai A., Kadowaki K. A single nuclear transcript encoding mitochondrial RPS14 and SDHB of rice is processed by alternative splicing: common use of the same mitochondrial targeting signal for different proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. 1999. Vol. 96. P. 9207—9211.

Kusnetsov V., Bolle C., Lübberstedt T. et al. Evidence that the plastid signal and light operate via the same *cis*–acting elements in the promoters of nuclear genes for plastid proteins // Mol. Gen. Gen. 1996. Vol. 252. P. 631—639.

Kwok S.F., Piekos B., Miséra S., Deng X.-W. A complement of ten essential and pleiotropic Arabidopsis *COP/DET/FUS* genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness // Plant Physiol. 1996. Vol. 110. P. 731—742.

Leon P., Arroyo A., Mackenzie S. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants //Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. Vol. 49. P. 453—480.

*Li H.-M., Culligan K., Dixon R.A., Chory J. CUE1:*a mesophyll cell-specific positive regulator of light-controlled gene expression in *Arabidopsis* // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 1599—1610.

Li H.-M., Washburn T., Chory J. Regulation of gene expression by light // Curr. Opinion in Cell Biol. 1993. Vol. 5. P. 455—460.

Liao X., Butow R. RTG1 and *RTG2:* two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus // Cell. 1993. Vol. 72. P. 61—71.

Lin X., Kaul S., Rounsley S. et al. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. Vol. 402. P. 761—768.

Liu Z., Butow R.A. A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol. 19. P. 6720—6728.

Liu X.-Q., Hosler J.P., Boynton J.E., Gillham N.W. mRNAs for two ribosomal proteins are preferentially translated in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardii* under conditions of reduced protein synthesis // Plant Mol. Biol. 1989. Vol. 12. P. 385—394.

Lopez J.V., Yuhki N., Masuda R. et al. NUMT, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat // J. Mol. Evol. 1994. Vol. 39. P. 174—190.

Mackenzie S., McIntosh L. Higher plant mitochondria // Plant Cell. 1999. Vol. 11. P. 571—586.

Martin W., Herrmann R.G. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens and why? // Plant Physiol. 1998. Vol. 118. P. 9—17.

Martin W., Schnarrenberger C. Evolutionary transfer of a mosaic pathway from eubacterial to nuclear chromosomes: the Calvin cycle enzymes from higher plants // Curr. Genet. 1997. Vol. 32. P. 1—18.

Martin W., Stoebe B., Goremykin V. et al. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts // Nature. 1998. Vol. 393. P. 162—165.

Mayer A., Neupert W., Lill R. Mitochondrial protein import: reversible binding of the presequence at the trans side of the outer membrane drives partial translocation and unfolding // Cell. 1995. Vol. 80. P. 127—137.

Mayfield S.P., Taylor W.C. Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein (LHCP)mRNA // Eur. J. Biochem. 1984. Vol. 144. P. 79—84.

McCormac D.J., Barkan A. A nuclear gene in maize required for the translation of the chloroplast *atpB/E* mRNA // Plant Cell. 1999. Vol.11. P. 1709—1716.

Mihara K. Targeting and insertion of nuclear-encoded preproteins into the mitochondrial outer membrane // Bioessays. 2000. Vol. 22, No. 4. P. 364—371.

Millen R.S., Olmstead R.G., Adams K.L. et al. Many parallel losses of infA from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus // Plant Cell. 2001. Vol. 13, No. 3. P. 645—658.

Miyata S., Nakazono M., Hirai A. Transcription of plastid-derived tRNA genes in rice mitochondria // Curr. Genet. 1998. Vol. 34. P. 216—220.

Mochizuki N., Brusslan J.A., Larkin R. et al. Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2001. Vol. 98. P. 2053—2058.

Mochizuki N., Susek R., Chory J. An intracellular signal transduction pathway between the chloroplast and nucleus is involved in de-etiolation // Plant Physiol. 1996. Vol. 112. P. 1465—1469.

Møller S.G., Kunkel T., Chua N.-H. A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling // Genes Dev. 2001. Vol. 15. P. 90—103.

Murcha M.W., Huang T., Whelan J. Import of precusor proteins into mitochondria from soybean tissues during development // FEBS Lett. 1999. Vol. 464. P. 53—59.

Murdock D.G., Boone B.E., Esposito L.A., Wallace D.C. Up-regulation of nuclear and mitochondrial genes in the skeletal muscle of mice lacking the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 14429—14433.

Nugent J.M., Palmer J.D. RNA-mediated transfer *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution // Cell. 1991. Vol. 66. P. 473—481.

Oelmüller R. Photooxidative destruction of chloroplasts and its effects on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels // Photochem. Photobiol. 1989. Vol. 49. P. 229—239.

Oelmüller R., Dietrich G., Link G., Mohr H. Regulatory factors involved in gene expression (subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) in mustard *(Sinapis alba* L.*)* cotyledons // Planta. 1986a. Vol. 169. P. 260—266.

Oelmüller R., Levitan I., Bergfeld R. et al. Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on plastids // Planta. 1986b. Vol. 168. P. 482—492.

Osteryoung K.W., Vierling E. Conserved cell and organelle division // Nature. 1995. Vol. 376. P. 473—474.

Palmer J.D., Adams K.L., Cho Y., Parkinson C.L. et al. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2000. Vol. 97, № 13. P. 6960—6966.

Palomares R., Herrmann R.G., Oelmüller R. Post-transcriptional and post-translational regulatory steps are crucial in controlling the appearance and stability of thylakoid polypeptides during the transition of etiolated tobacco seedlings to white light // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 217, No.1. P. 345—352.

Parikh V., Morgan M.M., Scott R. et al. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast // Science. 1987. Vol. 235. P. 576—580.

Pichersky E., Logsdon J.M., McGrath J.M., Stasys R.A. Fragments of plastid DNA in the nuclear genome of tomato: prevalence, chromosomal location and possible mechanism of integration // Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 225. P. 453—458.

Pont-Kingdon G., Okada N.A., Macfarlane J.L. et al. A coral mitochondrial MutS gene // Nature. 1995. Vol. 375. P. 109—111.

Pont-Kingdon G., Okada N.A., Macfarlane J.L. et al. Mitochondrial DNA of the coral *Sacophyton glaucum* contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene transfer from the nucleus to mitochondrion // J. Mol. Evol. 1998. Vol. 46. P. 419—431.

Poyton R.O., McEwen J.E. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes // Annu. Rev. Biochem. 1996. Vol. 65. P. 563—607.

Puente P., Wei N., Deng X.-W. Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis* // EMBO J. 1996. Vol.15. P. 3732—3743.

Pyke K.A., Leech R.M. Chloroplast division and expansion is radically altered by nuclear mutations in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1992. Vol. 99. P. 1005—1008.

Pyke K.A., Leech R.M. A genetic analysis of chloroplast division and expansion in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1994. Vol.104. P. 201—207.

Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M. et al. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction // Science. 1995. Vol. 268. P. 675—660.

Race H.L., Herrmann R.G., Martin W. Why have organelles retained genomes? //Trends Genet. 1999. Vol. 15, No.9. P. 364—370.

Rapp J.C., Mullet J.E. Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *RbcS* and *Cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently // Plant Mol. Biol. 1991. Vol.17. P. 813—823.

Ricchetti M., Fairhead C., Dujon B. Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast chromosomes // Nature. 1999. Vol. 402. P. 96—100.

Rodermel S., Haley J., Jiang C.Z. et al. A mechanism for intergenomic integration: abundance of ribulose bisphosphate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 3881—3885.

Ryan K.R., Jensen R.E. Protein translocation across mitochondrial membranes: what a long, strange trip it is // Cell. 1995. Vol. 83. P. 517—519.

Sasaki Y., Konishi T., Nagano Y. The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants // Plant Physiol. 1995. Vol. 108. P. 445—449.

Scarpulla R.C. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells // J. Bioenerg. Biomembr. 1997. Vol. 29. P. 109—119.

Schatz G., Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes // Science. 1996. Vol. 271. P.1519—1526.

Sekito T., Thornton J., Butow R. Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p // Mol. Biol. Cell. 2000. Vol.11, No. 6. P. 2103—2115.

Staub J.M., Wei N., Deng X.W. Evidence for FUS6 as a component of the nuclear-localized COP9 complex in *Arabidopsis* // Plant Cell. 1996. Vol. 8, No. 11. P. 2047—2056

Stoebe B., Martin W., Kowallik K.V. Distribution and nomenclature of protein-coding genes in 12 sequenced chloroplast genomes // Plant Mol. Biol. Rep. 1998. Vol. 16. P. 243—255.

Stupar R.M., Lilly J.W., Town C.D. et al. Complex mtDNA constitutes an approximate 620 kb insertion on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2: implication of potential sequencing errors caused by large-unit repeats // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2001. Vol. 98. P. 5099—5103.

Sullivan J.A., Gray J.C. Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant // Plant Cell. 1999. Vol.11. P. 901—910.

Surpin M., Chory J. The co-ordination of nuclear and organellar genome expression in eukaryotic cells // Essays Biochem. 1997. Vol. 32. P. 113—125.

Susek R.E., Chory J. A tale of two genomes: role of chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression // Aust. J. Plant. Physiol. 1992. Vol. 19. P. 387—399.

Thompson W.F., White M.J. Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. Vol. 42. P. 423—466.

Thorsness P.E., Fox T.D. Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae* // Nature. 1990. Vol. 346. P. 376—379.

Thorsness P.E., Weber E.R. Escape and migration of nucleic acids between chloroplasts, mitochondria and the nucleus // Int. Rev. Cytol. 1996. Vol. 165. P. 207—234.

Ulery T.L., Jang S.H., Jaehning J.A. Glucose repression of yeast mitochondrial transcription: kinetics of derepression and role of nuclear genes // Mol. Cell. Biol. 1994. Vol.14, No. 2. P. 1160—1170.

Ungerman C., Neupert W., Cyr D.M. The role of Hsp70 in conferring unidirectionality of protein translocation into mitochondria // Science. 1994. Vol. 266. P. 1250—1253.

Vanlerberghe G.C., McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 48. P. 703—734.

Vincentz M., Moureaux T., Leudecker M.-T. et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites // Plant J. 1993. Vol. 3. P. 315—324.

Yoshida R., Sato T., Kanno A., Kameya T. Streptomycin mimics the cool temperature response in rice plants // J. Exp. Bot. 1998. Vol. 49. P. 221—227.

Wei N., Deng X.-W. The role of COP/DET/FUS genes in light control of Arabidopsis seedling development // Plant Physiol. 1996. Vol. 112. P. 871—878.

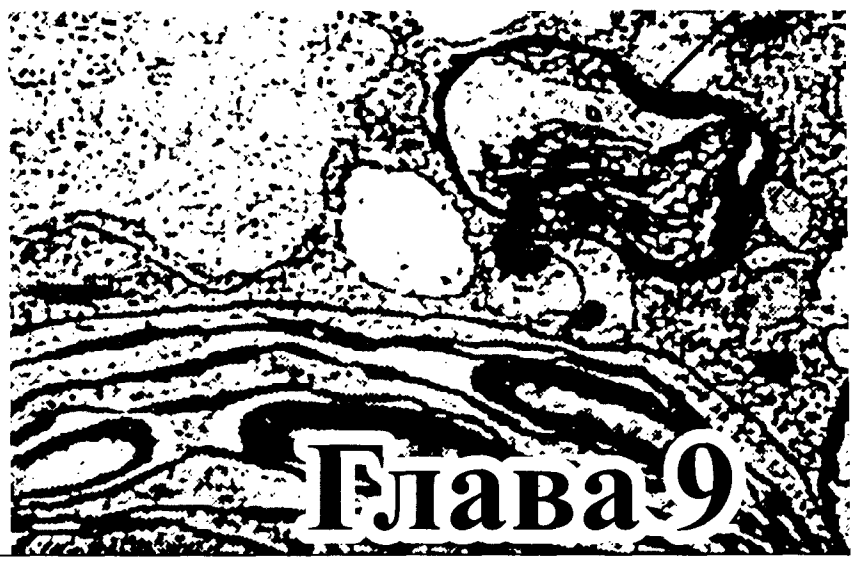
Wichmann C., Schuster W. Transfer of *rps10* from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana:* evidence for RNA-mediated transfer and exon shuffling at the integration site // FEBS Lett. 1995. Vol. 374. P. 152—156.

Woessner J., Gillham N.W., Boynton J.E. Chloroplast gene encoding subunits of the H+-ATPase complex of *Chlamydomonas reinhardii* are rearranged compared to higher plants: sequence of the *atpE* gene and location of the *atpF* and *atpI* genes // Plant Mol. Biol. 1987. Vol. 8. P. 151—158.

Wood C.K., Afourtit C., Albury M.S. et al. Over-expression of the mitochondrial matrix located HSP70 in transgenic tobacco results in enhanced growth characteristics // Plant mitochondria: from gene to function. Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers, 1998. P. 211–217.

Zhang X.-H., Brotherton J.E., Widholm J.M., Portis A.R. Targeting a nuclear anthranilate synthase α-subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan biosynthesis. Return of a gene to its pre-endosymbiotic origin // Plant Physiol. 2001. Vol. 127. P. 131—141.

Zitomer R.S., Lowry C.V. Regulation of gene-expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Rec. 1992. Vol. 56. P. 1—11.



Глава 9

Изменение генетической структуры органелл. Мутации спонтанные и индуцированные

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ наследственность как одна из ветвей генетики появилась благодаря обнаружению спонтанных мутаций. Еще в начале прошлого века у львиного зева была описана пестролистность [Baur, 1910]; затем задолго до обнаружения ДНК в органеллах наследование спонтанных мутаций пластид изучали у разных растений [Gregory, 1915; Рыжков, 1938], но в основном у родов *Antirrhinum* и *Oenothera* [Hagemann, 1960; Stubbe, 1964]. Так, была собрана коллекция, включавшая более 40 различных спонтанно возникших пластомных мутантов *Oenothera*. Частота спонтанных мутаций хлорофилл-дефектности в пластоме *Oenothera* составляла примерно 0,3% — с такой вероятностью в популяции появлялись пестролистные растения [Kutzelnigg, Stubbe, 1974]. Были описаны спонтанно возникающие мутации пестролистности и стрептомициноустойчивости у табака [Самсонова, 1970; Maliga et al.,1975; Umiel, 1979]. В ранних работах частота спонтанных мутаций пластома у высших растений предположительно определялась в диапазоне 0,02—0,3% [Hagemann, 1971], по другим данным, этот диапазон несколько шире — 0,01—1,3% [Michaelis, 1969]. Позднее было показано, что разные участки пластома обладают неодинаковой мутабильностью; так, для микросателлитных последовательностей пластома [Powell et al., 1995, 1996] уровень спонтанной мутабильности составляет $3,2—7,9 \cdot 10^{-5}$ [Provan et al., 2001].

Пластидные мутации по своему фенотипическому проявлению делятся на три основные группы: 1) с нарушениями в световой и темновой фазах фотосинтеза и/или дефектной окраской листьев — от светло-зеленых до белых; 2) с приобретенной резистентностью к гербицидам; 3) с приобретенной резистентностью к антибиотикам [Насыров,1975; Hagemann, 1979, 1992; Herrmann et al.,1980; Börner, Sears, 1986].

Одноклеточные зеленые водоросли *Chlamydomonas,* имеющие только один хлоропласт и способные расти как авто-, так и гетеротрофно, оказались чрезвычайно информативной моделью для изучения спонтанных мутаций органельных геномов. Впервые неядерный мутант был выделен у *Chlamydomonas* еще в 50-е годы [Sager, 1954]. Затем было показано, что две из трех клеточных белоксинтезирующих систем — хлоропластная и митохондриальная — чувствительны к антибактериальным препаратам, а антибиотик рифампицин специфически ингибирует транскрипцию в хлоропластах, что позволило точнее систематизировать мутанты *Chlamydomonas* [Surzycki, Gillham, 1971; Сэджер, 1975]. В дальнейшем в хлоропластах четырех видов *Chlamydomonas* (*C. reinhardtii, C. smithii, C. eugametos, C. moewusii*)

было обнаружено большее разнообразие геномных перестроек, чем описанных для свыше 200 видов наземных растений [Сэджер, 1975; Palmer, 1985].

Митохондриальные мутации интенсивно изучались на культурах дрожжей, нейроспоры и других грибов [Slonimski et al., 1968; Weislogel, Butow, 1971; Cummings et al., 1979; Bernardi, 1979; Bertrand et al.,1980; Gaillard et al., 1980]. Были обнаружены несколько классов мутаций: 1) плейотропные мутации — к ним относятся мутации *petite* — дыхательной недостаточности, а также мутации mit, имеющие фенотип *petite,* но сохранившие систему митохондриального белкового синтеза, 2) мутации антибиотикоустойчивости [Linnane et al., 1972; Slonimski, Tzagoloff, 1976; Гаузе, 1977].

Мы не будем останавливаться на "предмолекулярных" и ранних молекулярных исследованиях органельных мутантов, информацию о которых читатель легко найдет в замечательных обзорах и монографиях [Sager, Ramanis, 1963; Гаузе, 1977; Tzagoloff et al., 1976; Grun, 1976; Dujon et al.,1974; Dujon, 1981]. Отметим только, что благодаря этим трудам очерчен круг наиболее подходящих объектов и описаны основные типы спонтанных мутаций органелл, часть которых была затем проанализирована на уровне изменения последовательности нуклеотидов органельных ДНК.

Изучение структурных, функциональных и биохимических изменений цитоплазматических мутантов, как предполагалось, позволит точнее понять функцию органельных геномов в клетке [Hagemann, 1971]. Это было блестяще подтверждено в последующие десятилетия. Так, в табл. 9.1 приведена лишь незначительная часть важнейших фактов, касающихся экспрессии пластидного генома, которые были установлены с помощью пластидных мутантов.

Таблица 9.1

Некоторые пластомные мутанты, позволившие установить ряд особенностей экспрессии пластидного генома

Мутант	Мутационный дефект	Факт, установленный при исследовании мутанта	Источник*
50 индуцированных мутантов *psbA* гена шпината	Мутагенное изменение промоторов	Транскрипция пластидных генов регулируется за счет использования промоторов разной эффективности	Gruissem, Tonkyn, 1993
Мутанты по *trnR1* и *trnS1* генам шпината	Делеция части гена	Транскрипция идет с промотора, находящегося внутри кодирующей области гена	Там же

Продолжение табл. 9.1

Мутант	Мутационный дефект	Факт, установленный при исследовании мутанта	Источник*
Мутант ячменя *albostrians*	Полное отсутствие рибосом	Ряд пластидных генов транскрибируется с помощью ядерной РНК-полимеразы	Там же
Делеционный мутант табака по гену *rpoB*	Отсутствует β-субъединица пластидной РНК-полимеразы	РНК-синтез в пластидах доказывает существование второй — ядерной РНК-полимеразы пластид	Allison et al., 1996
Делеционный мутант риса (спонтанная делеция при культивировании пыльников *in vitro*)	Отсутствует 80% пластидной ДНК, в том числе все полимеразные гены	Транскрипция тРНК генов свидетельствует о наличии второй, ядерно кодируемой РНК-полимеразы пластид	Chiba et al., 1996
Делеционный мутант *Chlamydomonas*	Отсутствует 3′-инвертированный повтор гена *atpB*	60—80%-ная потеря мРНК *atpB* свидетельствует о роли 3′-инвертированых повторов как элементов контроля стабильности мРНК-пластид	Sugita, Sugiura, 1996
Мутант ячменя с дефектными рибосомами пластид	Блокирован синтез пластидного фактора, участвующего в цис-сплайсинге гена *rps12*	Для цис-сплайсинга интронов пластид необходимы факторы, кодируемые пластомом	Там же
Пластомный мутант *Chlamydomonas*	Мутации Shine-Dalgarno-подобных последовательностей в *psbA* и *petD* генах	1. Резкое подавление синтеза белка D — продукта *psbA* гена; уменьшение количества *psbA* мРНК 2. Не изменяется ни стабильность мРНК *petD*, ни уровень трансляции	Stern et al., 1997

* См. литературу к главе 3.

Наиболее распространенной и весьма специфической митохондриальной мутацией высших растений является мутация стерильности пыльцы — ЦМС, которая требует специального рассмотрения (см. главу 11). Наконец, последняя глава данной книги будет посвящена мутациям митохондриального генома человека, приводящим к различным заболеваниям и связанным, вероятно, с процессами старения организма.

Спонтанные мутации органельных геномов

В главе 8 рассматривались эволюционные изменения геномов пластид и митохондрий, заключающиеся в утрате значительной части органельной ДНК и перемещении большого числа генов в ядро. Кроме этих процессов "макроперестроек", происходят и спонтанные точечные изменения геномов органелл. Так, показано, что митохондриальная ДНК у млекопитающих примерно в 5 раз более изменчива, чем ядерная [Wolfe et al., 1987]. Скорость нуклеотидных замен в митохондриальной ДНК рыб (акулы) в семь-восемь раз ниже, чем у млекопитающих, что связывают с более низкой скоростью метаболизма у холоднокровных [Martin et al., 1992].

Для определения сравнительной скорости спонтанного мутирования у растений исследовали частоту нуклеотидных замен в последовательностях хлоропластной, ядерной и митохондриальной ДНК различных видов. Оказалось, что скорости синонимических нуклеотидных замен (позволяющая приблизительно оценить частоту нейтральных точечных мутаций) в ядерной ДНК млекопитающих и высших растений весьма сходны, тогда как митохондриальные ДНК высших растений стабильнее, чем таковые млекопитающих, в 50—100 раз [Wolfe et al., 1987; Palmer et al., 2000]. Ядерные ДНК покрытосеменных изменяются в 2 раза быстрее, чем хлоропластные, а хлоропластные — в 3 раза быстрее, чем митохондриальные ДНК. Обнаружена также особая стабильность больших инвертированных повторов хлоропластной ДНК: частота нуклеотидных замен в этих районах по крайней мере в три-четыре раза ниже, чем в остальных [Palmer, 1990]. Является ли это результатом более низкой частоты мутирования или более эффективной репарации возникших замен с сохранением абсолютной идентичности обеих копий, пока неясно [Wolfe et al., 1987].

Связь изменения частоты точечных замен в хлоропластном геноме с инвертированным повтором продемонстрирована на эволюционных мутантах, имеющих как чрезвычайно редуцированный, так и увеличенный по длине повтор. Частота точечных замен в последовательностях, оказавшихся вне повтора, увеличивалась в среднем в четыре раза, примерно на столько же

уменьшалась частота мутаций у прежде однокопийных участков, которые становились частью увеличенного инвертированного повтора [Palmer, Thompson, 1982; Palmer, 1990].

Как правило, митохондриальные ДНК высших растений имеют необычно низкий уровень точечных мутаций. Чрезвычайно малая частота точечных мутаций мтДНК растений, возможно, связана с особой точностью их ДНК-полимеразы или с высокой репарационной активностью (mismatch-repair) — пока нет данных, позволяющих назвать истинную причину. Обнаружено, однако, что из 281 проанализированного вида покрытосеменных у двух — *Pelargonium hortorum* и *Plantago rugelii* — уровень спонтанных мутаций мтДНК в десятки раз выше, чем у всех остальных, и близок к этому показателю в мтДНК позвоночных. Причем хлоропластные ДНК указанных видов практически не отличаются от других по уровню спонтанных мутаций, так что эти виды нельзя отнести к быстро эволюционирующим. Анализ мтДНК других видов рода *Pelargonium* (*Geraniaceae*) и *Plantago* (*Plantaginaceae*) показал значительную изменчивость по уровню синонимических замен, как будто в процессе их эволюции по непонятной причине происходило последовательное увеличение уровня спонтанной мутабильности митохондриального генома [Palmer et al., 2000].

Как обсуждалось в главах 2, 4, 8, хлоропластные и митохондриальные ДНК растений эволюционируют совершенно по-разному. В то время как митохондриальные ДНК высших растений отличаются значительной вариабельностью размеров и структуры молекул, порядок генов в хлоропластной ДНК высших растений почти не изменялся. Так, *Marchantia,* отделенная от табака по крайней мере 400 миллионами лет эволюции, имеет всего одну инверсию в хлоропластном геноме. Три инверсии отличают хпДНК табака от хпДНК риса (рис. 9.1). В то же время митохондриальный геном двух различных цитоплазм (T и N) кукурузы, разделенных не более чем 100 тыс. лет эволюции, различается не менее чем 30 перестройками [Palmer, 1990].

Для объяснения столь резких различий рассматривали ряд возможных причин. Прежде всего, короткие повторы, которые могут служить точками гомологичных рекомбинаций, гораздо чаще встречаются в митохондриальной, чем в пластидной ДНК. У некоторых пластидных ДНК с повышенной частотой перестроек число таких повторов также увеличено [Bowman, Dyer, 1986; Palmer, 1990].

Во-вторых, поскольку инверсии могут приводить к инактивации генов, наличие множества межгенных спейсеров в митохондриальном геноме и почти полное их отсутствие в пластидном геноме снижают вероятность повреждающего эффекта перестроек в митохондриях. И наконец, большой инвертированный повтор в пластидах не только отличается более низкой

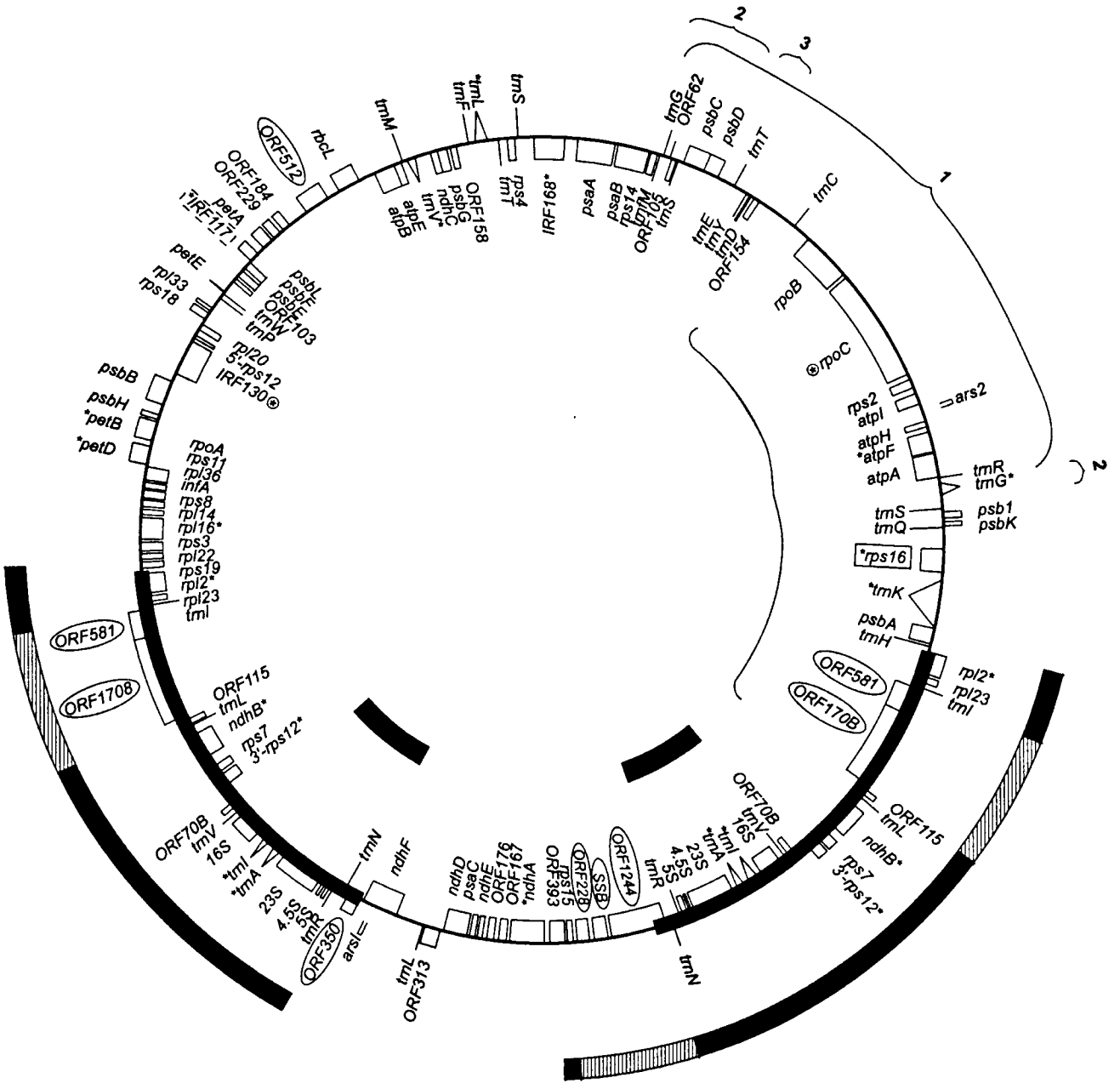


Рис. 9.1. Генная карта и генетические преобразования хлоропластных геномов табака, риса и маршанции. Окружность — хпДНК табака. Гены на внешней стороне транскрибируются против, а на внутренней — по часовой стрелке. В овалах — гены, обнаруженные у табака и маршанции, но отсутствующие у риса; ген в рамке обнаружен у табака и риса, но отсутствует у маршанции; ген в пунктирной рамке обнаружен только у табака. Звездочками обозначены гены, имеющие одинаковые интроны во всех трех геномах; звездочками в кружке — гены, имеющие интроны только у табака и маршанции. Указаны инвертированные повторы табака размером 25,3 т.п.н. Жирные линии внутри и вне хлоропластного генома табака — инвертированные повторы соответственно маршанции (10 т.п.н.) и риса (20,8 т.п.н.); области, делетированные у риса, показаны штриховкой. Скобка внутри круга обозначает границы 30 т.п.н. зоны, которая инвертирована у маршанции по сравнению с табаком. Скобки 1 — 3 вне круга обозначают области, которые переместились из-за трех перекрывающихся инверсий у риса по сравнению с табаком [по Palmer, 1990]

частотой точечных мутаций, но и снижает вероятность частоты дальнейших инверсий. У двух видов, эволюционно утративших инвертированный повтор, частота перестроек пластидной ДНК увеличена [Palmer, 1990].

Особенно значительную реорганизацию из всех исследованных высших растений претерпел пластидный геном *Trachellium caeruleum* (семейство *Campanulaceae*) — в нем обнаружены по меньшей мере семь инверсий, транспозиции, делеции и инсерции, потери генов и ряд других перестроек. Хотя инвертированный повтор у *Trachellium* имеет обычный размер — 27 т.п.н., он сильно отличается по набору генов, обычно входящих в его состав у других покрытосеменных. Произошло это за счет распространения повтора на область SSC и сокращения его на границе с LSC, в результате чего размер малого однокопийного участка составляет всего 8 т.п.н., тогда как большого — 100 т.п.н. Выявленные в пластоме *Trachellium* по крайней мере пять семейств малых повторов, несомненно, участвуют в наблюдаемых структурных реорганизациях пластидной ДНК [Cosner et al., 1997].

В целом хлоропластный геном эволюционирует по принципу "используй или избавляйся" ("use it or loose it"): малое количество псевдогенов в пластоме, а также потеря всех фотосинтетических генов паразитами *Epifagus virginiana* и *Conopholis americana* являются примерами использования этого принципа [Palmer, 1990]. Также произошла утрата половины пластидного генома у бесцветной эвгленоидной *Astasia longa*: ее пластидная ДНК составляет всего 73 т.п.н., тогда как у *Euglena gracilis* — 146,4 т.п.н. [Palmer, 1990; Hagemann, Hagemann, 1994]. Исследования голопаразитических растений *Hydnora* и *Corynaea* также продемонстрировали утрату участков пластома [Nickrent et al.,1997]. Паразитическое покрытосеменное растение повилика (*Cuscuta),* несмотря на сохранившуюся способность к фотосинтезу, не может расти фотоавтотрофно. В хлоропластном геноме повилики сохранились фотосинтетические гены, но утеряны все функциональные гены *ndh* (см. главу 2) [Wakasugi et al., 1999].

В отличие от хлоропластного в митохондриальном геноме растений образуется некий "склад" неиспользуемых последовательностей. Ярким примером является сохранение в митохондриях *Epifagus* ряда фотосинтетических генов пластидного происхождения, в то время как в самих пластидах *Epifagus* они элиминируются [Palmer, 1990]. Пластидные псевдогены, находящиеся в митохондриях, также изменяются медленнее, чем их функционирующие копии в хлоропластах [Schuster, Brennicke, 1988].

Сравнительно низкая частота спонтанных точечных мутаций хлоропластной ДНК позволяет использовать анализ первичных последовательностей отдельных генов для детального выяснения филогенетических связей и эволюции растительного царства в целом. Так, усилиями многих лабораторий

была определена первичная последовательность пластидного гена *rbcl* у 750 видов растений — от водорослей до покрытосеменных. Эта крупнейшая коллекция нуклеотидных последовательностей одного гена позволила реконструировать эволюционную историю растений с беспрецедентной для систематики точностью [Clegg et al., 1994].

Детальный анализ мутаций в хлоропластном геноме выявил ряд закономерностей для разных функциональных категорий хлоропластной ДНК. В частности, анализ некодирующих участков позволил выдвинуть гипотезу, объясняющую низкое содержание этих участков в пластоме по сравнению с митохондриальной ДНК [Clegg et al., 1994].

Наиболее изученным некодирующим районом является участок, следующий за *rbcl* геном у семейства злаков (*Poaceae*). Этот район фланкирован генами *rbcl* и *psaI* (или *psaA*). Длина его в геноме риса 1694 п.н. — это самый длинный некодирующий район в пластидной ДНК высших растений [Clegg, 1994]. Здесь же расположен псевдоген ψ*rpl23* одного из рибосомальных белковых генов *rpl23*. Четыре независимо возникшие делеции размером 850 и более нуклеотидов были выявлены почти в одном и том же месте некодирующего района (рис. 9.2), их возникновение связано, вероятно, с рекомбинациями между короткими прямыми повторами [Ogihara et al., 1988]. В то время как частота точечных нуклеотидных замен в данной некодирующей области примерно такая же, как в соседнем с ней гене *rbcl*, число коротких инсерций/делеций значительно увеличено. Исследование некодирующего участка, предшествующего гену *rbcl*, также выявило сходные закономерности: короткие инсерции/делеции встречаются чаще, чем нуклеотидные замены. Наблюдаются и более сложные структурные перестройки, такие, как множественные тандемные дупликации [Clegg et al., 1994].

Рис. 9.2. Схема некодирующей области, фланкированной генами *rbcL* и *psa1*. Указан псевдоген ψ*rpl23* и четыре независимые делеции. Область, несущая инвертированный повтор, характеризуется повышенной вариабельностью [Clegg et al., 1994]

Таким образом, низкое содержание некодирующих ДНК (около 30%) в хлоропластной ДНК растений по сравнению с митохондриальной (см. главы 2, 4) может быть связано с быстрым удалением их из генома пластид путем внутри- и межмолекулярных рекомбинаций, часто происходящих в некодирующих участках. Некодирующие области хлоропластных геномов разных видов злаков довольно сильно различаются; очевидно, консервативные генные последовательности существуют в весьма переменчивом окружении некодирующих ДНК [Clegg et al., 1994].

Горячие точки при структурных реорганизациях органельных геномов

Пластидная ДНК. Структурные изменения пластидных ДНК включают делеции, инсерции, инверсии и транслокации [Palmer et al., 1985; Bowman, Dyer, 1986; Ogihara et al., 1992]. Сравнение структурных мутаций у родственных видов и родов растений показывает, что чаще всего они происходят в определенных местах — так называемых горячих точках (hot spot) [Palmer, 1985; Ogihara, Tsunewaki, 1988]. Природа этих горячих точек не выяснена, некоторые исследователи связывают ее с наличием коротких повторяющихся последовательностей [Bowman, Dyer, 1986; Ogihara et al., 1992]. Например, 12 групп таких повторов размером в среднем менее 100 нуклеотидов обнаружено в хлоропластном геноме пшеницы [Bowman, Dyer, 1986], 25—40 копий инвертированных последовательностей размером 100—300 п.н. разбросаны по хлоропластной ДНК *Chlamydomonas,* по крайней мере пять копий одного довольно крупного повтора (200—1000 п.н.) присутствуют в пластидной ДНК клевера *(Trifolium)* [Palmer, 1985], не менее пяти копий — в пластоме *Trachellium* [Cosner et al.,1997].

Наличие коротких повторов создает предпосылки для рекомбинантных процессов в молекулах хлоропластных ДНК, в результате чего и возникают перечисленные выше структурные мутации. Так, было показано, что пшеничный повтор длиной 70 нуклеотидов картируется на концах инверсии размером 20 т.п.н., произошедшей у злаков во время или после их дивергенции [Palmer, Thompson, 1981], ряд повторов ассоциирован с концами инверсий у *Trachellium* [Cosner et al.,1997].

Внутримолекулярной рекомбинацией по коротким повторам обусловлен ряд делеций генов *atpB* и *psbA* у пластид *Chlamydomonas* [Boynton et al., 1992]. Тем не менее попытка связать с короткими повторами расположение горячих точек при межмолекулярной рекомбинации пластидных ДНК в процессе скрещивания *Chlamydomonas* успехом не увенчалась. Было показано, что на протяжении 15 т.п.н. из большого инвертированного повтора (вся

длина которого 22 т.п.н.) имеются как горячие, так и холодные рекомбинационные точки, т.е. обмены участками между молекулами совершаются с неравной вероятностью для разных участков. Однако эту избирательность не удалось связать с наличием коротких повторов. Почти все рекомбинационные обмены происходили в двух районах: размер одного из них 2,4 т.п.н., большая часть его расположена внутри гена *23S rRNA,* другой — размером 0,7 т.п.н. — находится в межгенном спейсере между генами *psbA* и *23S rRNA.* Интересно, что при трансформации хлоропластных ДНК встраивание чужеродного фрагмента также происходит в районе этих же горячих точек [Newman et al., 1992].

Заслуживает упоминания также факт, что в одном из экзонов гена *psbA* вблизи горячей точки находится консенсусная последовательность, аналогичная той, которая связывает фермент топоизомеразу 1 вируса коровьей оспы. Как было показано, данный фермент катализирует сайт-специфически асимметричную рекомбинацию ДНК у *E. coli* [Shuman, 1991]. Вероятно, эти совпадения не случайны, и механизмы рекомбинационных процессов могут быть сходны у разных систематических групп, хотя до настоящего времени полной картины происходящих в горячих точках рекомбинаций еще нет.

Возможной причиной горячих точек в хлоропластном геноме являются АТ-богатые области ДНК молекулы, которые также ассоциируются с рекомбинациями. Действительно, в богатом АТ-нуклеотидами пластоме *Chlamydomonas* (60% АТ) в горячих точках присутствуют поли(dAT)-тракты длиной 11 и более нуклеотидов, которые окружены также обогащенными АТ-нуклеотидами участками (91% АТ) [Newman et al., 1992]. Было показано, что область ниже *rbcl* гена у пшеницы является горячей точкой, насыщенной прямыми и инвертированными короткими повторами, к тому же АТ-богатой. В этом участке зафиксировано большое число структурных перестроек — делеций и инсерций [Ogihara et al., 1992]. Вероятно, участки хлоропластной ДНК, расположенные в горячих точках, чаще транслоцируются не только в другие области хпДНК, но и в другие геномы — ядерный и митохондриальный, хотя хлоропластных сегментов, находящихся в горячих точках, в ядерном геноме пшеницы обнаружить пока не удалось [Ogihara et al., 1992].

Ряд моделей ДНК-рекомбинаций, созданных на основе изучения других генетических систем, связывают горячие точки с сайтами начала репликации ДНК молекул [Yap, Kreuser, 1991]; со специализированными ДНК-структурами, например, poly d(TG·AC), индуцированными Z-ДНК [Treco, Arnheim, 1986]; с предпочтительным взаимодействием этих участков с рекомбинационными ферментами RecA [McCarthy et al., 1988], найденными в хлоропластах не только водорослей, но и высших растений [Cerutti et al., 1992].

Митохондриальная ДНК. В митохондриальных геномах самых разных организмов, начиная от дрожжей (мутанты *petite*) и кончая высшими эукариотами, в том числе человеком, обнаруживаются крупные делеции [Dujon, Belcour, 1989; Sainsard-Chanet et al., 1998; Larsson, Clayton, 1995, см. литературу к главам 5 и 6]. У облигатных аэробов эти митохондриальные мутации могут поддерживаться лишь в гетероплазматическом состоянии. Накопление этих мутаций является, вероятно, причиной возникновения самых разных болезней у человека и будет подробно рассмотрено в главе 14.

Молекулярные механизмы, вызывающие эти делеции, неясны, также непонятно, почему происходит избирательная амплификация мутантных молекул. Однако горячие точки при возникновении этих делеций связывают, как и для хлоропластной ДНК, с повторами в митохондриальном геноме.

Прямой повтор длиной 13 п.н. причинно связан с возникновением крупной (5 т.п.н.) делеции в митохондриальной ДНК человека, что будет подробно обсуждаться в главе 14. Обращает на себя внимание наличие в этом участке наряду с прямыми повторами также АТ-кластера (рис. 9.3). В митохондриальном геноме человека обнаружено еще 3 пары прямых повторов длиной 13 нуклеотидов, 1 прямой повтор длиной 15 нуклеотидов, 16 пар прямых повторов длиной 12 нуклеотидов, 58 пар прямых повторов длиной 11 нуклеотидов, 253 пары прямых повторов длиной 10 нуклеотидов — все эти цифры необычно высоки для генома размером 16,5 т.п.н. Интересно отметить, что три из четырех 13-нуклеотидных повторов не связаны ни с какими крупными делециями. Расположение 15-нуклеотидного повтора между D-петлей и точкой начала репликации легкой цепи позволяет предсказывать неспособность таких мутаций, если они и возникают, к размножению [Schon et al., 1989].

Прямые повторы, несомненно, связаны также с возникновением микроделеций в митохондриальном геноме человека (глава 14) [Schon et al., 1989].

Митохондриальные рекомбинации, хорошо известные у делеционных мутантов дрожжей *rho⁻ petite*, также оказываются часто, хотя и не всегда, связанными с повторяющимися последовательностями — ГЦ-кластерами [Foury, Kolodynski, 1983; Weiller et al., 1991]. Так, двунитчатые разрывы были обнаружены в районах 5′- и 3′-ГЦ-кластеров гена *var1* мутантов дрожжей, а, как известно, такие разрывы приводят к значительному повышению частоты гомологичных рекомбинаций [Zinn et al., 1988].

Сходный тип делеций, связанных с повторами, обнаружен также в митохондриальном геноме мутантов *stp* (stopper) *Neurospora* [Almasan, Mishra, 1991].

В случае крупных делеций мтДНК у штаммов гриба *Podospora anserina*, несущих ядерную мутацию *AS1-4*, показано участие в возникновении этих аномалий двух различных механизмов. Один связан с неточной рекомбина-

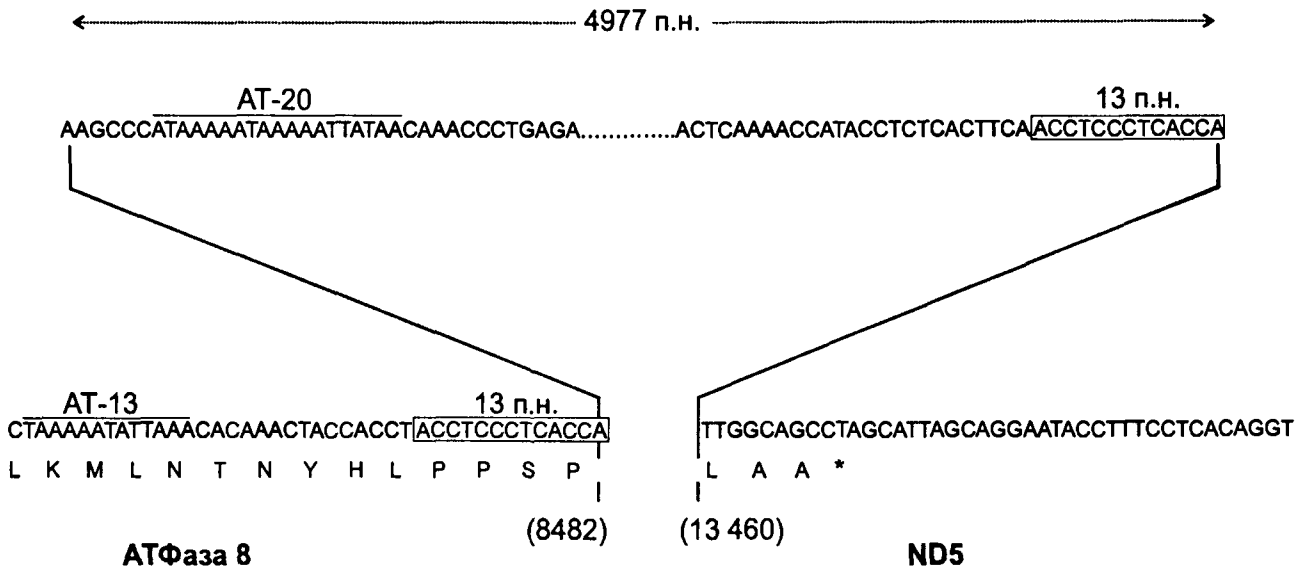


Рис. 9.3. Последовательность мтДНК человека в районе делеции (от 5′- к 3′-концу L-цепочки). Внизу — последовательность генома с делецией, вверху — делетированного участка. В рамках — последовательности 13-членных повторов, подчеркнуты два АТ-богатых участка, фланкирующие левый повтор. Под ДНК указана аминокислотная последовательность. Сокращения: A, Ala; H, His; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; S, Ser; T, Thr; Y, Tyr [Schon et al., 1989]. *Терминирующий кодон

цией, другой — с транспозонными свойствами интрона α, принадлежащего к интронам группы II (см. главы 3, 5). Вероятно, оба этих механизма используют двунитчатые разрывы, которые образуются вблизи 5′-области интрона α [Sellem et al.,1993; Sainsard-Chanet et al., 1998, см. литературу к главе 5].

Роль малых повторов в реорганизации митохондриальных геномов растений обсуждалась в главе 4. Дополнительные доказательства получены при изучении рекомбинаций митохондриального генома риса [Nakazono et al., 1995]. В табл. 9.2 приведены некоторые сведения о локализации и размерах малых повторов, вызывающих рекомбинационные изменения митохондриальных ДНК покрытосеменных растений.

Происхождение малых повторов и возможность обратной транскрипции в органеллах

Универсальная роль малых повторов в структурных преобразованиях органельных ДНК ставит вопрос о происхождении этих повторов. Высказано предположение, что некоторые из малых повторов митохондриального генома образовались при процессинге нефункциональной части транскриптов. При процессинге, как известно, осуществляются эндонуклеазное расщепление молекул — предшественников матричных РНК, сплайсинг интронов и расщепление дицистронных транскриптов на зрелые мРНК. Вероятно, при этом может происходить обратная транскрипция некоторых

Таблица 9.2

Малые повторы, связанные с рекомбинациями в митохондриальной ДНК растений [по Andre et al., 1992]

Организм (род)	Ген /последовательность	Размер повтора, п.н.
Zea	ЦМС-Т ревертанты	127 58
	NCS 3 мутант	12
	NCS 5-мутант	6
	Терминальные повторы плазмид S1 и S2	186
	RU N-дупликация (два повтора)	181 241
Brassica	*B. campestris*, *B. oleracea* (четыре повтора)*	100—450
	Atp6 ген редиса *ogura*	118 249
	Atp1 ген редиса *ogura*	689
	CoxI сублимон редиса *ogura*	689
Triticum	тРНК^{pro}-генная дупликация (несколько повторов)	7—188
Oryza	*urf-rmc* ген (химерный *Atp6*)	7
Helianthus	*Atp1* ген из ЦМС	262

* Представлены точки реорганизации между двумя видами *Brassica*, в то время как во всех остальных случаях — внутривидовые перестройки. Все данные виды наследуют мтДНК по материнской линии. ЦМС — цитоплазматическая мужская стерильность.

высвобождающихся при процессинге РНК-фрагментов с последующим встраиванием их в различные места митохондриального генома [Andre et al., 1992]. Так, некоторые из наиболее распространенных малых повторов, найденные в митохондриальных ДНК растений, включают межгенные последовательности котранскрибируемых генов, таких, как *atp9/rps13, rps13/nd1,* транскрибируемый участок гена *26S,* находящийся непосредственно перед 5′-процессинг-сайтом. Эти РНК-фрагменты образуются в большом числе копий и предположительно являются субстратами для образования малых повторов [Andre et al., 1992]. Интересно, что такая же последовательность, как между генами *atp9* и *rps13* табака, найдена в виде повтора в митохондриальном геноме *ogura* редиса, та же последовательность восемь раз повторена в митохондриальной ДНК *Petunia*, по крайней мере четырежды — у самого табака и не менее трех раз — у *Oenothera* [Schuster et al., 1987; Andre et al., 1992]. 5′ 26S-повтор представлен многими независимыми инсерциями данной последовательности или части ее (длиной от 25 до 75 нуклеотидов) в другие участки митохондриальных геномов разных культур. Были секве-

нированы пять вставок 5′ 26S из разных видов, в каждом случае они фланкированы коротким прямым повтором из 7—10 п.н. [Andre et al., 1992].

Эти вставки представляют собой, по мнению авторов гипотезы о происхождении коротких повторов, результат встраивания обратно в геном фрагментов, образовавшихся после процессинга пре-мРНК молекул. Эти высвободившиеся РНК-фрагменты путем обратной транскрипции [Gualberto et al., 1988] вновь оказываются в мтДНК, причем в нескольких копиях [Andre et al., 1992].

Известны факты, позволяющие предполагать наличие гена обратной транскриптазы в митохондриях по крайней мере некоторых растений. мтДНК *Oenothera* содержит последовательность, гомологичную генам обратной транскриптазы, такой последовательности, однако, не найдено в других митохондриальных геномах; возможно, она была перенесена в митохондрии из ядра [Andre et al., 1992]. Присутствующая у бобов в интроне гена *Nad1* открытая рамка считывания *mat-r* (см. главу 4) имеет гомологию с генами обратной транскриптазы; это же справедливо для гена *ORF2*, обнаруженного в линейных плазмидах S1 и S2 кукурузы [Andre et al., 1992]. Хотя ни в одном из этих случаев не был обнаружен собственно фермент, катализирующий обратную транскрипцию *in vivo*, ряд фактов свидетельствуют в пользу этого процесса в митохондриях. В частности, обратная транскриптаза, связанная с репликацией двух линейных РНК-плазмид (pFOXC2 и pFOXC3), была недавно обнаружена в митохондриях патогенных грибов *F. oxysporum* [Walther, Kennell, 1999].

Индуцированные мутации органельных геномов

После того как в 1927 г. Мюллер впервые индуцировал мутации с помощью ионизирующей радиации, искусственное изменение наследственного материала стало одним из основных приемов в генетике растений, животных и микроорганизмов.

Индуцирование органельных мутаций, как и мутаций ядерного генома, преследовало две основные цели:

— понять, как устроены и как экспрессируются органельные геномы;

— попытаться с помощью индуцированных мутаций решить ряд прагматических задач (повышение урожайности, устойчивости к неблагоприятным факторам среды, синтез определенных необходимых человеку веществ и т.д.).

Подходы, применявшиеся при индуцировании пластидных и митохондриальных мутаций у разных групп организмов, обобщены ранее [Hagemann, 1982; Давыденко, 1984; Белецкий, 1989]; в данной работе мы изложим некоторые результаты, полученные при анализе органельных мутаций.

Индукция органельных мутаций химическими мутагенами

Для искусственного получения внеядерных мутантов испытывались различные химические мутагены, однако довольно быстро от большинства из них пришлось отказаться в силу малой эффективности и отсутствия специфичности [Maly, 1958; Michaelis, 1958; Röbbelen, 1962; Arnold, 1967]. Успешно проявили себя в качестве специфических цитоплазматических мутагенов интеркалирующие в ДНК флуоресцентные красители — бромистый этидий и производные акридинового ряда [Avers et al., 1965; Slonimsky et al., 1968; Давыденко, 1984]. Значительное количество органельных мутаций удалось индуцировать у дрожжей с помощью антибиотиков [Carnevalli, 1971], а у *Chlamydomonas*, помимо антибиотиков, воздействием аналога тимидина 5-флуородезоксиуридина [Wurtz et al., 1979].

Однако из всех испытанных мутагенов наиболее эффективными оказались нитрозосоединения и особенно N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ) и N-нитрозо-N-этилмочевина (НЭМ). Наряду с индукцией митохондриальных мутантов дрожжей и нейроспоры почти одновременно появились публикации, сообщавшие об успешном получении с помощью НММ внеядерных мутаций *chlorina* у подсолнечника [Белецкий и др., 1969; Разорителева и др., 1970] и мутаций мтДНК у крыс [Wunderlich, 1970] (табл. 9.3).

Молекулярный механизм действия нитрозосоединений мочевины (НЭМ и НММ) состоит в следующем (рис. 9.4):

— в щелочном растворе НММ легко деградирует в диазометан;

— в кислой среде диазометан выщепляет ион карбениума;

— ион карбениума вызывает метилирование ДНК.

Основными сайтами алкилирования являются N7 и O6 позиции гуанидина. Кроме того, алкилируются N1 и N3 позиции аденина и N1 цитозина, хотя эти сайты атакуются гораздо реже, чем гуанидиновые [Hagemann, 1982; Beranek, 1990].

Локализация органельных мутаций chlorina у подсолнечника

У подсолнечника при обработке семян НММ был индуцирован целый ряд мутантов *chlorina*, желто-зеленая окраска листьев которых наследовалась по материнской линии; созданная коллекция [Белецкий, 1989] является уникальным материалом для картирования мутаций *en:chlorina*. Исследования ультраструктуры и показателей фотосинтетической активности пластид у ряда мутантов *en:chlorina* выявили некоторые изменения, позволившие предполагать пластидную локализацию мутации [Турищева и др., 1987].

Таблица 9.3

Примеры цитоплазматических мутаций, индуцированных с помощью различных химических мутагенов у грибов, растений и животных, а также в культуре клеток

Химический мутаген	Объект	Индуцированная мутация	Источник
N-метил- N-нитрозоуретан	*S. cerevisiae*	Дыхательная недостаточность	Schwaier et al. //Mol.Gen. Gen.1968. Vol. 102. P. 290
1-нитрозо-имидазолидон-2	*S. cerevisiae*	Дыхательная недостаточность	Schwaier //Arsneimittel Forsch. 1969. Bd. 19. S. 1050
4-нитрохинолин-1-оксид и его производные	*S. cerevisiae*	Дыхательная недостаточность	Mifuchi et al. //Jap. J. Microbiol. 1963. Vol. 7. P. 69; Nagai //Mutat. Res. 1969. Vol. 7. P. 333
N-метил-N′- нитро-N-нитрозо-гуанидин	*S. cerevisiae* *N. crassa* *Chlamydomonas* *Mimulus*	Дыхательная недостаточность *stp* мутация — нарушение развития Антибиотикорезистентность и антибиотикозависимость Нарушение пластидной ультраструктуры	Nordström // J. Gen. Microbiol. 1967. Vol. 48. P. 277; Bertrand et al. // Genetics. 1968. Vol. 60. P. 161; Gillham //Genetics. 1965. Vol. 52. P. 529; Travis et al. // Theor. Appl. Gen. 1975. Vol. 46. P. 67
5-флуоро-дезокси-уридин	*Chlamydomonas*	Уменьшение числа молекул хпДНК на клетку, различные пластидные мутации	Wurtz et al. //Curr. Genet. 1977. Vol. 74. P. 4552—4556; Wurtz et al. //Mol. Gen. Gen. 1979. Vol. 170. P. 235—242; Rochaix et al. // EMBO J. 1989. Vol. 8. P. 1013—1021
5-бромдезокси-уридин	*Ageratum*	Желто-зеленая крапчатость	Zamecnik et al. // Exp. Cell Res. 1966. Vol. 45. P. 218—229
Этилметан-сульфонат	*Arabidopsis* *Nicotiana*	Пластомные мутанты	Röbbelen // Sympos. Arabidopsis Res. I.1965. P. 100—105; Dulieu // Mut. Res. 1967. Vol. 4. P. 177—189

Продолжение табл. 9.3

Химический мутаген	Объект	Индуцированная мутация	Источник
N-нитрозо-N-метилмочевина	*Helianthus annuus Saintpaulia ionantha Antirrhinum majus*	*en: chlorina* — желто-зеленая окраска листьев	Белецкий и др. // Докл. АН СССР. 1969. Т.186. С. 1425; Pollheim // Biol. Zbl. 1974. Bd. 93. S. 141; Hagemann et al. // Int. Congr. Genet. Moscow, 1978. Abstr. Part I. P. 426
	Lycopersicon	Хлорофилл-дефектность	Hagemann et al. // Int. Congr. Genet. Moscow, 1978. Abstr. Part I. P. 426; Hosticka et al. // J. Heredity. 1984. Vol. 75. P. 242—246
	Крысы	Алкилирование мтДНК	Wunderlich et al. // Biochem. J. 1970. Vol. 118. P. 99
N-нитрозо-N-этилмочевина	*Antirrhinum N. tabacum* (каллусы *in vitro*)	Хлорофилл-дефектность	Hagemann et al. // Int. Congr. Genet. Moscow, 1978. Abstr. Part I. P. 426; Svab, Maliga // Theor. Appl. Gen. 1986. Vol. 72. P. 637

Была предпринята попытка картирования мутаций *en:chlorina* с применением сравнительного анализа спектров рестрикции пластидных и митохондриальных ДНК 11 мутантных линий *chlorina*. Несмотря на использование 13 различных эндонуклеаз, не удалось обнаружить никаких изменений в спектрах митохондриальных ДНК ни одной из одиннадцати мутантных линий *en:chlorina* [Трибуш и др., 1998; Triboush et al., 1999]. Это дает основание полагать, что никаких значительных структурных изменений в митохондриальной ДНК линий *chlorina* не произошло. Правда, нельзя исключать возможность точечных мутаций митохондриальной ДНК, которые остаются за пределами разрешающей способности использованного метода в том случае, если эти изменения не затрагивают рестриктный сайт.

Анализ спектров рестрикции хлоропластных ДНК выявил изменения у трех мутантов по сравнению с исходной линией 3629 (рис. 9.5). Интересно,

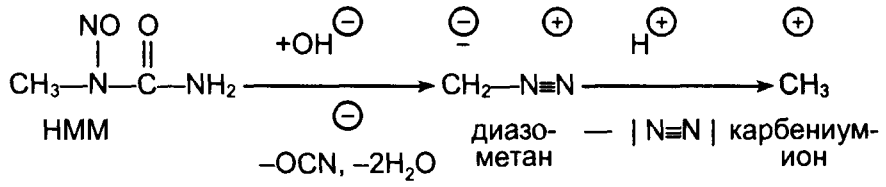


Рис. 9.4. Молекулярный механизм превращения нитрозометилмочевины с образованием иона карбениума, который вызывает метилирование ДНК. Нитрозоэтилмочевина действует аналогичным образом [по Hagemann, 1982]

что у всех трех мутантных линий происходит аналогичная структурная перестройка: появляется новый сайт рестрикции, который мог возникнуть при делеции или инсерции небольшого фрагмента либо при точечной мутации, поскольку суммарный размер двух появляющихся фрагментов приблизительно равен исчезнувшему. Более того, у двух мутантных линий — *en:chl2* и *en:chl7* эта реорганизация происходит с одним и тем же фрагментом HindIII (8,9 т.п.н.), что позволяет говорить о существовании горячей точки в данном сайте хлоропластного генома.

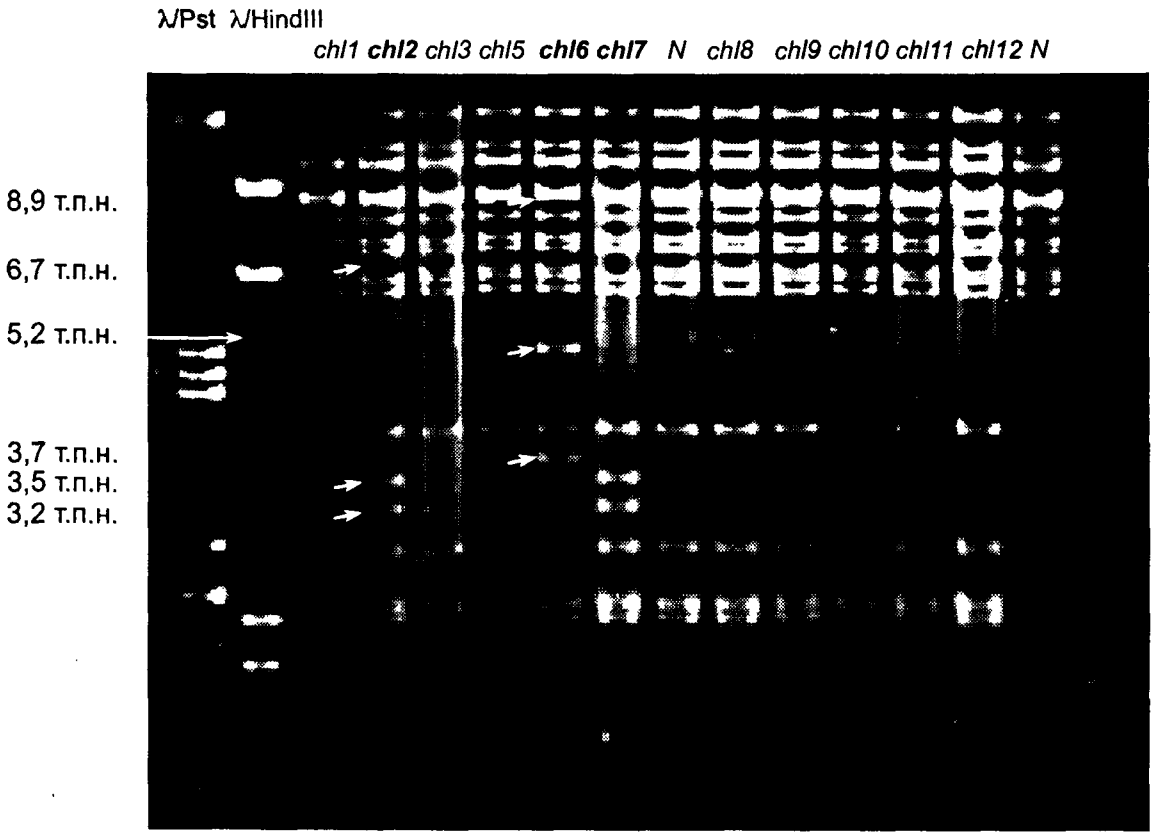


Рис. 9.5. Реорганизация хлоропластной ДНК у мутантов подсолнечника, индуцированных нитрозометилмочевиной (по данным рестриктного анализа с эндонуклеазой HindIII). N— исходная немутантная линия, *chl1* — *chl12* — мутантные линии. Выделены линии с измененными спектрами рестрикции; стрелки указывают на новые или исчезнувшие фрагменты, слева — их размеры

Оба фрагмента HindIII (8,9 и 6,7 т.п.н.) находятся на концах SC-районов (см. главу 2), которые, согласно ряду исследований, являются горячими точками пластома [Tassopulu, Kung, 1984; Hipkins et al., 1995]. Клонирование и секвенирование измененного участка позволит не только картировать мутацию, но и связать наблюдаемые фенотипические аномалии с конкретными генами пластид. Следует подчеркнуть, что в данном случае сходный фенотипический эффект — желто-зеленую окраску листьев — вызывают мутации, локализованные в разных местах хлоропластного генома.

Использованный в данной работе метод рестриктного анализа оказался недостаточно эффективным для локализации мутаций в остальных линиях *en:chlorina.* Неудачно закончились попытки использовать данный метод для локализации мутаций табака [Svab, Maliga, 1986], люцерны [Lee et al., 1989] и энотеры [Johnson et al., 1990]. Стало очевидным, что для обнаружения многих пластомных мутаций необходимо использовать более высокоразрешающие методы анализа.

Идентификация первичных изменений в органельных ДНК при точечных мутациях

За столетие, прошедшее с момента описания пестролистности, огромное количество органельных мутаций было обнаружено в природе и индуцировано искусственно разными методами. Однако для идентификации измененных сайтов были необходимы методы анализа первичной структуры ДНК, которые удалось разработать лишь в концу XX в.

В предмолекулярную эру хлоропластные мутанты были картированы лишь на одном объекте (*Chlamydomonas*), а митохондриальные — только на *Saccharomyces;* произошло это благодаря уникальным особенностям данных объектов. Никому не удавалось картировать органельные мутанты ни у многоклеточных растений, ни у животных. С появлением молекулярных методов исследований стало возможным не только картировать мутантные гены, но и понять природу этих мутационных измений, а в силу этого и функциональную роль индивидуальных генов органелл. Естественно, что без данных, добытых при формально-генетическом подходе, а также на основе биохимических и физиологических исследований, перейти к молекулярному исследованию мутаций также было бы невозможно.

Впервые секвенировать мутантный ген пластидной ДНК удалось при анализе мутанта *Chlamydomonas.* Согласно предварительным исследованиям, данный мутант обладал измененной структурой и активностью большой субъединицы РДФК. Естественно возникло предположение, что мутация

локализуется в структурном гене *rbcL*, который уже был локализован на физической карте. Была определена полная нуклеотидная последовательность всех активных доменов гена *rbcL* у мутанта 10-6С и у нормальной водоросли (2/3 всего гена). При их сравнительном анализе обнаружена одна нуклеотидная замена в положении 515 транслируемой последовательности, приводящая к транзиции G—C на A—T и соответственно к аминокислотной замене Gly — Asp [Dron et al., 1983]. Данная аминокислотная замена (171) расположена около лизинового остатка (175), который выполняет важную каталитическую роль. Весь промежуток между 166-м и 219-м аминокислотными остатками является самой консервативной частью большой субъединицы РДФК (рис. 9.6), не содержащей ни одной отрицательно заряженной аминокислоты. Белок 10-6С мутанта с отрицательно заряженным Asp значительно изменяет ионную ситуацию, что нарушает его связывание с субстратом. Таким образом, удалось не только найти мутантный сайт, но и идентифицировать нуклеотидную замену в конкретном гене с изменением функции кодируемого им белка и фенотипическим эффектом на уровне целого организма [Dron et al., 1983].

Успешно картировать две пластидные мутации у *Chlamydomonas* удалось при секвенировании гена *psbC*, белковый продукт которого P6 (полипептид 43 кД) не выявлялся у мутантов. Одна мутация (MA16) представляла собой дупликацию шести пар нуклеотидов в середине гена *psbC*, что приводило к

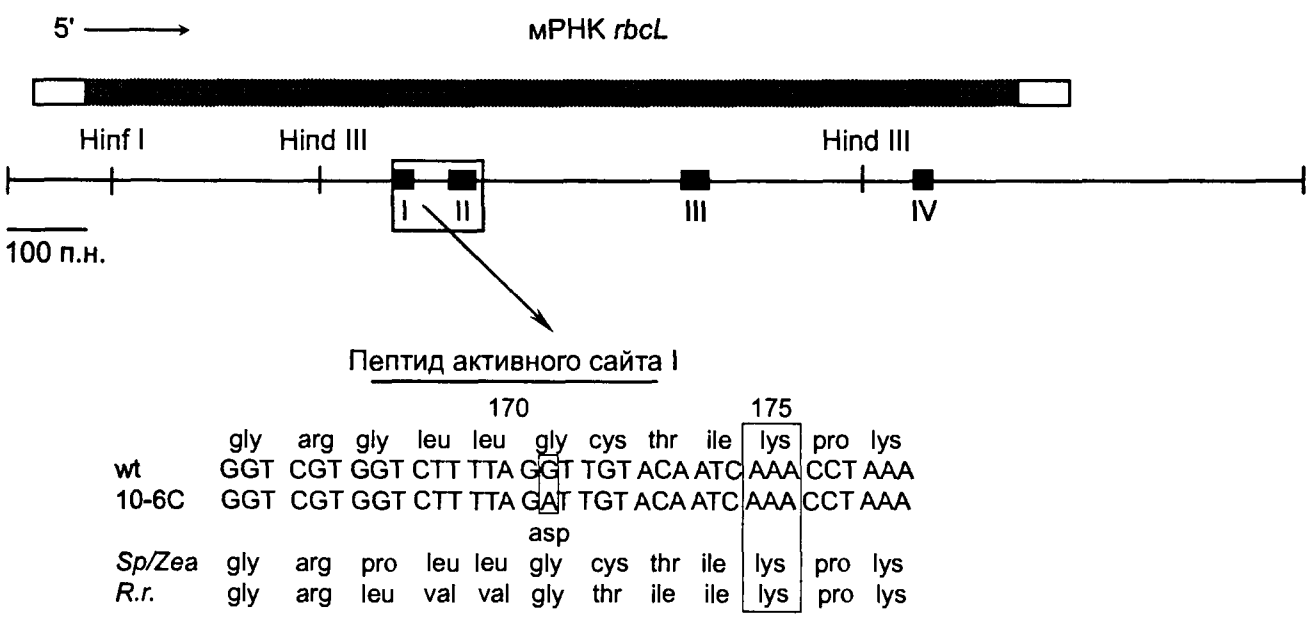


Рис. 9.6. Рестриктная карта и нуклеотидная последовательность фрагмента *rbcL* гена у *Chlamydomonas* дикого типа (wt) и мутанта 10-6С. Нетранслируемые участки на концах мРНК окрашены белым. Районы I, III и IV соответствуют активным сайтам фермента, район II — CO_2-активатору. В рамку взят наиболее эволюционно консервативный домен *rbcL* гена. Внизу — нуклеотидная и аминокислотные последовательности фрагмента *rbcL* гена *Chlamydomonas* с мутировавшим сайтом, а также шпината, кукурузы (*Sp/Zea*) и фотосинтезирующей бактерии *Rhodospirillum rubrum* (*R.r.*) [по Dron et al., 1983]

нарушению одного из трансмембранных доменов и резкой дестабилизации белка P6. В другом случае (FuD34) мутировала некодирующая область *psbC* гена: произошла инсерция двух нуклеотидов (TT) и выпадение одного (C) (рис. 9.7). Предположительно, этот участок гена ответственен за связывание ядерного фактора, активирующего трансляцию пластидного гена; мутация в данном районе приводит к нарушению этого взаимодействия и к отсутствию трансляции P6. Значительный интерес представляет то, что супрессорная мутация F34suI локализуется в той же области и состоит в T—A-замене, которая, по всей вероятности, восстанавливает связывание ядерного фактора активации транскрипции [Rochaix et al., 1989].

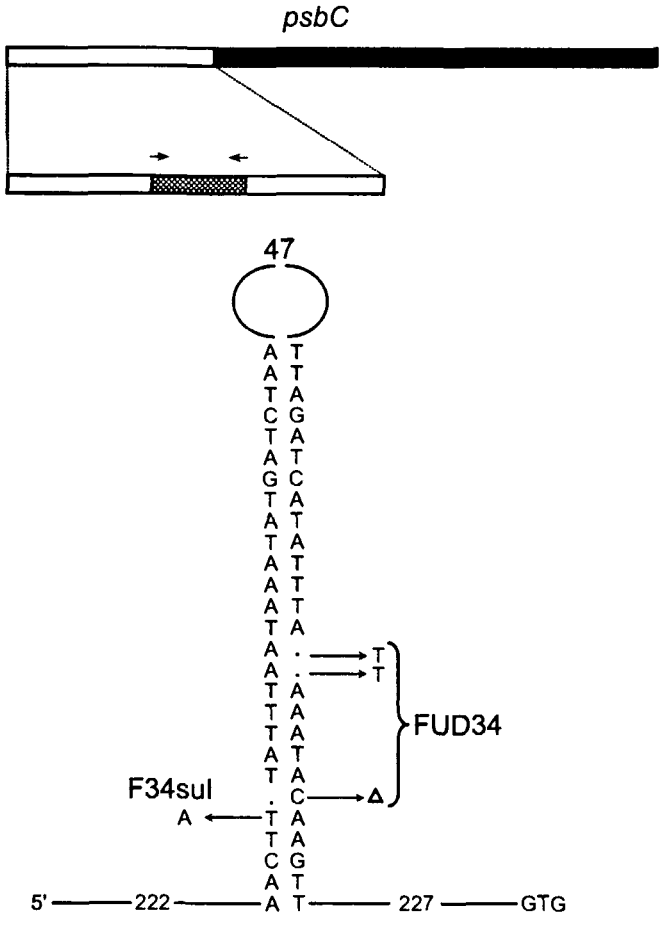


Рис. 9.7. Stem-область 5'-нетранслируемой части гена *psbC*, измененная у мутанта FUD34 и супрессорного мутанта F34suI *Chlamydomonas*. Указаны измененные нуклеотиды у обоих мутантов. Точки означают отсутствующие нуклеотиды, Δ — делецию. В верхней части рисунка стрелками обозначены два сегмента stem-области в нетранслируемой части (незаштрихованный прямоугольник) гена *psbC* [по Rochaix et al., 1989]

Мутации резистентности к атразину и аналогичным гербицидам были идентифицированы как точечные замены нуклеотидов, приводящие к миссенс-мутациям (missense) гена *psbA*. При анализе аминокислотной последовательности кодируемого данным геном белка D1 у различных высших растений были обнаружены замены, чаще всего в 264-м аминокислотном остатке типа Ser Gly, приводящие к мутации гербицидоустойчивости [Hagemann, 1992].

Делеция пяти нуклеотидов, приводящая к нарушению трансляции большой субъединицы РДФК, была выявлена на основе анализа белка — про-

дукта *rbcL* гена у спонтанного мутанта энотеры "I sigma". У данного мутанта синтезировался белок размером 30 кД вместо нормального — 53 кД. Обнаруженная делеция в районе 270—271 аминокислот приводит к сдвигу рамки, возникает стоп-кодон, в результате чего трансляция прерывается преждевременно, а мутантный белок имеет размер всего 30 кД [Hildebrandt et al., 1984].

Новый высокоразрешающий метод анализа ДНК — SSCP (single-strand conformational polymorphism) был разработан и применен первоначально к картированию точечных мутаций ядерной ДНК у человека. Метод основан на том, что конформация одноцепочечной ДНК в неденатурирующих условиях может меняться даже при замене одного нуклеотида в цепочке. Такая измененная ДНК обладает иной электрофоретической подвижностью и может быть выделена в неденатурирующих полиакриламидных гелях [Orita et al., 1989]. Оптимальный размер фрагментов для выявления нуклеотидных замен с использованием данного метода примерно 150 п.н. [Sheffield et al., 1993].

SSCP-анализ был использован для локализации мутации в рибосомах пластид — обнаружены различия в мутантном 16S рРНК-локусе стрептомициноустойчивого мутанта *Nicotiana plumbaginifolia* [To et al., 1993]. Стратегия применения данного метода состоит в том, что предварительно с помощью физиологических и/или биохимических подходов определяется предполагаемый ген или группа генов, в которых произошла мутация, после чего применяется метод ПЦР — SSCP-анализа их ДНК. Так была картирована пластомная мутация *en:alba-1* у *Antirrhinum* [Scaffner et al., 1995].

Точечную мутацию одного из важнейших генов фотосинтеза —*psaB* — в пластоме высших растений удалось картировать в результате последовательного перехода от анализа изменений первичных фотосинтетических реакций к SSCP-анализу. Мутант *en:alba-1* возник спонтанно в 1953 г. в коллекции растений *Antirrhinum* в лаборатории W. Stubbe [Scaffner et al., 1995]. Изучение спектров флуоресценции хлорофилла при различных температурах, спектра поглощения реакционного центра фотосистемы I — Chl P_{700} и анализ белков тилакоидных мембран у этого мутанта позволили установить, что первичный дефект фотосинтетических реакций находится в комплексе фотосистемы I, а именно в каком-то из трех генов: *psaA, psaB* или *psaC*. Применив модифицированную методику ПЦР—SSCP-анализа, авторы обнаружили изменение подвижности однонитчатой ДНК одного из рестриктных фрагментов *HinfI* гена *psaB*. Секвенирование этого фрагмента выявило точечную нуклеотидную замену в кодоне 136 гена *psaB:* TAT TAG, в результате которой возникает новый стоп-кодон с усеченным белком *psaB* [Scaffner et al., 1995].

Список мутантных митохондриальных генов, первичное повреждение в которых удалось локализовать, особенно обширен для митохондриального генома человека, что будет рассмотрено подробно в главе 14.

Мутации органельных геномов, индуцированные ядерными генами-мутаторами

Хлоропластные геномы, как уже обсуждалось, обладают довольно высокой стабильностью. Однако у разных видов растений описаны природные изоляты, в которых частота пластомных мутаций в сотни и даже тысячи раз превышает спонтанный уровень [Shumway, Bauman, 1967; Potrykus, 1970; Epp, 1973; Redei, 1973; Hershberger et al.,1974]. Причиной высокой мутабильности хлоропластного генома во всех этих случаях являлись рецессивные ядерные гены, названные генами-мутаторами: локус *pm* у *Oenothera* [Epp, 1973; Chiu et al., 1990], *chm (**ch**loroplast **m**utator)* у *Arabidopsis* [Redei, Plurad, 1973], *iojap* и *mutator* у кукурузы [Thompson et al., 1983], a^- у петунии [Potrykus, 1970]. Ядерный ген-мутатор ячменя вызывает большое количество хлорофильных мутаций, наследуемых по материнской линии [Prina et al., 1992].

Ядерные гены — мутаторы пластид, чаще всего именуемые *pm* (**p**lastid **m**utator) и наследуемые как рецессивные менделевские гены, способны с высокой частотой вызывать мутации дефекта структуры и функции пластид. Сами индуцированные пластидные мутации наследуются цитоплазматически: двуродительски (*Oenothera*) или однородительски (кукуруза и др.). Находясь в гомозиготном состоянии, гены-мутаторы вызывают дестабилизацию хлоропластного генома; возникшие пластидные мутации далее наследуются по материнскому типу и уже не зависят от генотипа ядра. Мутабильность ядерных генов у растений — носителей генов-мутаторов не повышается [Epp, 1973].

Механизм действия генов-мутаторов интенсивно изучается, однако многое до сих пор остается неясным. Так, у одиннадцати линий *Oenothera*, имеющих генотип *pm/pm*, обнаружены делеции в пяти регионах пластома. Все пять регионов перекрываются с "горячими точками" эволюционных реорганизаций пластома. Авторы поддерживают гипотезу, выдвинутую еще М.Epp [1973], о нарушении какого-то компонента системы репликации — репарации пластид, кодируемого ядром [Chiu et al., 1990]. Подтверждением нарушения системы ДНК-репарации под действием генов-мутаторов служат данные о синергизме действия этих генов и нитрозометилмочевины при индукции мутантов *Oenothera* [Sears, Sokalski, 1991].

У мутантов кукурузы, вызванных действием рецессивного гена *iojap*, в пластидах нет ни рибосом, ни высокомолекулярной РНК; при этом радикальных изменений в структуре пластидной ДНК не происходит [Walbot, Coe, 1979].

Применение ПЦР- и SSCP-методов позволило более детально исследовать характер первичных повреждений, вызываемых геном-мутатором *pm*. Нарушения структуры пластидной ДНК затрагивали короткие прямые повторы, олиго(А)-последовательности некодирующих районов, точечные мутации гена *psbB*: инсерцию размером 4 нуклеотида, G — A-замену и другие перестройки. Делеции, происходящие вблизи прямых повторов, могут иметь длину как несколько десятков, так и несколько сотен нуклеотидов (табл. 9.4) [Chang et al., 1996].

Таблица 9.4

Индуцированные генами-мутаторами *pm* изменения в пластидной ДНК *pm*-линий *Oenothera* [по Chang et al., 1996]

Линии *Oenothera*	*orf2280**	Спейсеры между генами			
		trnG-trnR	*rpl16-rps8*	*16S rRNA-trnI*	*rpl14-rpl16***
Дюссельдорф	330 п.н.	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	789 п.н.	$[A]_{13}$
Cornell-1	**260 п.н.**	$\mathbf{[15\text{ п.н.}]_2}$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 и △260 п.н.**	$[A]_{13}$
Cornell-2	**210 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$\mathbf{[29\text{ п.н.}]_1}$	**△605 п.н.**	$\mathbf{[A]_{14}}$
pm7	**210 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 п.н.**	$[A]_{13}$
pm7ss	**210 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 п.н.**	$[A]_{13}$
pm8	**210 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 п.н.**	$\mathbf{[A]_{14}}$
pm12	**210 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 п.н.**	$\mathbf{[A]_{14}}$
pm11	**260 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 и △260 п.н.**	$[A]_{13}$
pm32	**260 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 и △260 п.н.**	$\mathbf{[A]_{14}}$
pm35	**260 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 и △260 п.н.**	$[A]_{13}$
pm38	**260 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 и △260 п.н.**	$[A]_{13}$
pm43	**260 п.н.**	$[15\text{ п.н.}]_1$	$[29\text{ п.н.}]_2$	**△177 и △260 п.н.**	$[A]_{13}$

Примечание. В квадратных скобках дано количество копий различных повторов в межгенных спейсерах ; △ — делеции; *Дюссельдорф* — исходная зеленая линия дикого типа; *Cornell* — зеленая линия, из которой выделен *pm* аллель после ЭМС-обработки; за исключением индуцированных мутаций, идентична исходной линии *Дюссельдорф*. Жирным шрифтом отмечены изменения в пластидной ДНК, вызванные геном-мутатором.

* Размер ПЦР-амплифицированного сегмента из гена *orf2280*.

** Длина олиго(А)-участка.

Участие прямых повторов в *pm*-индуцируемых делециях и дупликациях свидетельствует о так называемом процессе репликационного проскальзывания (replication slippage) у данных мутантов. Модель репликационного проскальзывания была предложена для объяснения возникновения делеций/репликаций у прокариот [Albertini et al., 1982]. Согласно этой модели, при расплетании ДНК в репликационной вилке нереплицированная и неспаренная цепочка может физически проскальзывать, изменяя взаиморасположение нитей. Проскальзывание матричной цепи приведет к делециям, проскальзывание дочерней — к дупликациям. Короткие прямые повторы облегчают неправильное спаривание цепочек. Предпочтительными субстратами для проскальзывания являются также АТ-богатые участки и места с простыми повторами [Albertini et al., 1982; Levinson, Gutman, 1987].

Следует подчеркнуть, однако, что типы *pm*-индуцируемых мутаций более разнообразны по сравнению с выявленными в ранних исследованиях и включают в том числе точечные мутации. Предполагается, что *pm*-гомозиготы лишены какого-то полипептида, участвующего в метаболизме хпДНК, также остаются в силе гипотезы о нарушении ДНК-репарации в пластидах [Schang et al., 1996]. Альтернативными являются предположения о хеликазе как возможном продукте *pm* гена [Lahaye et al., 1991], а также о белке SSB (**s**ingle-**s**tranded DNA **b**inding), который стабилизирует одноцепочечную ДНК во время репликации и репарации [Van Dyck et al., 1992]. Фактически отсутствие хеликазы или SSB белка должно приводить к нарушению функционирования репликационного комплекса и вызывать ошибки репликации либо воздействовать на контрольную функцию (proof-reading) ДНК-полимеразы. Наконец, возможно, у *pm/pm* гомозигот отсутствует или изменена 3′ → 5′-экзонуклеазная субъединица ДНК-полимеразы [Chang et al., 1996].

Интересно, что другой ядерный ген-мутатор пластид — *chm* у *Arabidopsis* — вызывает наследственные изменения не только в пластидах (пестролистность) [Redei, Plurad, 1973; Mourad, White, 1992], но и в митохондриях [Martinez-Zapater et al., 1992].

Для изучения *chm*-индуцированных нарушений митохондриальной ДНК среди потомков гибридов между мутантами *chm*, опыленными растениями дикого типа, отбирали экземпляры с нормальной окраской листьев, но аномальной формой и замедленным ростом. Фертильные особи таких мутантных гибридов вновь опыляли пыльцой дикого типа; растения, имеющие в BC_1 измененные по форме листья, назвали MDL (**m**aternally **d**istorted **l**eaf) [Sakamoto et al., 1996]. У MDL-растений электронномикроскопически выявлена значительная часть аномальных митохондрий; при анализе мтДНК обнаружены реорганизации двух фрагментов, связанных с генами *rps3-rpl16* (кодирующими рибосомальные белки S3 и L16). В результате этого про-

изошло разделение оперона *rps3-rpl16* и образование новой химерной конструкции *atp9-rpl16*. РНК-блоттинг выявил нарушение экспрессии этих генов в результате реорганизации мтДНК. При обсуждении механизма действия *chm* аллелей авторы на основании ПЦР-анализа пришли к предположению, что наблюдаемые аномальные митохондриальные фрагменты предсуществовали у растений дикого типа, а гены-мутаторы способствовали их амплификации и вытеснению нормальных молекул. Хотя точная роль *CHM* гена пока не установлена, возможно, что кодируемый им белок взаимодействует со специфическим сайтом мтДНК и обеспечивает репликацию основного кольца [Sakamoto et al., 1996].

Каковы бы ни были продукты, кодируемые разными генами-мутаторами у разных видов растений, обнаруженный феномен — еще одно свидетельство теснейшей взаимосвязи геномов ядра и органелл при формировании эукариотического организма.

Культивирование растений *in vitro* и мутации органельных ДНК

Гаплоидизация растительных геномов — один из приемов, применяющийся в селекционных программах для получения гомозиготных диплоидных растений. Культура пыльников широко используется для получения растений-гаплоидов. Однако у ряда видов, особенно у злаков, препятствием при использовании этого приема является высокий процент (иногда до 100%) альбиносных растений — регенерантов. Было установлено, что доля альбиносных растений в культуре пыльников пшеницы зависит от генотипа, физиологического состояния растений — доноров пыльников и условий культивирования, в частности от температуры [Bullock et al., 1982; Ouyang et al., 1983].

При исследовании альбиносных растений-регенерантов риса обнаружили, что у них отсутствуют 16S и 23S рРНК, а также рибулозобифосфаткарбоксилаза, чья большая субъединица, как известно, кодируется пластомом [Sun et al., 1979]. Анализ хлоропластных ДНК растений-альбиносов, регенерировавших из пыльников пшеницы, выявил огромные делеции, затрагивающие иногда до 80% пластидной ДНК. Большая часть изученных альбиносных растений содержала гетерогенные популяции молекул хпДНК, при этом обычно какой-то тип молекул доминировал. Так, у одного из альбиносных регенерантов основным типом молекул в пластоме были кольцевые молекулы размером 39 т.п.н. [Day, Ellis, 1984]. У альбиносных мутантов ячменя в белых пластидах обнаружены линейные молекулы хлоропластной

ДНК размером 21 т.п.н., имеющие шпилечную структуру. Были найдены мономеры и димеры таких молекул; очевидно, в данном случае произошла делеция в пластоме размером порядка 100 т.п.н. [Ellis, Day, 1986].

Наблюдаемые процессы привели к двум предположениям о причинах, вызывающих такие значительные делеции в пластидах растений-регенерантов:

1) этот феномен связан с условиями культивирования пыльников;

2) возможно, нормальный микроспорогенез включает в себя на поздних стадиях редуцирование цитоплазматических органелл.

Изменение органелл в генеративных клетках пыльников рассматривали как один из возможных механизмов материнского наследования пластид (см. главу 1) [Vaughn et al., 1980, см. литературу к главе 1]. Если измененные хлоропластные ДНК с аналогичными делециями будут найдены в клетках зрелой пыльцы растений, это будет свидетельствовать в пользу второго предположения. Однако, как известно, у ряда видов наблюдается двуродительское наследование органелл, поэтому предположение о дегенерации органелл в зрелой пыльце не может претендовать на универсальность.

Культивирование тканей *in vitro* может вызывать также реорганизации митохондриального генома у некоторых растений [McNay et al., 1984; Negruk et al., 1986; Shirzadegan et al., 1989; Hartmann et al., 1989; Rani et al., 2000]. Так, в культивируемой в течение двух лет клеточной культуре *Brassica campestris* митохондриальная ДНК сильно реорганизована, при этом потеряна линейная плазмида 11,3 т.п.н. [Shirzadegan, 1989]. Изменения аккумулируются с увеличением возраста культуры [McNay et al., 1984]. В клеточной культуре кукурузы с Т-типом ЦМС происходят изменения в митохондриальной ДНК (см. главу 11).

В каллусной культуре из незрелых зародышей пшеницы в митохондриальном геноме происходят изменения в основном в гипервариабельном районе между двумя рекомбинационными повторами. Как и в других случаях, изменения мтДНК в данной системе накапливаются с увеличением времени культивирования [Hartmann et al., 1987; Hartmann et al., 1989]. В культуре незрелых зародышей пшеницы отмечалась также полная потеря отдельных субгеномных колец [Rode et al., 1987].

Примечательно, что некоторые реорганизации митохондриального генома, которые связывают с условиями культуры *in vitro,* в незначительных количествах (1—5%) обнаруживаются *in vivo* в исходных растениях. Вероятно, в условиях культивирования эти субстехиометрические мтДНК получают селективное преимущество и избирательно амплифицируются [Shirzadegan, 1989].

Была обнаружена весьма интересная корреляция между типом реорганизации митохондриального генома и способностью культуры незрелых заро-

дышей к регенерации. В культуре "Aquila" и некоторых продолжительно культивируемых линиях *Chinese Spring,* неспособных к регенерации, отсутствуют или сильно редуцированы определенные рестриктные фрагменты мтДНК. В то же время в регенерирующих образцах *Chinese Spring* обнаружены новые фрагменты мтДНК, или некоторые существующие фрагменты сильно амплифицированы [Bonen, 1995, см. литературу к главе 4]. Генетический анализ показал, что как минимум два набора ядерных генов участвуют в контроле этого процесса. Предполагается, что если эффект ядерных генов прямой, то их доминантные аллели могут кодировать рекомбиназы, если же ядро каким-то образом регулирует количество субгеномных молекул в митохондриях, то эти ядерные гены могут контролировать репликазы [Hartmann et al., 1992].

Вместе с тем клеточные культуры *Petunia* сохраняют стабильную структуру своих митохондриальных ДНК на протяжении длительного времени [Hanson, Folkerts, 1992; Kool et al., 1985, см. литературу к главе 4]. Не найдены изменения в структуре мтДНК при длительном культивировании и у ряда других видов [Hanson, 1984; McNay, 1984], возможно, методы, применявшиеся для их обнаружения, обладали недостаточной разрешающей способностью.

* * *

Мы рассмотрели лишь незначительную часть имеющейся в настоящее время информации, посвященной изменчивости органельных геномов. Следует иметь в виду, что мутации, возникающие в ДНК хлоропластов и митохондрий, претерпевают долгий путь сегрегации на уровне органеллы, в которой они возникли, затем на уровне клетки и, наконец (для многоклеточных), на уровне целого организма. Часто отбор оказывается направленным против возникших мутантных молекул ДНК, и они элиминируются из клетки. Многие митохондриальные и хлоропластные мутации оказываются летальными, некоторые внеядерные мутанты удается искусственно поддерживать в лабораторных условиях, третьи сохраняются благодаря наличию немутантных органелл-аналогов в том же организме. Роль органельных мутаций в познании законов цитоплазматической генетики не менее важна, чем роль ядерных мутаций в генетике классической. Материал, изложенный в главах 11 и 14, позволит оценить роль этих цитоплазматических мутаций в медицине и в производстве гетерозисных гибридов растений.

Литература

Белецкий Ю.Д., Разорителева Е.К., Жданов Ю.А. Цитоплазматические мутации подсолнечника, индуцированные N-нитрозо-N-метилмочевиной // Докл. АН СССР. 1969. Т. 186. С. 1425—1426.

Белецкий Ю.Д. Искусственные мутации хлоропластов у высших растений. Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1989. 80 с.

Гаузе Г.Г. Митохондриальная ДНК. М.: Наука, 1977. 288 с.

Давыденко О.Г. Нехромосомные мутации. Минск: Наука и техника, 1984. 164 с.

Насыров Ю.С. Фотосинтез и генетика хлоропластов. М.: Наука, 1975. 144 с.

Палилова А.Н. Нехромосомная наследственность. Минск: Наука и техника, 1981. 184 с.

Разорителева Е.К., Белецкий Ю.Д., Жданов Ю.А. Генетическая природа мутаций подсолнечника, индуцированных N-нитрозо-N-метилмочевиной. II. Мутации *chlorina* // Генетика. 1970. Т.6, № 10. С. 43—48.

Рыжков В.Л. Сравнительное изучение менделирующей и неменделирующей пестролистности у *Petunia hybrida* // Сборник памяти акад. В.Н.Любименко. Киев: Изд-во АН УССР, 1938. С. 349—356.

Самсонова И.А. Исследование мутабильности пластома. I. Характеристика пластомного мутанта табака // Генетика. 1970. Т.6, № 6. С. 36—41.

Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. М.: Мир, 1975. 423 с.

Трибуш С.О., Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Локализация НММ-индуцированных повреждений органельной ДНК внеядерных мутантов подсолнечника типа *chlorina* // Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы междунар. конф. "Молекулярная генетика и биотехнология". Минск, 1998. С. 267—271.

Турищева М.С., Таран С.Ф., Белецкий Ю.Д. и др. Структура и функции хлоропластов у жизнеспособных пластомных мутантов подсолнечника // Физиология растений. 1987. Т. 34, № 6. С. 1097—1102.

Хагеман Р. Роль пластомных мутантов высших растений в изучении биогенеза хлоропластов // Вопросы общей генетики: Тр. XIV Междунар. генет. конгр. М., 1981. С. 389—398.

Albertini A.M., Hofer M., Calos M.P., Miller J.H. On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions // Cell. 1982. Vol. 29. P. 319—328.

Almasan A., Mishra N.C. Recombination by sequence repeats with formation of suppressive or residual mitochondrial DNA in *Neurospora* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1991. Vol. 88. P. 7684—7688.

Andre C., Levy A., Walbot V. Small repeated sequences and the structure of the plant mitochondrial genomes // Trends Genet. 1992. Vol. 8, No. 4. P. 128—132.

Arnold C.-G. Zur Plasmavererbung bei *Oenothera* // Ber. Dtsch. bot. Ges. 1967. Bd 80. S. 124—130.

Avers C.J., Pfefer C.R., Rancourt M.W. Acriflavine induction of different kinds of "petite" mitochondrial populations in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. 1965. Vol. 90, No. 2. P. 481—494.

Baur E. Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "varietates albomarginatae hort" von *Pelargonium zonale* // Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungsl. 1909. Bd 1. S. 330—351.

Beranek D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents // Mut. Res. 1990. Vol. 231. P. 11—30.

Bernardi G. The petite mutant in yeast // Trends Biochem. Sci. 1979. Vol. 4. P. 197—201.

Bertrand H., Collins R.A., Stohl L.L. et al. Deletion mutants of *Neurospora crassa* mitochondrial DNA and their relationship to the "stop-start" growth phenotype // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1980. Vol. 77. P. 6032—6036.

Börner T., Sears B. Plastome mutants // Plant Mol. Biol. Rep. 1986. Vol. 4. P. 69—92.

Bowman C.M., Dyer T.A. The location and possible evolutionary significance of small dispersed repeats in wheat ctDNA // Curr. Genet. 1986. Vol.10. P. 931—941.

Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Newman S.M. Organelle genetics and transformation of *Chlamydomonas* // Cell organelles. Advances in Plant Cell Res. Vienna: Springer-Verlag. 1992. Vol. 6. P. 3—64.

Bullock W.P., Baenziger P.S., Schaeffer G.W., Bottino P.J. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum L*) F1s and their reciprocal crosses // Theor. Appl. Gen. 1982. Vol. 62. P. 155—159.

Carnevalli F., Leoni L., Morpurgo G., Conti G. Induction of cytoplasmic "petite" mutation by antibacterial antibiotic // Mut. Res. 1971. Vol. 12, No. 4. P. 357—363.

Cerutti H., Osman H., Grandoni P., Jagendorf A.T. A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1992. Vol. 89. P. 8068—8072.

Chang T., Stoike L., Zarka D. et al. Characterization of primary lesions caused by plastome mutator of *Oenothera* // Curr. Genet. 1996. Vol. 30. P. 522—530.

Chiu W.-L., Johnson E.M., Kaplan S.A. et al. Oenothera chloroplast DNA polymorphism associated with *plastom mutator* activity // Mol. Gen. Gen. 1990. Vol. 221. P. 59—64.

Clegg M.T., Gaut B.S., Learn G.H., Morton B.R. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 6795—6801.

Cosner M.E., Jansen R.K., Palmer J.D., Downie S.R. The highly rearranged chloroplast genome of *Trachellium caeruleum* (Campanulaceae): multiple inversions, inverted repeat expansion and contraction, transposition, insertions/deletions, and several repeat families // Curr. Genet. 1997. Vol. 31. P. 419—429.

Cummings D.J., Belcour L., Grandchamp C. Mitochondrial DNA from *Podospora anserina.* II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures // Mol. Gen. Gen. 1979. Vol. 171. P. 239—250.

Day A., Ellis T.H.N. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts // Cell. 1984. Vol. 39. P. 359—368.

Dron M., Rahire M., Rochaix J.-D., Mets L. First DNA sequence of a chloroplast mutation: a missense alteration in the ribulosebisphosphate carboxylase large subunit gene // Plasmid. 1983. Vol. 9. P. 321—324.

Dujon B. Mitochondrial genetics and functions // The molecular biology of *Saccharomyces*, life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1981. P. 505—635.

Dujon B., Slonimski P.P., Weill L. Mitochondrial genetics. IX. A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1974. Vol. 78. P. 415—437.

Ellis T.H.N., Day A. A hairpin plastid genome in barley // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 2769—2774.

Epp M. Nuclear gene-induced plastome mutations in *Oenothera hookeri.* I. Genetic analysis // Genetics. 1973. Vol. 75. P. 465—483.

Foury F., Kolodynski J. pif mutation blocks recombination between mitochondrial c^+ and c^- genomes having tandemly arrayed repeat units in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1983. Vol. 80. P. 5345—5349.

Gaillard G., Francois S., Bernardi G. Excision sequences in the mitochondrion of yeast // Nature. 1980. Vol. 283. P. 218—220.

Gregory R.P. On variegation in *Primula sinensis* // Genetics. 1915. Vol. 4. P. 305.

Grun P. Cytoplasmic genetics and evolution // New York: Columbia University. Press, 1976. 436 p.

Gualberto J.M., Wintz H., Weil J.-H., Grienenberger J.-M. The genes coding for subunit 3 of NADH dehydrogenase and for ribosomal protein S12 are present in the wheat and maize mitochondrial genomes and are cotranscribed // Mol. Gen. Gen. 1988. Vol. 215. P. 118—127.

Hagemann R. Das Vorkommen von Mischzellen bei einer Gaterslebener Herkunft des Status albomaculatus von *Antirrhinum majus* L. // Kulturpflanze. 1960. Bd 8. S. 168—184.

Hagemann R. Genetics and molecular biology of plastids of higher plants // Stadler Genet. Symp. 1979. Vol. 11. P. 91—116.

Hagemann R. Plastid genetics in higher plants // Cell Organelles. Wien; New York: Springer-Verlag, 1992. P. 65—96.

Hagemann R. Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. I. Die Bedeutung von Plastommutanten und die genetischen Nomenklatur extranuclearer Mutationen // Biol. Zbl. 1971. Bd 90. S. 409—418.

Hagemann R. Induction of plastome mutations by nitroso-urea-compounds. Methods in chloroplasts molecular biology. Edelman ed. Elsevier Biomedical Press, 1982. P. 119—127.

Hagemann R., Hagemann M. Extranuclear Inheritance: Plastid Genetics // Progress in Botany. 1994. Vol. 55. P. 260—275.

Hagemann R., Scholz F. Ein Fall geninduzierter Mutationen des Plasmotypus bei Gerste // Der Züchter. 1962. Bd 32. S. 50—68.

Hanson M. R. Stability, variation and recombination in plant mitochondrial genomes via tissue culture and somatic hybridization // Oxford Surv. Plant Mol. Cell. Biol. 1984. Vol. 1. P. 33—52.

Hartmann C., De BuyserJ., Henry Y. et al. Time-course of mitochondrial genome variation in wheat embryogenic somatic tissue cultures // Plant Sci. 1987. Vol. 53. P. 191—198.

Hartmann C., Henry Y., De Buyser J. et al. Identification of new mitochondrial genome organization in wheat plants regenerated from somatic tissue cultures // Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 77. P. 169—175.

Hartmann C., De Buyser J., Henry Y. et al. Nuclear genes control changes in the organization of the mitochondrial genome in tissue cultures derived from immature embryos of wheat // Curr. Genet. 1992. Vol. 21. P. 515—520.

Herrmann R., Börner T., Hagemann R. Biosynthesis of thylakoids and the membrane bound enzyme systems of photosynthesis // Chloroplasts. Heidelberg, Berlin, New York: Springer, 1980. P. 147—177.

Hershberger C.L., Morgan D., Weaver F.A., Pienkos P. An unusual mutant affecting the frequency of organelle mutation // J. Bacteriol. 1974. Vol. 118, No. 2. P. 434—441.

Hildebrandt J., Bottomley W., Moser J., Herrmann R. A plastome mutant of *Oenothera hookeri* has a lesion in the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // Biochim. Biophys. Acta. 1984. Vol. 783. P. 67—73.

Hipkins V., Marshall K., Neale D. et al. A mutation hotspot in the chloroplast genome of a conifer (Douglas-fir: Pseudotsuga) is caused by variability in the number of direct repeats derived from a partially duplicated tRNA gene // Curr. Genet. 1995. Vol. 27. P. 572—579.

Johnson E.M., Sears B.B. Structure and expression of cytochrome *f* in an *Oenothera* plastome mutant // Curr. Genet. 1990. Vol. 17. P. 529—534.

Kutzelnigg H., Stubbe W. Investigation on plastome mutants in *Oenothera* // Sub-Cell. Biochem. 1974. Vol. 3. P. 73—89.

Lahaye A., Stahl H., Thines-Sempoux D., Foury F. PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria // EMBO J. 1991. Vol. 10. No. 4. P. 997—1007.

Lee D.J., Blake T.D., Smith S.E. et al. Chloroplast genome mapping and plastid ultrastructure analysis of chlorophyll deficient mutants of alfalfa // Crop. Sci. 1989. Vol. 29. P. 190—196.

Levinson G., Gutman G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. P. 203—221.

Linnane A.W., Haslam J.M., Lukins H.B., Nagley P. The biogenesis of mitochondria in microorganisms // Annu. Rev. Microbiol. 1972. Vol. 26. P. 163—198.

Maliga P., Sz.-Breznovits A., Marton L. Non-Mendelian streptomycin resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria // Nature. 1975. Vol. 255. P. 401—402.

Maly R. Die Mutabilität der Plastiden von *Antirrhinum majus* L. Sippe 50 // Z. Vererbungslehre. 1958. Bd 89. S. 692—696.

Martin A.P., Naylor G.J.P., Palumbi S.R. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals // Nature. 1992. Vol. 375. P. 153—155.

Martinez-Zapater J.M., Jil P., Capel J., Somerville C.R. Mutations at the *Arabidopsis CHM* locus promote rearrangements of the mitochondrial genome // Plant Cell. 1992. Vol. 4. P. 889—899.

McCarthy J.G., Sander M., Lowenhaupt K., Rich A. Sensitive homologous recombination strand-transferase assay: partial purification of a *Drosophila melanogaster* enzyme and detection of sequence effects on the strand-transfer activity of RecA protein // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 5854—5858.

McNay J.W., Chourey D.S., Pring D.R. Molecular analysis of genomic stability of mtDNA in tissue cultured cells of maize // Theor. Appl. Gen. 1984. Vol. 67. P. 433—437.

Michaelis P. Untersuchungen zur Mutation plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden. I. Teil // Planta. 1958. Vol. 51, No. 5. P. 600—634.

Michaelis P. Über Plastiden-Restitutionen (Rückmutationen) // Cytologia. 1969. Vol. 34 (Suppl.). P. 1—115.

Mourad G.S., White J.A. The isolation of apparently homoplastidic mutants induced by a nuclear recessive gene in *Arabidopsis thaliana* // Theor. Appl. Gen. 1992. Vol. 84. P. 906—914.

Nakazono M., Kanno A., Tsutsumi N., Hirai A. Homologous recombination mediated by two palindromic repeated sequences in the mitochondrial genome of *Oryza* // Theor. Appl. Gen. 1995. Vol. 91. P. 1—8.

Negruk V.I., Eisner G.I., Redichkina T.D. et al. Diversity of *Vicia faba* circular mitochondrial DNA in whole plants and suspension culture // Theor. Appl. Gen. 1986. Vol. 72. P. 541—547.

Newman S.M., Harris E.H., Johnson A.M. et al. Nonrandom distribution of chloroplast recombination events in *Chlamydomonas reinhardtii:* evidence for a hotspot and an adjacent cold region // Genetics. 1992. Vol. 132. P. 413—429.

Nickrent D.L., Ouyang Y., Duff R.J., DePamphilis C. W. Do nonasterid holoparasitic flowering plants have plastid genomes? // Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 34, No.5. P. 717—729.

Ogihara Y., Terachi T., Sasakuma T. Intramolecular recombination of chloroplast genome mediated by short direct-repeated sequences in wheat species // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 8573—8577.

Ogihara Y., Terachi T., Sasakuma T. Structural analysis of a length mutations in a hot-spot region of wheat chloroplast DNA // Curr. Genet. 1992. Vol. 22. P. 251—258.

Ogihara Y., Tsunewaki K. Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis // Theor. Appl. Gen. 1988. Vol. 76. P. 321—332.

Orita M., Suzuki Y., Sekyia T., Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction // Genomics. 1989. Vol. 5. P. 874—879.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1989. Vol. 86. P. 2766—2770.

Ouyang J.W., Zhou S.M., Jia S.E. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum* // Theor. Appl. Gen. 1983. Vol. 66. P. 101—109.

Palmer J.D. Comparative organization of the chloroplast genomes // Annu. Rev. Genet. 1985. Vol. 19. P. 325—354.

Palmer J. D. Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plant organelles // Trends Genet. 1990. Vol. 6, No. 4. P. 115—120.

Palmer J.D., Adams K.L., Cho Y. et al. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2000. Vol. 97, No. 13. P. 6960—6966.

Palmer J.D., Jorgensen R., Thompson W.F. Chloroplast DNA variation and evolution in Pisum: Patterns of change and phylogenetic analysis // Genetics. 1985. Vol. 109. P. 195—213.

Palmer J.D., Thompson W.F. Rearrangements in the chloroplast genomes of mung bean and pea // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1981. Vol. 78. P. 5533—5537.

Palmer J. D., Thompson W.F. Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost // Cell. 1982. Vol. 29. P. 537—550.

Potrycus I. Mutation und Ruckmutation Extrachromosomale vererbter Plastidenmerkmale von *Petunia* // Z. Pflanzenzuch. 1970. Bd. 63. S. 24—40.

Powell W., Morgante M., McDevitt R. et al. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: application to the population genetics of pines // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1995. Vol. 92. P. 7759—7763.

Powell W., Machray G., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeat // Trends Plant Sci. 1996. Vol. 1. P. 215—222.

Prina A. A mutator nuclear gene inducing a wide spectrum of cytoplasmically inherited chlorophyll deficiencies in barley // Theor. Appl. Genet. 1992. Vol. 85, № 2—3. P. 245—251.

Provan J., Soranzo N., Wilson N.J., Goldstein D.B., Powell W. A low mutation rate for chloroplast microsatellites //Genetics. 2001. Vol. 153. P. 943—947.

Rani V., Singh K.P., Shiran B. et al. Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high-frequency somatic embryogenesis-derived plants of allotetraploid *Coffea arabica* (Rubiaceae) // Plant Cell Rep. 2000. Vol. 19. P. 1013—1020.

Redei G.P. Extra-chromosomal mutability determined by a nuclear gene locus in *Arabidopsis* // Mutat. Res. 1973. Vol. 18. P. 149—162.

Redei G.P., Plurad S.B. Hereditary structural alterations of plastids induced by a nuclear mutator gene in *Arabidopsis* // Protoplasma. 1973. Vol. 77. P. 361—380.

Rochaix J.-D., Kuchka M., Mayfield S. et al. Nuclear and chloroplast mutations affect the synthesis or stability of the chloroplast *psbC* gene product in *Chlamydomonas reinhardtii* // EMBO J. 1989. Vol. 8, No. 4. P. 1013—1021.

Rode A., Hartmann R.G., Falconet D. et al. Extensive mitochondrial DNA variation in somatic tissue cultures initiated from wheat immature embryos // Curr. Genet. 1987. Vol. 12. P. 369—376.

Röbbelen G. Plastommutationen nach Röntgenbestrahlung von *Arabidopsis thaliana* // Z. Vererbungslehre. 1962. Bd 93. S. 25—34.

Sager R. Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1954. Vol. 40. P. 356—363.

Sager R., Ramanis Z. The particulate nature of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1963. Vol. 50. P. 260—268.

Sainsard-Chanet A., Begel O., d'Aubenton-Carafa Y. Two co-existing mechanisms account for large-scale deletions of mitochondrial DNA in *Podospora anserina* that involve the 5′ border of a group-II introns // Curr. Genet. 1998. Vol. 34. P. 326—335.

Sakamoto W., Kondo H., Murata M., Motoyoshi F. Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by *chloroplast mutator* // The Plant Cell. 1996. Vol. 8. P. 1377—1390.

Scaffner C., Laasch H., Hagemann R. Detection of point mutations in chloroplast genes of *Antirrhinum majus L.* I. Identification of a point mutation in the *psaB* gene of a photosystem I plastome mutant // Mol. Gen. Gen. 1995. Vol. 249. P. 533—544.

Schon E.A., Rizzuto R., Moraes C.T. et al. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA // Science. 1989. Vol. 244. P. 346—349.

Schuster W., Brennicke A. Interorganellar sequence transfer: plant mitochondrial DNA is nuclear, is plastid, is mitochondrial // Plant Sci. 1988. Vol. 54. P. 1—10.

Schuster W., Heisel R., Manna E. et al. Molecular analysis of the mitochondrial genome in *Oenothera berteriana* // Plant Physiol. Biochem. 1987. Vol. 25. P. 259—264.

Sears B.B., Sokalski M.B. The *Oenothera* plastome mutator: effect of UV irradiation and nitroso-methyl urea on mutation frequencies //Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 229. P. 245—252.

Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E. et al. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions // Genomics. 1993. Vol. 16. P. 325—332.

Shirzadegan M., Christey M., Earle E.D., Palmer J.D. Rearrangement, amplification and assortment of mitochondrial DNA molecules in cultured cells of *Brassica campestris* // Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 77. P. 17—25.

Shuman S. Recombination mediated by vaccinia virus topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1991. Vol. 88. P. 10104—10108.

Shumway L.K., Bauman L.F. Nonchromosomal stripe of maize // Genetics. 1967. Vol. 55. P. 33—38.

Slonimsky P.P., Perrodin G., Croft J.H. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites"// Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. Vol. 30, No. 3. P. 232—239.

Slonimski P.P., Tzagoloff A. Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH_2-cytochrome *c* reductase // Eur. J. Biochem. 1976. Vol. 61. P. 27—41.

Stubbe W. The role of the plastome in the evolution of genus *Oenothera* // Genetics. 1964. Vol. 35. P. 28—33.

Sun C.S., Wu S.C., Wang C.C., Chu C.C. The deficiency of soluble proteins and plastid ribosomal RNA in the albino pollen plantlets of rice // Theor. Appl. Gen. 1979. Vol. 55. P. 193—197.

Surzycki S.J., Gillham N.W. Organelle mutations and their expression in *Chlamydomonas reinhardii* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1971. Vol. 68, No. 6. P. 1301—1306.

Svab Z., Maliga P. Nicotiana tabacum mutants with chloroplast encoded streptomycin resistance and pigment deficiency // Theor. Appl. Gen. 1986. Vol. 72. P. 637—643.

Tassopulu D., Kung S. Nicotiana chloroplast genome. 6. Deletion and hotspot — a proposed origin of the inverted repeats //Theor. Appl. Gen. 1984. Vol. 67. P. 185—193.

Thompson D., Walbot V., Coe E.H. Plastid development in *iojap* and *mutator* — affected maize plants // Am. J. Bot. 1983. Vol. 70. P. 940—950.

To K.-Y., Liu C.-I., Liu S.-T., Chang Y.-S. Detection of point mutations in the chloroplast genome by single-strand conformation polymorphism analysis // The Plant J. 1993. Vol. 3. P. 183—186.

Treco D., Arnheim N. The evolutionary conserved repetitive sequence $d(TG{\cdot}AC)_n$ promotes reciprocal exchange and generates unusual recombinant tetrads during yeast meiosis //Mol. Cell. Biol. 1986. Vol. 6. P. 3934—3947.

Triboush S.O., Danilenko N.G., Ulitcheva I.I., Davydenko O.G. Location of induced mutations and reversions in the chloroplast genome of *Helianthus annuus* // Plant Growth Regulation. 1999. Vol. 27. P. 75—81.

Tzagoloff A., Akai A., Needleman R.B., Zulch G. Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase // J. Biol.Chem. 1976. Vol. 250. P. 8236—8242.

Umiel N. Streptomycin resistance in tobacco. III. A test on germinating seedlings indicates cytoplasmic inheritance in the St-R701 mutant // Z. Pflanzenphysiol. 1979. Bd 92. S. 295—301.

Van Dyck E., Foury F., Stillman B., Brill S.J. A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB //EMBO J. 1992. Vol. 11, No. 9. P. 3421—3430.

Wakasugi T., Shibata M., Joka M. et al. Gene organization of the chloroplast genome of the parasitic angiosperm, *Cuscuta japonica* // Genes. Genet. Syst. 1999. Vol. 74, No. 6. P. 358—370.

Walbot V., Coe E.H.J. Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1979. Vol. 76. P. 2760—2764.

Walther T.C., Kennell J.C. Linear mitochondrial plasmids of *F.oxysporum* are novel, telomere-like retroelements // Mol. Cell. 1999. Vol. 4, No. 2. P. 229—238.

Weiller G.F., Bruckner H., Kim S.H. et al. A GC cluster repeat is a hotspot for mit- macro-deletions in yeast mitochondrial DNA // Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 226. P. 233—240.

Weislogel P.O., Butow R.A. Control of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae:* the fate of mitochondtial membrane proteins and mitochondrial deoxyribonucleic acid during petite induction // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 246. P. 5113—5119.

Wolfe K.H., Li W.-H., Sharp P.M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1987. Vol. 84. P. 9054—9058.

Wunderlich V., Schütt M., Böttger M., Graffi A. Preferential alkylation of mitochondrial deoxyribonucleic acid by N-methyl-N-nitrosourea // Biochem. J. 1970. Vol. 118. P. 99—109.

Wurtz E.A., Sears B.B., Rabert D.K. et al. A specific increase in chloroplast gene mutations following growth of *Chlamydomonas* in 5-fluorodeoxyuridine // Mol. Gen. Gen. 1979. Vol. 170. P. 235—242.

Yap W.Y., Kreuzer K.N. Recombination hotspots in bacteriphage T4 dependent on replication origins // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1991. Vol. 88. P. 6043—6047.

Zinn A.R., Pohlman J.K., Perlman P.S., Butow R.A. In vivo double-strand breaks occur at recombinogenic G+C-rich sequences in the yeast mitochondrial genome // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 2686—2690.

Глава 10

РНК-редактирование: генетическая информация корректируется после транскрипции

Одним из удивительных открытий конца XX в. был тот факт, что в генетическую информацию, записанную в ДНК-последовательности, могут вноситься изменения на стадии транскрипции, причем само это корректирование перед трансляцией является генетически обусловленным.

В 1986 г. в митохондриях паразитических простейших — трипаносом были обнаружены изменения последовательностей информационной РНК (мРНК), ведущие к модификации ДНК-кодируемой информации. В мРНК наблюдались вставки или (реже) делеции уридиновых нуклеотидов. Эти вставки приводили к изменению информационного контекста по сравнению с закодированным в ДНК молекуле. Такая "правка" ДНК-матриц на уровне мРНК получила название РНК-редактирование (РНК-эдитинг, RNA-editing) [Benne et al., 1986]. В последующие годы РНК-эдитинг был описан для некоторых ядерных [Navaratnam et al., 1993, 1995; Scott, 1995], вирусных [Thomas et al., 1988; Zheng et al., 1992], множества митохондриальных [Pring et al., 1993; Maier et al., 1996] и хлоропластных РНК [Bock et al., 1997]. Были найдены практически все типы изменений — делеции, инсерции и конверсии нуклеотидов. Стало очевидным, что РНК-эдитинг не какое-то исключительное явление, а один из универсальных генетических процессов, существующий во множестве систематических групп [Covello, Gray, 1989; Bock et al., 1997; Даниленко, 2001]. Сравнительно позднее обнаружение этого феномена объясняется развитием именно в 80—90-е годы высокоразрешающих методов анализа нуклеиновых кислот.

Редактирование митохондриальной мРНК кинетопластных простейших

Митохондриальная мРНК кинетопластных простейших подвергается интенсивному модифицированию, заключающемуся во вставках и делециях уридиновых нуклеотидов [Benne et al., 1986; Колесников и др., 2000].

Митохондриальная ДНК трипаносом и других кинетопластных простейших, называемая кинетопластной ДНК, состоит из комплекса больших и малых колец [Simpson, 1987]. Приблизительно 50 сцепленных макси-колец размером 23—36 т.п.н. (в зависимости от вида) содержат структурные и рРНК гены и несколько специальных генов РНК-проводников (guide RNA — gРНК); от 5 до 10000 сцепленных мини-колец кодируют все остальные gРНК [Simpson, Thiemann, 1995]. Количество различных генов РНК-проводников в клетках видоспецифично. У *Trypanosoma brucei* предполагают

наличие более 300 классов мини-колец, одна мини-кольцевая ДНК кодирует три молекулы РНК-проводника, разделенные 18-членными инвертированными повторами; у *Leishmania tarentolae* каждое мини-кольцо кодирует не три, а лишь один РНК-проводник [Simpson, Thiemann, 1995].

Эдитинг существует также у второй группы кинетопластных простейших (*Cryptobiidae*). Было установлено, что хотя у простейших этой группы нет мини-колец, редактирование в митохондриальной мРНК *Trypanoplasma borreli* происходит аналогично мРНК *Trypanosoma.* В макси-кольцах *Cryptobiidae* размером 200 т.п.н. имеется повторяющийся компонент длиной 1 т.п.н., организованный в тандемные повторы. Этот компонент кодирует малые транскрипты, напоминающие молекулы РНК-проводников *Trypanosoma* [Simpson, Thiemann, 1995; Maslov et al., 1998].

Показано, что из 20 исследованных структурных генов трипаносом 12 редактируются. Транскрипты макси-колец подвергаются эдитингу во множестве сайтов — происходят вставки, а иногда делеции уридиновых нуклеотидов. Инсерции могут составлять до 50% всех нуклеотидов молекулы мРНК [Simpson, Thiemann, 1995; Sabatini et al., 1998]. Определяют места редактирования уже упоминавшиеся РНК-проводники (gРНК) — небольшие молекулы, которые комплементарны по отношению к редактируемым РНК-областям. Кроме того, они имеют дополнительно 3′-уридиловый конец размером от 5 до 24 нуклеотидов, который, вероятно, добавляется ферментом терминальной уридилат-трансферазой (TUTазой) (рис. 10.1) [Benne, 1996].

У паразитического простейшего *Leishmania tarentolae* были идентифицированы и клонированы 13 gРНК, кодируемых макси-кольцевой, и 43 gРНК, кодируемых мини-кольцевыми ДНК молекулами [Simpson, Thiemann, 1995]. Интересно, что длительное культивирование *in vitro L. tarentolae* привело практически к полной утрате генов gРНК, необходимых для редактирования тех мРНК, белковые продукты которых теряли свое значение для выживания в культуре. Это свидетельствует о лабильности признака эдитинга у трипаносом [Thiemann et al., 1994].

Механизм редактирования кинетопластной мРНК

Поскольку РНК-проводники являются комплементарными — "антисмысловыми" к участкам редактируемых мРНК, они способны образовывать короткие "якорные" дуплексы с пре-редактируемой РНК вблизи участка эдитинга [Benne, 1996].

Результаты компьютерного анализа многих молекул мРНК до их редактирования показали, что точки эдитинга обычно находятся в зоне одноцепочечной петли. Было высказано предположение, что такая структура являет-

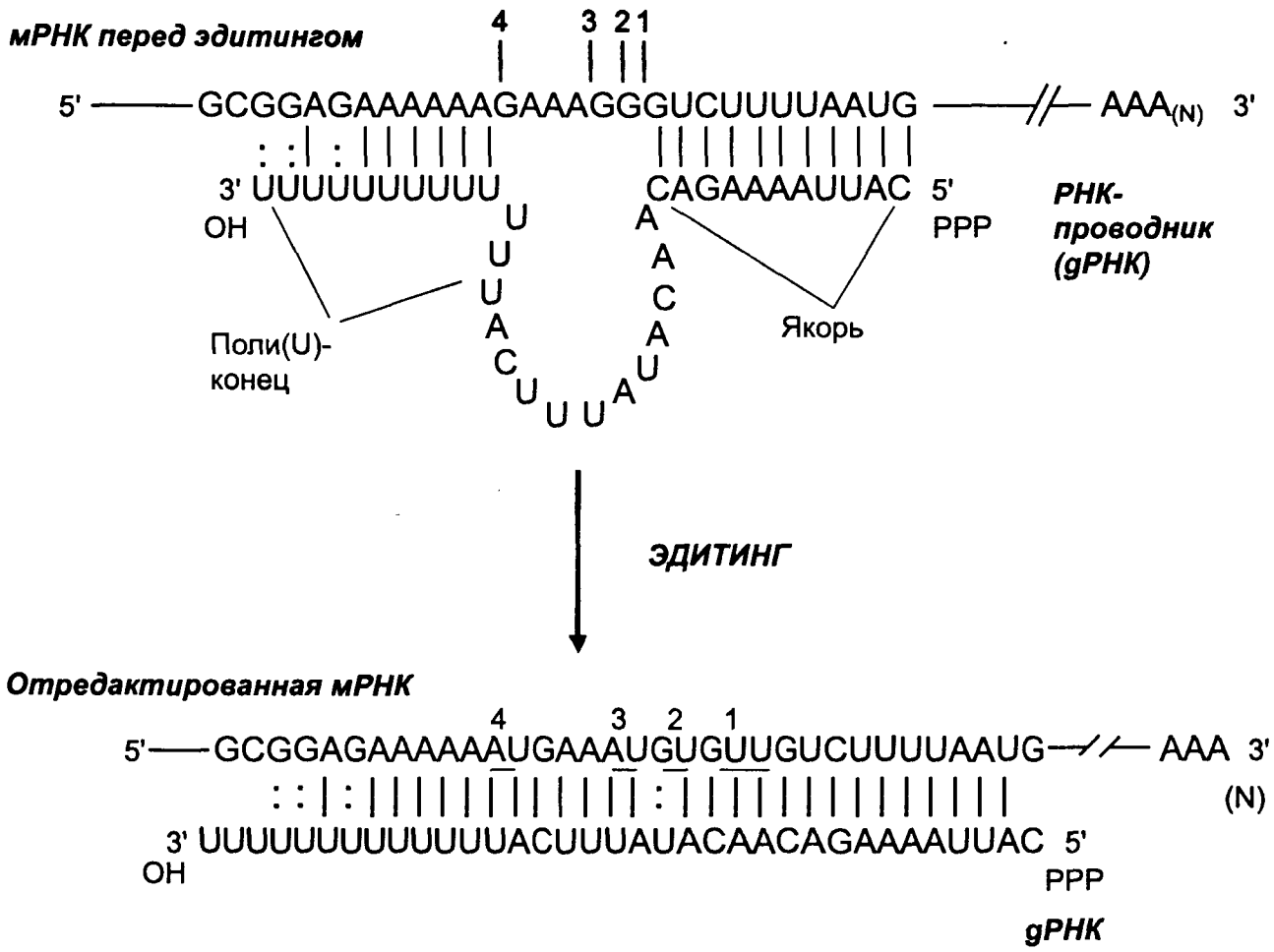


Рис. 10.1. Предполагаемая структура РНК-проводника (gРНК), гибридизующегося с предредактированной и редактированной мРНК. В зоне "якорного" дуплекса 5'-конец мРНК гибридизуется с мРНК сразу 3' после первого сайта эдитинга. Первое же нарушение комплементарности дуплекса может направлять сайт-специфическую эндонуклеазную реакцию эдитинга. Второй дуплекс существует между поли(U)-концом gРНК и пурин-богатой зоной 5' от сайта эдитинга. Этот дуплекс, возможно, удерживает 5'-фрагмент после эндонуклеазного расщепления. Последовательность gРНК между этими двумя дуплексами определяет эдитинг в сайтах с 1 по 4. Эдитинг закончен, когда достигается полная гибридизация между молекулами [по Hajduk, Sabatini, 1998]

ся необходимой предпосылкой для узнавания этих точек. Из нескольких биохимических моделей, описывающих инсерционный эдитинг у *Trypanosoma*, наиболее убедительной признана модель с участием митохондриального фермента терминальной удидилтрансферазы (рис. 10.2) [Hajduk, Sabatini, 1998].

Вставки уридинов происходят с помощью фермента TUTазы, затем части молекулы сшиваются РНК-лигазой. Образуется частично редактированная мРНК, циклы повторяются до получения полностью отредактированной мРНК [Benne, 1996].

В эдитинге принимают участие различные белковые компоненты. Описано 8 gРНК-связывающих белков массой от 9 до 124 кД [Simpson, Thiemann, 1995]. При ультрацентрифугировании в градиенте глицерола мито-

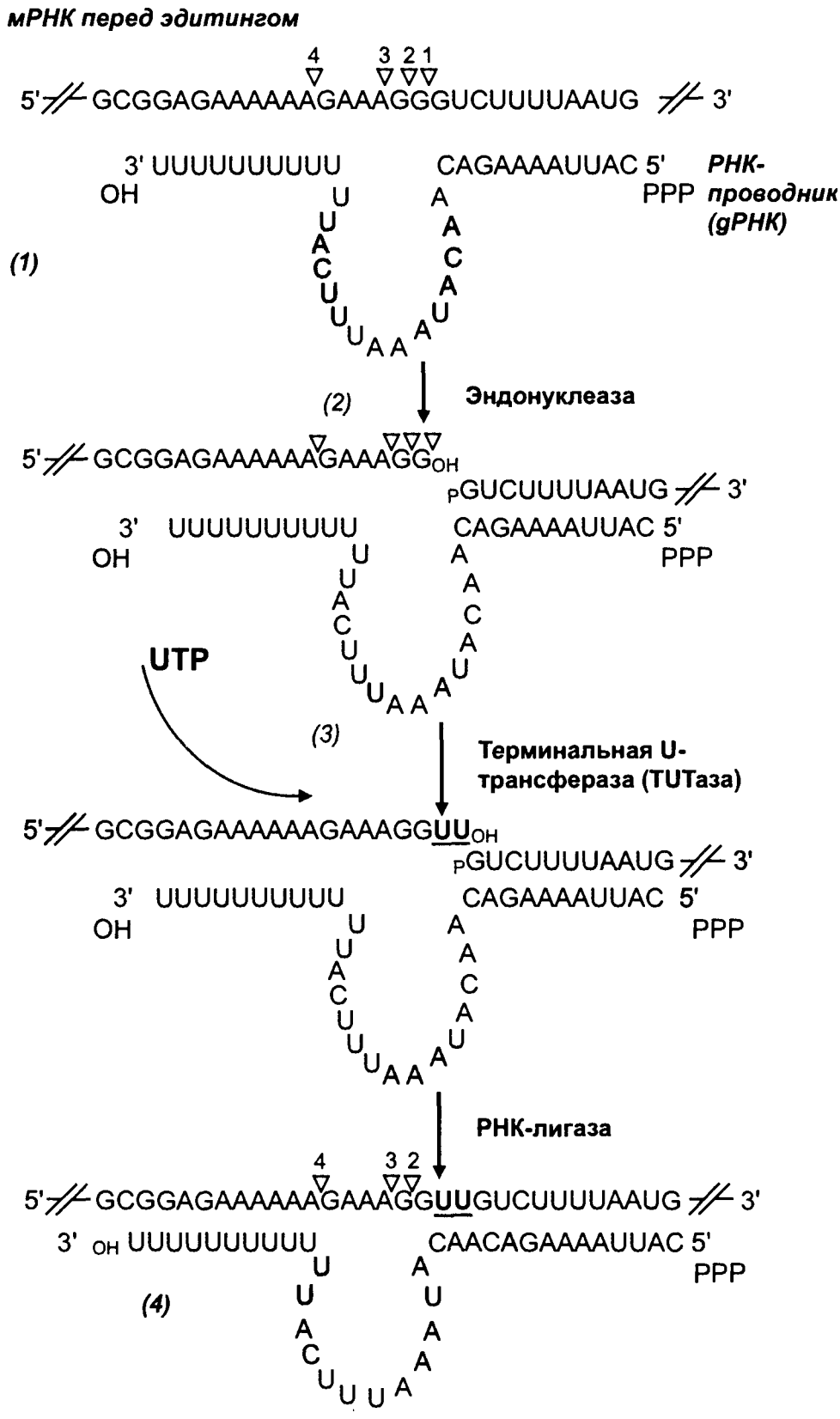


Рис. 10.2. Схема инсерционного мРНК-эдитинга. Редактирование цитохром *b*-мРНК осуществляется образованием дуплекса gРНК—мРНК (*1*). После этого пре-мРНК разрезается эндонуклеазой в сайте эдитинга, ближайшем к дуплексу (*2*). 5′-фрагмент пре-мРНК содержит 3′-терминальный гидроксил, к которому с помощью митохондриальной TUTазы присоединяется уридин (*3*). После добавления U фрагменты мРНК сшиваются митохондриальной мРНК лигазой, образуя отредактированный продукт (*4*) [по Hajduk, Sabatini, 1998]

хондриальных экстрактов *Trypanosoma brucei* были выделены два содержащих gPHK рибонуклеопротеиновых (РНП) комплекса: один размером 19S, второй, более гетерогенный, размером 35—40S. Обе ферментативные активности, связанные с редактированием, выявлялись в данных комплексах: РНК-лигаза была равномерно распределена в обоих, тогда как TUTаза была в основном ассоциирована с 19S-комплексом. В обоих комплексах удалось обнаружить и сайт-специфическую эндонуклеазную активность [Hajduk, Sabatini, 1998].

С помощью моноклональных антител выявлен митохондриальный белок 45 кД (REAP-1), ингибирование которого приводит к прекращению эдитинга *in vitro*. И хотя точная роль данного белка в эдитинге не ясна, REAP-1 оказался первым клонированным идентифицированным белковым компонентом эдитинг-комплекса (рис. 10.3) [Madison-Antenucci et al., 1998].

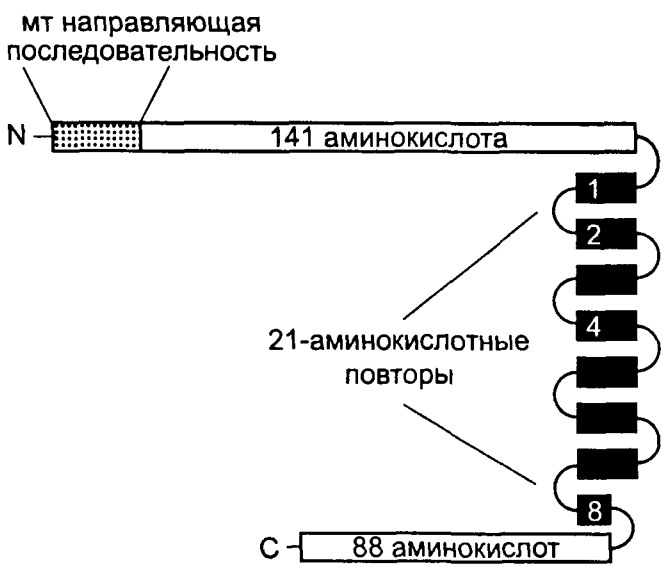


Рис. 10.3. Схематическая структура REAP-1 — первого белка, участие которого в РНК-редактировании доказано [по Hajduk, Sabatini, 1998]

Интересно, что хотя роль РНК-хеликазы в РНК-редактировании установлена, ее находят в митохондриях не связанной с РНК-протеиновыми комплексами [Hajduk, Sabatini, 1998]. Гипотетическая модель образования эдитинг-комплекса (эдитосомы) представлена на рис. 10.4. В 19S-комплексах gPHK связываются с набором специфических белков, включая митохондриальную РНК-лигазу, специфическую эндонуклеазу, узнающую сайт эдитинга, TUTазу, несколько gPHK-связывающих белков. Предполагается, что в 19S-комплексах *T. brucei* и аналогичных им "Т"-комплексах *Leishmania tarentolae* происходит созревание gPHK путем добавления 3'-олиго(U)-окончания. Связывание пре-редактированных РНК с 19S-комплексами и рядом других белков (среди них REAP-1) ведет к образованию 35—40S РНП. Отредактированные РНК освобождаются из этого комплекса и связываются с митохондриальными рибосомами [Hajduk, Sabatini, 1998].

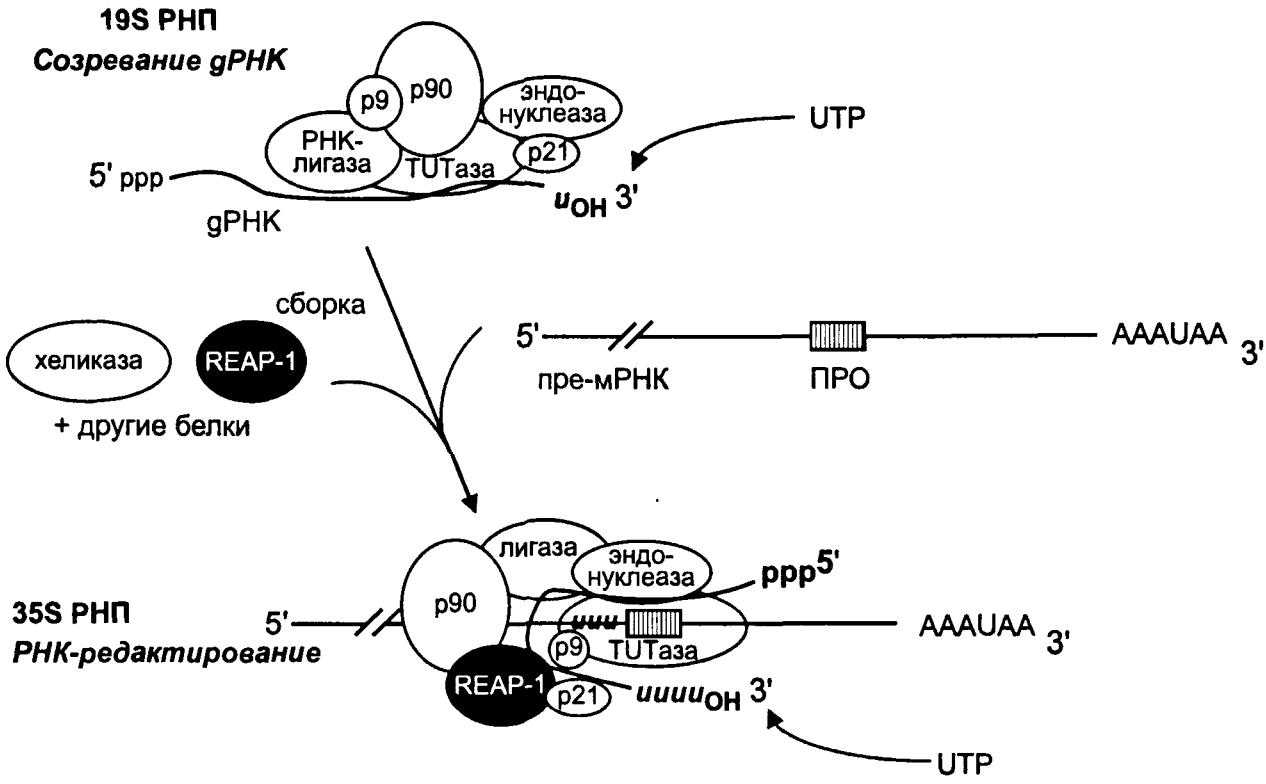


Рис. 10.4. Гипотетическая модель сборки и формирования эдитинг-комплекса. gPHK связываются со специальными белками, образуя 19S РНП, после чего происходит посттранскрипционное добавление уридинов к gPHK. 19S РНП, связываясь с пре-мРНК и белками, образует 35—40S РНП. Образование данного комплекса, вероятно, требует комплементарного взаимодействия между якорной областью gPHK и 3'-участком мРНК, непосредственно прилегающим к пре-редактированной области мРНК (ПРО). Комплекс удерживает 5'-конец мРНК в нужной конфигурации для второго этапа редактирования [по Hajduk, Sabatini, 1998]

Примечательно, что онтогенетические изменения митохондриальной активности коррелируют с изменением эдитинга специфических мРНК. Например, у обоих видов *Trypanosoma brucei* и *T. congolense* число отредактированных мРНК цитохрома *b* и цитохромоксидазы II мало в стадии нахождения в кровяном русле, но велико на стадии переносчика. С другой стороны, количество отредактированных мРНК 8-й и 9-й субъединиц NADH-дегидрогеназы мало на стадии переносчика, но велико на стадии нахождения в кровяном русле [Hajduk, Sabatini, 1998].

Эдитинг митохондриальной мРНК плесневого гриба *Physarum polycephalum*

В отличие от трипаносом редактирование митохондриальных транскриптов миксомицета *Physarum polycephalum,* впервые описанное в 1991 г., происходит в основном путем инсерций цитидина. Так, в одной молекуле мРНК α-АТФазы было обнаружено 54 некодированных цитидина [Mahen-

dran et al., 1991]. Всего в митохондриальных РНК *Physarum* обнаружено около 1000 точек эдитинга, причем они располагаются не только в белок-кодирующих матрицах, но и в рРНК и тРНК. *P. polycephalum* до сих пор остается единственным из изученных организмов, в котором при эдитинге происходят как вставки, так и замены нуклеотидов. Чаще всего наблюдаются инсерции цитидиновых мононуклеотидов — во множество точно соблюдаемых точек, реже G- и U- остатков, иногда встраиваются динуклеотиды (UA, AA, GU, CU, GC). Кроме инсерций происходят конверсии — C замещается на U. В среднем инсерции наблюдаются по 1 на каждые 25 нуклеотидов мРНК и на каждые 40—45 нуклеотидов рРНК. По 1—2 вставки (в основном цитидин) обнаружены в четырех тРНК [Gott, Visomirski-Robic, 1998]. Очевидно, все эти множественные типы эдитинга предполагают наличие нескольких механизмов редактирования. С помощью недавно созданной системы изолированных митохондрий *Physarum* показано, что инсерции мРНК происходят по позициям, находящимся на расстоянии не далее 14—22 нуклеотидов от сайта, который в это время транскрибируется (а возможно, и гораздо ближе) [Visomirski-Robic, Gott, 1997]. Вероятно, что наблюдаемый инсерционный эдитинг каким-то образом связан с транскрипцией. Конверсии же нуклеотидов C—U, вероятно, осуществляются посттранскрипционно, как это происходит в митохондриях и хлоропластах растений (см. далее) [Gott, Visomirski-Robic, 1998].

Отсутствие полярности эдитинга и другие особенности этого процесса у *Physarum* отличают его от редактирования кинетопластной мРНК. Механизмы узнавания сайтов и биохимические процессы эдитинга у *Physarum* пока неясны [Visomirski-Robic, Gott, 1997]. В плазмидах, содержащихся в митохондриях *Physarum,* сайты эдитинга не обнаруживаются, что свидетельствует об ином происхождении плазмид [Takano et al., 1997].

Эдитинг митохондриальных мРНК растений

Толчком к открытию эдитинга в органеллах растений послужило оказавшееся неверным предположение о неуниверсальности генетического кода: при изучении митохондриальных белок-кодирующих генов первоначально полагали, что в ДНК митохондрий CGG кодирует триптофан, тогда как в универсальном генетическом коде данный триплет определяет аргинин. Загадка разрешилась после секвенирования кДНК (молекула, комплементарная мРНК) этих генов: во многих сайтах мРНК были обнаружены C—U-замены. Именно эти замены явились причиной трансляционных включений аргинина, а универсальность кода была подтверждена и в данной системе [Maier et al., 1996].

Редактирование мРНК-последовательностей в митохондриях растений обнаружено одновременно в трех лабораториях [Covello, Gray, 1989; Gualberto et al., 1989; Hiesel et al., 1989]. Было показано, что эдитингу подвергаются все гены, кодируемые митохондриальной ДНК, причем по множеству сайтов [Pring et al., 1993; Maier et al., 1996]. В табл. 10.1 приведены данные о редактировании митохондриальных генов пшеницы.

В митохондриальных РНК-матрицах девятнадцати генов пшеницы обнаружено в общей сложности 364 точки эдитинга — в среднем по 19 на ген. Наименьшее число сайтов эдитинга в *nad5* мРНК — 5,5 сайта на 1000 п.н., наибольшее — в *orf 206* — 67,9 на 1000. Если в митохондриальном геноме

Таблица 10.1

Сайты эдитинга белок-кодирующих областей митохондриальных транскриптов пшеницы [по Maier et al., 1996]

Ген	C–U-превращения	Число сайтов эдитинга на 1000 п.н.	Модифицировано аминокислот	% модифицированных аминокислот
nad1	17	17,4	14	4,3
nad2	36	24,5	28	6,5
nad3	21	59,3	22	13,5
nad4	23	15,5	22	4,5
nad5	11	5,5	10	1,5
nad6	15	23,4	9	3,6
nad7	32	27,1	27	6,9
nad9	14	24,3	12	6,2
atp9	8	33,3	5	6,8
cob	18	41,3	17	4,3
cox2	17	21,8	15	5,8
cox3	12	15,1	12	4,5
rps1	4	7,8	4	2,3
rps2	7	6,4	7	1,9
*rps7**	1	–	–	–
rps12	6	16	6	4,8
orf 156	4	8,5	3	1,9
orf206	42	67,9	32	15,5
orf240	43	59,7	33	13,8
orf575	34	19,7	30	5,2

* Неполная кДНК-последовательность.

растений экспрессируется около 60 генов [Unseld et al., 1997], то можно предсказывать существование примерно 1200 сайтов эдитинга в транскриптах мтРНК пшеницы [Maier et al., 1996]. Как видно из рис. 10.5, распределение сайтов эдитинга может быть весьма гетерогенным даже в различных экзонах одного и того же гена. Чем объясняется такая гетерогенность, неясно.

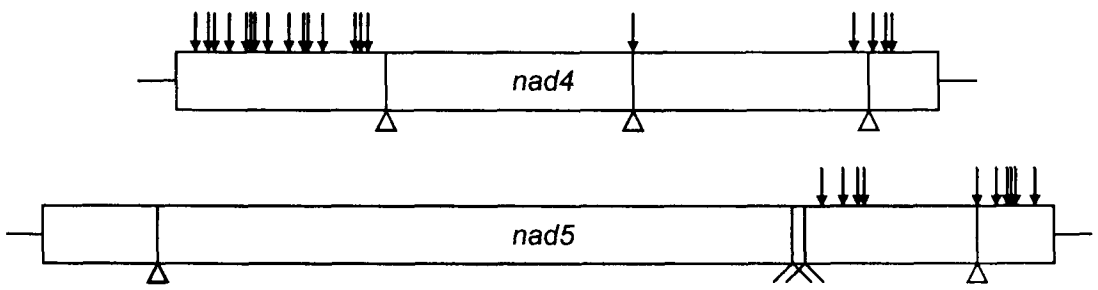


Рис. 10.5. Распределение сайтов эдитинга в транскриптах некоторых митохондриально кодируемых субъединиц комплекса 1 у пшеницы. Показаны кодирующие участки генов, разделенные на экзоны. Треугольники обозначают цис-сплайсируемые, а уголки — транс-сплайсируемые интроны. Каждая стрелка соответствует одному сайту эдитинга [по Maier et al., 1996]

К настоящему времени у некоторых видов выявлено более 400 точек С—U-конверсий митохондриальной мРНК [Giege, Brennicke, 1999], и только в четырех случаях обнаружены обратные превращения U—С: в мРНК генов *cox3* пшеницы [Gualberto et al., 1990], *cox2* гороха и энотеры [Covello, Gray, 1990] и *cob* энотеры [Hiesel et al., 1990]. Несколько случаев U—С-замен описано для папоротника *Asplenium nidus* [Hiesel et al., 1994] и роголистника *Ceratophyllum* [Steinhauser et al., 1999].

С—U-превращения, чаще всего происходящие при эдитинге, могут значительно изменить рамки считывания. Так, геномный треониновый кодон (ACG) в результате редактирования заменяется метиониновым (AUG), что приводит к возникновению новой рамки считывания. И наоборот, эдитинг геномных глутаминовых кодонов (CAA и CAG) и аргининового (CGA) приводит к образованию стоп-кодонов (UAA, UAG или UGA) и обрыванию рамки считывания. Все эти варианты действительно были обнаружены в мРНК разных видов [Maier et al., 1996]. В случае редактирования *rps10* митохондрий картофеля появляются новые как старт-, так и стоп-кодоны. Наоборот, U—С-эдитинг у *Ceratophyllum* аннулирует стоп-кодоны [Steinhauser et al., 1999]. Стоп-кодоны в результате эдитинга исчезают в *nad2* и *nad5* генах папоротников [Malek et al., 1997]. У пшеницы старт-кодон создается редактированием транскрипта *nad1,* а стоп-кодоны — транскриптов *atp6* [Howad, Kempken, 1997], *atp9* и *rps1* [Maier et al., 1996]. Идентификация точек эдитинга в какой-то ORF указывает на то, что данная рамка считывания скорее всего является функционирующим геном.

Как уже не раз отмечалось, митохондриальный геном растений подвергается обычно множественным рекомбинациям, в результате которых фрагменты некоторых генов могут оказываться в одной рамке считывания с нормальными полными генами. Анализ эдитинга таких фрагментов показывает его сиквенс-специфичность. Так, в митохондриях пшеницы в большом транскрипте размером 2,9 т.п.н. коэкспрессируются три гена: *nad3, rps12* и *orf156.* Кроме того, транскрипт содержит последовательность 193 п.н., соответствующую фрагменту *cox2* гена, которая редактируется точно в тех же трех сайтах, что и полная мРНК *cox2* [Maier et al., 1996].

Ферменты эдитинга митохондриальных мРНК растений и его специфичность

Наиболее вероятным механизмом С—U-редактирования представляется дезаминирование. Показано, что в процессе эдитинга сахарофосфатный скелет сохраняется интактным, а при удалении аминогруппы меченые основания остаются связанными с мРНК. Данный результат исключает трансгликозилирование при С—U-конверсии. Кроме всего прочего, реакция *in vitro* требует ионов цинка, что типично для дезаминаз [Blanc et al., 1996; Marchfelder et al.,1998].

Несколько менее ясен механизм обратной реакции: U—С. До сих пор не описан фермент, который мог бы переносить аминогруппу от уридина к цитидину. Возможно, это трансаминаза, которая использует аминогруппу какого-либо акцептора (например, глутамата или аспартата). Другим механизмом U—С-редактирования может быть реакция с CTP-синтазой [Scott, 1995]. Для более подробного ознакомления читателя с данным вопросом рекомендуем ряд специальных публикаций [Blanc et al., 1996; Yu, Shuster, 1995; Maas et al., 1999, 2000].

В отличие от 3′ → 5′-направленного эдитинга митохондрий трипаносом редактирование отдельных оснований в мРНК митохондрий растений происходит внешне бессистемно — даже близко расположенные сайты эдитинга могут иметь различный статус. Логично предположить, что гипотетическая эдитосома не сканирует всю мРНК, но непосредственно связывается с нуклеотидами, которые надлежит редактировать [Marchfelder et al., 1998].

Вопрос специфичности эдитинга является, пожалуй, одним из самых интригующих. Как видно из табл. 10.1, в транскрипте *orf206* редактируется до 68 цитидинов — 25% всех цитидинов в мРНК *orf206.* Какой механизм определяет редактирование конкретного цитидина, а не соседнего с ним? Анализ последовательностей, окружающих сайт редактирования, оказался малоинформативным: установлено, что на 5′-стороне от сайта чаще всего находится пиримидин (в 90% случаев), причем в 60% случаев это уридин;

менее чем в 2% случаев на 5′-стороне от сайта располагается гуанидин [Gualberto et al., 1990].

Пока не удалось выявить ни какой-либо консенсусной последовательности, ни какого-то мотива во вторичной структуре, который мог бы служить "указателем" сайта эдитинга [Maier et al., 1996; Marchfelder et al., 1998]. Результаты исследований естественных дупликаций генов митохондрий, возможно, приблизят к решению этой проблемы. Так, был исследован эдитинг мРНК рибосомального белка S12: *rps12* и его копии *rps12b,* включающей с I по IV сайты эдитинга этого белка, а также фланкирующие участки — 7 нуклеотидов до сайта I и 6 нуклеотидов после сайта IV. При этом *rps12* и *rps12b* отличались на один нуклеотид в положении –5, предшествующем сайту I. Оказалось, что изменение последовательности после сайта IV никак не влияло на редактирование в I — IV сайтах, в то время как изменение в точке, на 5 нуклеотидов предшествующей сайту I, приводит к отмене эдитинга этого сайта, хотя и не влияет на редактирование сайтов II — IV. Эти данные свидетельствуют о важности 5′-фланкирующего участка для специфичности эдитинга [Mulligan et al., 1999]. Аналогичный вывод был сделан при исследовании эдитинга *atp6* мРНК [Kubo, Kadowaki, 1997], а также хлоропластных матричных РНК.

Множественность сайтов эдитинга в митохондриальных мРНК растений (500—1200 точек) делает маловероятным наличие специфических белковых молекул, узнающих каждая свой сайт. Скорее всего будут найдены РНК молекулы, которые могут действовать как транс-детерминанты (подобно gРНК у кинетопластов) и как цис-детерминанты, образующие специфическую вторичную структуру, узнаваемую ферментами эдитинга [Marchfelder et al., 1998].

Дуплицированные фрагменты различных митохондриальных генов оказались весьма удобны для выяснения роли нуклеотидов, окружающих сайт эдитинга, в контроле редактирования. В целом предшествующие (5′) последовательности, как уже обсуждалось, оказывают большее влияние на эдитинг, чем 3′-фланкирующие. Для некоторых митохондриальных генов оказываются достаточными тридцать 5′-фланкирующих нуклеотидов, сайты других генов контролирует более протяженный участок. Изучена дупликация у кукурузы с С-типом ЦМС (см. подробнее в главе 11), состоящая из 39 нуклеотидов, средний (20-й) цитидин в которой редактируется в обеих копиях, т.е. в пределах 19 нуклеотидов до и 19 после сайта эдитинга находятся последовательности, определяющие специфичность С—U-замены [Kumar, Levings, 1993]. В дуплицированном фрагменте длиной 48 нуклеотидов у энотеры третий нуклеотид не редактируется в отличие от исходного фрагмента, т.е. последовательности в два нуклеотида до и 45 нуклеотидов после

редактируемого сайта оказывается недостаточно для того, чтобы детерминировать эдитинг [Lippok et al., 1994].

Сравнение эдитинга одинаковых сайтов в различных контекстах *in vivo* также показывает, что 5′-фланкирующие последовательности определяют редактирование по крайней мере ряда сайтов, но не исключают участия и 3′-фланкирующих последовательностей [Marchfelder et al., 1998].

Поиск РНК-проводников в митохондриях растений проводился несколькими путями. У энотеры найдены антисмысловые РНК молекулы, возможно, выполняющие эту роль. Одним из кандидатов на роль РНК-проводника является фрагмент 26S рРНК, который гибридизируется с интенсивно редактируемой областью транскрипта одного из генов, участвующих в биогенезе цитохрома *c* [Yu, Shuster, 1995].

Информационная емкость генома митохондрий высших растений вполне достаточна для кодирования gРНК. Так, например, в митохондриальном геноме *Arabidopsis* до сих пор не установлены функции более 200 000 нуклеотидов, которые вполне могут кодировать gРНК (см. рис. 4.3). Однако скрининг митохондриального генома у *Arabidopsis* не выявил антисмысловых последовательностей, которые могли выполнять роль gРНК. Интересно, что у маршанции, у которой отсутствует мРНК эдитинг в митохондриях, "излишней" ДНК значительно меньше — 70 000 нуклеотидов [Marchfelder et al., 1998; Unseld et al., 1997].

Эдитинг некодирующих участков транскриптов митохондрий

Хотя редактирование типично прежде всего для кодирующих участков митохондриальных ДНК, небольшое количество сайтов эдитинга обнаружено в транскрибируемых некодирующих областях [Covello, Gray, 1990; Bonnard, Grienenberger, 1995] и в межгенных областях при котранскрипции двух или более генов [Gonzalez et al., 1993; Gualberto et al., 1991]. Каков "биологический смысл" редактирования этих областей -- пока неясно. Возможно, в некоторых случаях это приводит к улучшению связывания мРНК с рибосомой, как в случае с *rps14* геном у *Oenothera* [Maier et al., 1996].

Эдитинг обнаружен также в интронах транскриптов некоторых генов. Как правило, в этих случаях сайты редактирования размещаются в консервативном участке (stem) вторичной структуры этих интронов группы II и приводят к замене некорректного C/A на U—A-спаривание. В этих случаях сайты эдитинга могут быть очень важны для создания правильной конфигурации интрона перед сплайсингом. Для проверки такого предположения домен 6 транс-сплайсируемого интрона c/d митохондриального *nad1* гена *Oenothera,* содержащий некомплементарную пару C/A, трансплантировали в автокаталитический дрожжевой интрон aI5c, создавая химерные конст-

рукции либо с геномным С, либо с отредактированным U. После инкубации при условиях, обеспечивающих автокаталитическую эксцизию, только отредактированные версии химерных молекул образовывали петлю (lariat), необходимую для сплайсинга, тогда как геномные оставались неактивными [Börner et al., 1995].

Эдитинг и посттранскрипционные процессы

Редактирование мРНК и сплайсинг интронов — два посттранскрипционных процесса, которые происходят параллельно и независимо друг от друга [Maier et al., 1996]. Исключение составляют случаи, когда сайты эдитинга расположены в самих интронных последовательностях — тогда редактирование предшествует сплайсингу [Börner et al., 1995]. В тех случаях, когда ген транскрибируется моноцистронно, созревание происходит обычно быстро, и удается обнаружить только отредактированные мРНК молекулы. Если же котранскрибируется несколько генов, всегда наряду с полностью отредактированными встречаются и частично отредактированные мРНК. И хотя пре-мРНК всегда менее отредактированы, чем зрелые мРНК, в митохондриальных РНК растений в отличие от кинетопластной не удается обнаружить никакой полярности редактирования — любой сайт может пройти эдитинг еще до сплайсинга. Вместе с тем количество частично отредактированных молекул коррелирует с присутствием незрелых транскриптов. В тканях, где накапливаются в основном зрелые транскрипты (например, проростки пшеницы), неполностью отредактированных транскриптов очень мало. У видов, где обычно встречаются промежуточные формы пре-мРНК, частичное редактирование — обычное явление [Maier et al., 1996]. Как направляются и регулируются эти процессы, пока неясно.

Эдитинг и продукты экспрессии

Следствием эдитинга является не только создание или ликвидация стоп- и старт-кодонов, но и изменение аминокислотных последовательностей белков. В табл. 10.1 показано изменение 308 кодонов в результате эдитинга 364 сайтов (86%) в 19 мРНК митохондрий пшеницы. 14 процентов нуклеотидных замен (56 сайтов) оказываются нейтральными и не ведут к аминокислотным изменениям в белках [Maier et al., 1996]. Чем вызвана необходимость эдитинга в этих сайтах, неясно.

В большинстве же случаев эдитинг белок-кодирующих сайтов приводит к синтезу функционально полноценных белков. Это показано для многих белков, кодируемых митохондриальным геномом. Так, у табака нарушение эдитинга *atp9* мРНК препятствует развитию пыльцы [Hernould et al., 1992]. У пшеницы эдитинг гена *cox2* по 235-му нуклеотиду превращает треонино-

вый кодон в метиониновый. Отметим, что метионин незаменим в структуре одного из медьсвязывающих доменов COX2 [Covello, Gray, 1990]. У двух митохондриальных генов пшеницы — *orf575* и *orf240*, предположительно участвующих в биогенезе цитохрома *c*, эдитинг приводит к замене трех аргининовых кодонов на триптофановые. При этом восстанавливается консенсусная последовательность в обоих белках, необходимая для связывания с гемом [Maier et al., 1996].

Сравнение локализации сайтов эдитинга у разных видов показывает консервативность многих из них, что обеспечивает стабильность аминокислотного состава жизненно важных белков, например таких, как компоненты дыхательной цепи. Кроме эволюционно закрепленных у разных видов консервативных сайтов эдитинга имеются также дополнительные, уникальные для каждого вида сайты, причем невозможно установить, какая тенденция доминирует в филогенезе: к увеличению либо к уменьшению их количества [Marchfelder et al., 1998].

Как уже упоминалось, частично отредактированные мРНК могут в значительном количестве накапливаться в митохондриях и составлять существенную часть всей популяции мРНК молекул. Участвуют ли такие молекулы мРНК в трансляции? При анализе белков NAD9 картофеля, ATP6 петунии и ATP9 пшеницы показано, что трансляция происходит только с отредактированных транскриптов [Begu et al., 1990; Grohmann et al., 1994; Hanson et al., 1996].

Установлено, что с полисомами связываются преимущественно отредактированные мРНК. Поскольку в участках мРНК, которые важны для инициации трансляции, сайтов эдитинга не обнаружено, неясно, какие механизмы препятствуют образованию комплексов неотредактированных транскриптов с полисомами [Maier et al., 1996; Marchfelder et al., 1998].

Неоднозначны результаты, полученные при исследовании рибосомального полипептида S12 у разных видов. С помощью антител к: а) прошедшему эдитинг белку S12, б) нередактированному и в) частично отредактированному белку показана трансляция с частично отредактированных мРНК S12 у картофеля и петунии, тогда как у кукурузы транслируется только полностью отредактированная мРНК S12 [Phreaner et al., 1996; Lu et al., 1996].

Редактирование структурных РНК

Кроме информационных РНК, посттранскрипционным изменениям могут подвергаться и транспортные РНК, кодируемые не только митохондриальным, но и ядерным геномами.

Показан А—I-эдитинг и идентифицирована ядерная тРНК-специфичная аденозиндезаминаза человека — hADAT1, дезаминирующая 37-й аденозин

антикодоновой петли тРНК^{Ala} эукариот в инозин. Интересно, что данный сайт редактирования аланиновой транспортной РНК обладает поразительным филогенетическим долголетием — он сохранился в клетках от дрожжей до человека. Фермент hADAT1 кодируется одним геном, идентификация и клонирование которого поможет установить физиологическое значение этой уникальной модификации тРНК [Maas et al., 1999]. Ген, кодирующий аналогичную аденозиндезаминазу мышей (mADAT1), секвенирован, показана его 81%-ная нуклеотидная и 87,5%-ная белковая гомология с hADAT1 [Maas et al., 2000].

Описан первый случай предполагаемого эдитинга у бактерий. У *Escherichia coli K-12* были выявлены две различающиеся хроматографически тРНК^{Ser}(GGA): у малого числа молекул 20-м нуклеотидом был цитидин, а у большинства молекул — дигидроуридин (D). Ожидаемых двух тРНК^{Ser} генов обнаружить не удалось — при анализе полного набора тРНК генов *E.coli K-12* найдена лишь C_{20} версия. Было высказано предположение о посттранскрипционном эдитинге C—U, а затем U—D, которое, однако, экспериментально пока не подтверждено [Price, Gray, 1998].

При изучении митохондриальных транспортных РНК простейшего *Acanthamoeba castellani* в 13 из 16 исследованных тРНК предсказано существование от одного до трех сайтов эдитинга в трех первых парах нуклеотидов акцепторного стебля. Редактирование указанных сайтов должно было восстановить комплементарность оснований.

Все предсказанные замены были на самом деле обнаружены (рис. 10.6) [Lonergan, Gray, 1993; Price, Gray, 1998]. При этом происходил эдитинг U—A, G—A, A—G, U—G и U—C. Отметим, что в тРНК^{Ala} редактирование аномальной U_4—G_{69} пары не происходило, хотя в соседней паре (U_3—U_{70}) третий нуклеотид заменялся на аденин. По всей видимости, именно неправильное спаривание нуклеотидов 1, 2, 3 является критическим для дальнейшего участия тРНК в трансляции и потому обязательно редактируется. Изучение эдитинга тРНК у ряда других видов рода *Acanthamoeba* позволило обнаружить сходные замены [Lonergan, Gray, 1993; Price, Gray, 1999]. Совсем неожиданно такой же тип эдитинга был выявлен у гриба *Spizellomyces punctatus*.

Разнообразные типы вставок и замен нуклеотидов, обнаруженные в митохондриальных мРНК-матрицах *Physarum polycephalum* (см. выше), оказались справедливы и для тРНК митохондрий этого гриба. Показана независимость эдитинга каждого сайта от других и полное отсутствие полярности этого процесса [Gott, Visomirski-Robic, 1998].

Эдитинг транспортных мтРНК у *Physarum* тесно связан с транскрипцией: в непосредственной близости от прохождения транскрипционного ком-

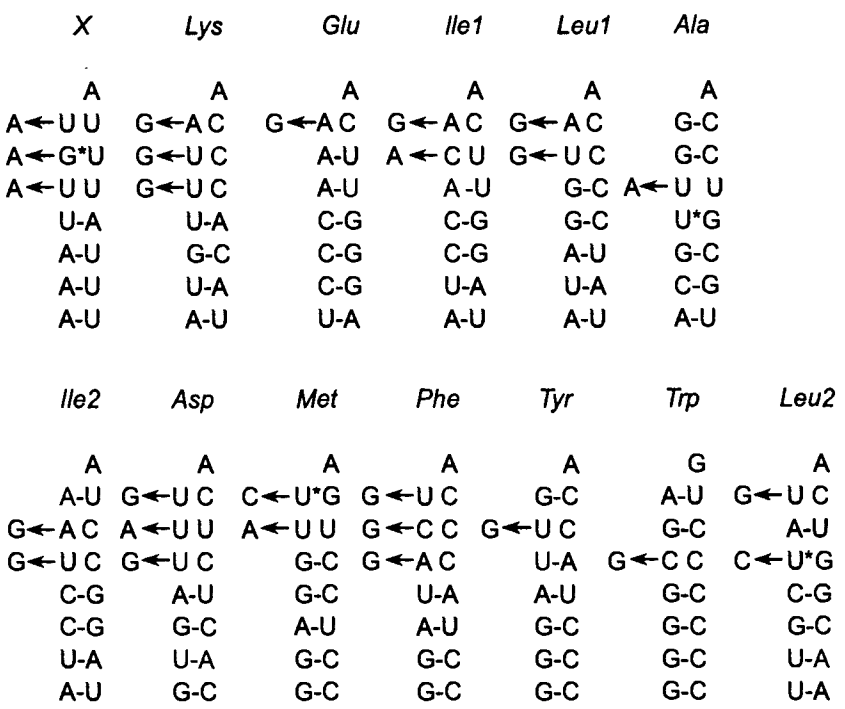


Рис. 10.6. Структура акцепторного участка 13 редактируемых тРНК *Acanthamoeba castellani,* кодируемых митохондриальной ДНК. Стрелки указывают 26 сайтов редактирования, которые приводят к созданию комплементарных пар G—C или A—U вместо первоначально неспаренных или ошибочно спаренных U*G / G*U. Все предполагаемые замены были подтверждены экспериментально [по Price, Gray, 1998]

плекса образуется некое "окошко возможностей", в котором могут происходить нуклеотидные вставки, и если в этот момент какая-то из них не реализуется, откорректировать тРНК позднее уже невозможно [Visomirski-Robic, Gott, 1997].

При редактировании транспортных РНК может изменяться не только их конформация, как в случае с *Acanthamoeba,* но и кодон-специфичность при аминоацилировании, как в случае с опоссумом *Didelphis virginiana.* Было обнаружено, что мт-тРНК^{Asp} ген этого вида несет антикодон GCC (глицин), а не аспарагин, как ожидалось по гомологии данного гена с однопроходными и плацентарными млекопитающими. При исследовании тРНК^{Asp} оказалось, что примерно половина молекул была отредактирована по 35-му нуклеотиду: C заменен на U (GUC). Нередактированные тРНК^{Asp} *in vitro* и *in vivo* связывались с глицином, отредактированные — с аспарагином [Price, Gray, 1998]. Интересно, что тРНК^{Gly}, которая обычно узнает все четыре глициновых кодона (GGN), у *Didelphis* из-за замены в N^{32} тРНК^{Gly} вместо четырех кодонов связывается только с двумя: GGA и GGG. Два других глициновых кодона, как уже упоминали, "берет на себя" нередактированная тРНК^{Asp} [Börner et al., 1995].

Такое необычное совмещение функций двух тРНК в одном гене, происходящее благодаря эдитингу, — пример предельно "экономного" использования крайне малого по размеру митохондриального генома животных [Price, Gray, 1998].

У одного из примитивных млекопитающих — утконоса *Ornithorhynchus anatinus* обнаружен эдитинг 3′-конца мт-тРНК^{Ser} — вместо последовательности $A_{68}C_{69}U_{70}U_{71}$ образовывалась $A_{68}C_{69}C_{70}C_{71}C_{72}C_{73}CCA$. При этом было показано, что на генном уровне (ДНК) 70-й и 71-й нуклеотиды перекрываются с нижележащим мт-тРНК^{Leu} геном, а значит, должны транскрибироваться вместе с последним [Yokobori, Pääbo, 1995]. Добавление нуклеотидов к 3′-концу молекул мт-тРНК происходит также у улиток, кальмаров и цыплят, но в этих случаях все добавленные нуклеотиды являются аденозинами [Price, Gray, 1998].

Митохондриальные ДНК растений, как известно, претерпели ряд рекомбинаций и мутаций в процессе эволюции, что привело к полной потере некоторых тРНК генов и инактивации других. Эдитинг "реанимирует" отдельные митохондриальные тРНК-матрицы, возвращая им способность к нормальному процессингу. У высших растений описано три случая эдитинга тРНК: C—U-замены происходят в тРНК^{Phe} бобов и картофеля [Maréchal-Drouard et al., 1996], тРНК^{Cys} энотеры [Binder et al., 1994] и тРНК^{His} лиственницы — первый известный случай тРНК-эдитинга у голосеменных [Maréchal-Drouard et al., 1996]. У всех трех видов тРНК-эдитинг предшествует процессингу, затем наблюдается быстрый процессинг отредактированных молекул, тогда как не прошедшие эдитинг тРНК не связываются с аминокислотами и деградируют. Вероятно, различия связаны с пространственной структурой тРНК, так как эдитинг ликвидирует неправильное спаривание, что облегчает узнавание тРНК-предшественников ферментами процессинга. Эти данные позволяют предположить, что редактирование может быть средством регуляции процессинга тРНК и таким путем определять уровень этих тРНК в клетке (рис. 10.7) [Maréchal-Drouard et al., 1996; Hoffmann et al., 2001].

У кинетопластных простейших все митохондриальные тРНК кодируются ядром и импортируются в кинетопласты. Ядерная тРНК(CCA) узнает стандартный триптофановый кодон UGG. В митохондриях эта же тРНК подвергается эдитингу первого нуклеотида антикодона: CCA превращается в UCA, что позволяет прочесть митохондриальный UGA как триптофан [Alfonzo et al., 1999].

Как осуществляется мт-тРНК эдитинг, неясно. Ничто не указывает на существование в данной системе молекул, подобных gРНК. Однако, поскольку эдитинг тРНК всегда происходит в двухцепочечных районах (D-, T-,

антикодоновом или акцепторном стебле), существует предположение, что участок напротив сайта эдитинга может представлять собой как бы встроенную gРНК-последовательность. Эдитинг тРНК, как и интронов, — явление достаточно редкое, предположительно он является следствием подобия вторичной структуры этих РНК "гибридным молекулам", образующимся между мРНК и gРНК [Price, Gray, 1998].

Таким образом, эдитинг тРНК описан в самых филогенетически отдаленных группах живых организмов — от простейших до млекопитающих и встречается как в ядерных, так и в митохондриальных системах транспортных РНК. Во всех известных случаях эдитинг захватывает двухцепочечные области. Механизм, обеспечивающий специфичность и избирательность данного процесса, пока не раскрыт, что предстоит сделать в ходе дальнейших исследований.

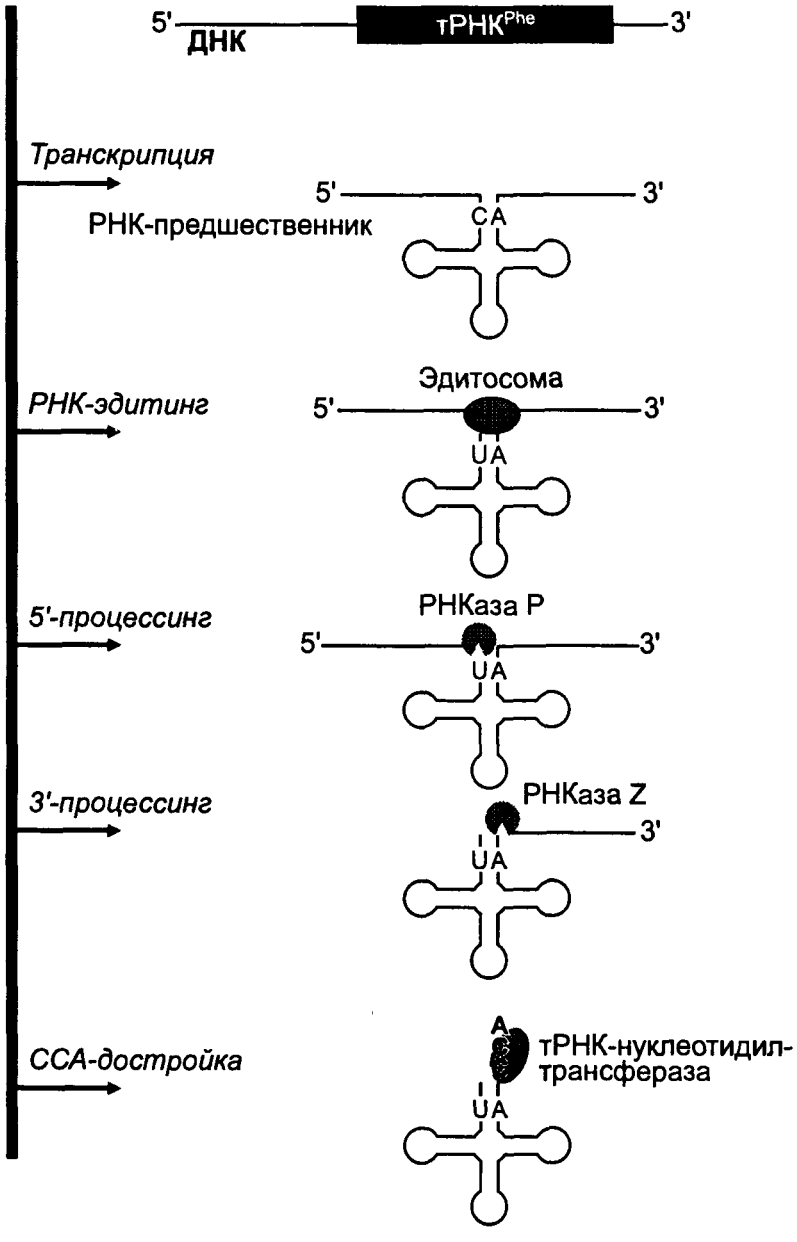


Рис. 10.7. Формирование тРНК^{Phe} в митохондриях растений. После транскрипции тРНК-предшественника происходит РНК-редактирование, которое приводит к образованию канонической пары U—A вместо некомплементарной C—A. Это является необходимым условием реакций эндонуклеолитического расщепления на 5'- и 3'-концах, окончательно тРНК молекула формируется добавлением 5'-CCA-3' триплета [по Hoffmann et al., 2001]

Эдитинг хлоропластных мРНК растений

Обнаружение РНК-редактирования в хлоропластах произошло при анализе секвенированного рибосомального гена *rpl2* у кукурузы.

Оказалось, что в геномной последовательности этого гена отсутствует инициирующий кодон ATG. У других видов — табака, маршанции — ATG-кодон в этом гене имеется. Тот же участок у кукурузы представлен триплетом ACG, поэтому первоначально было высказано предположение о том, что в хлоропластах кукурузы этот кодон может, как исключение, быть инициирующим [Hiratsuka et al., 1989]. Однако секвенирование кДНК *rpl2* кукурузы показало, что транскрипт несет обычный инициирующий кодон AUG. Так было установлено, что в мРНК произошла замена C—U, и был открыт эдитинг в хлоропластах [Hoch et al., 1991]. C—U-замены с образованием инициирующего кодона были также выявлены в генах *psbL* табака, шпината и др. [Kudla et al., 1992; Bock et al., 1993] и в *ndhD* генах нескольких видов [Neckermann et al., 1994].

Чтобы оценить, насколько распространен феномен эдитинга в хлоропластах растений, был предпринят скрининг нескольких белок-кодирующих областей в растениях разных видов. Такой скрининг состоит из: 1) сравнения аминокислотных последовательностей, теоретически предсказанных на основе секвенированных хлоропластных генов разных видов; 2) выявления позиций, в которых обнаруживаются различия аминокислотного состава и которые могут быть ликвидированы C—U-эдитингом на уровне мРНК; 3) экспериментального подтверждения такого редактирования путем секвенирования соответствующих кДНК [Bock et al., 1997].

На рис. 10.8 приведен результат анализа хлоропластного *ndhA* и гомологичного митохондриального *ndh1* генов, позволивший обнаружить четыре сайта эдитинга. Эдитинг первого сайта у кукурузы приводит к включению лейцина в состав белка *ndhA*, который у трех других исследованных видов кодируется геномно. Сходным образом восстанавливается лейциновый кодон в результате эдитинга сайтов II и III, причем последний — не только в хлоропластном, но и в митохондриальном транскрипте *ndh1* всех трех исследованных видов растений. Наконец, сериновый кодон в IV сайте эдитинга превращается у кукурузы, риса и табака в фенилаланиновый, который у филогенетически более древней маршанции кодируется геномно.

Таким образом, все обнаруженные аминокислотные замены в результате редактирования восстанавливают филогенетически "традиционные" последовательности аминокислот в белках, которые, очевидно, важны структурно и функционально. Этот вывод оказался справедлив почти для всех сайтов эдитинга, выявленных у хлоропластных мРНК.

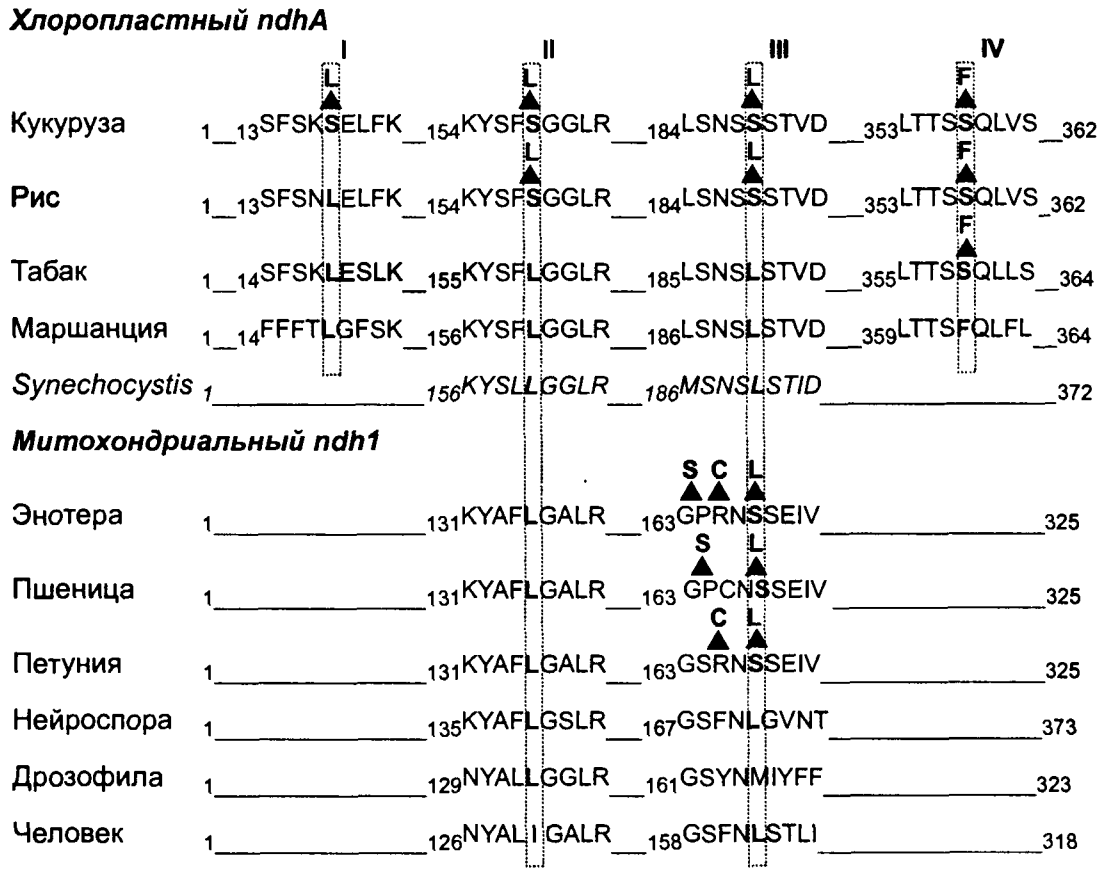


Рис. 10.8. Сравнение аминокислотных последовательностей *ndhA*-кодируемых полипептидов некоторых видов с их митохондриальными гомологами. Четыре позиции эдитинга в пластидах были определены компьютерным поиском и в дальнейшем подтверждены экспериментально [Maier et al., 1992]. Аминокислотные замены, происходящие в результате эдитинга, показаны стрелками. Примечательно совпадение позиции третьего сайта эдитинга между некоторыми хлоропластными *ndhA* и митохондриальными *ndh1* транскриптами [по Bock et al., 1997]

После того как была установлена полная нуклеотидная последовательность хлоропластного генома кукурузы, проведен компьютерный поиск сайтов эдитинга. С помощью секвенирования кДНК исследовали более 50% пластидных мРНК, которые сравнивали с соответствующими пластомными ДНК-последовательностями. Из 200 предполагаемых сайтов редактирования удалось обнаружить 27 C—U-замен [Bock et al., 1997]. На рис. 10.9 приведена карта пластидного генома кукурузы с сайтами эдитинга. Процент кодонов, изменяющихся в результате эдитинга, в хп-мРНК кукурузы оказался весьма низким — 0,13%. Тридцать один сайт редактирования пластома найден у табака [Hirose et al., 1999]. В целом в хлоропластном геноме растений выявляется значительно меньше сайтов эдитинга, чем в митохондриальном.

Подавляющее большинство замен в хлоропластных транскриптах затрагивают вторые нуклеотиды кодонов: 87% всех сайтов редактирования хло-

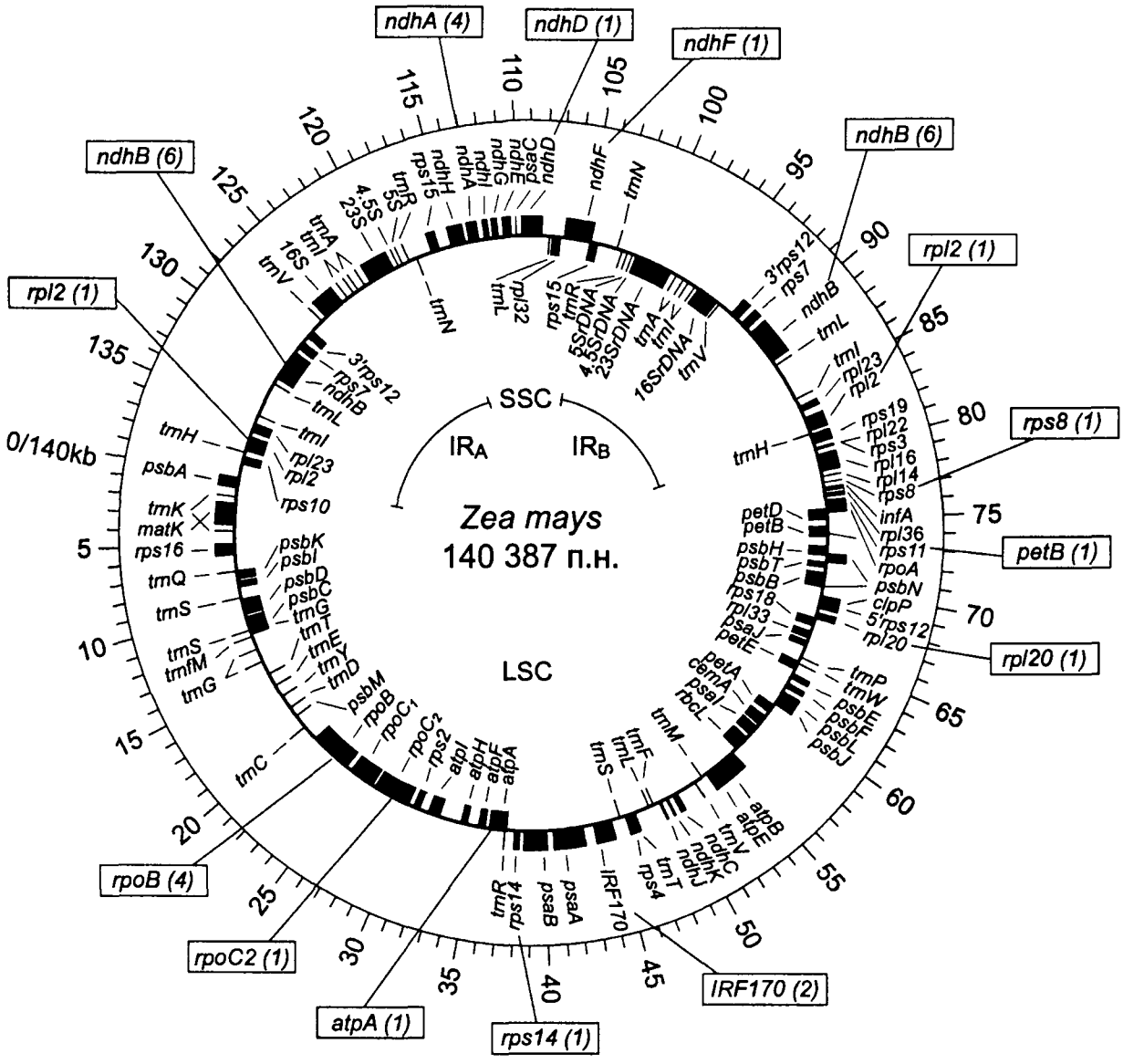


Рис. 10.9. Карта хлоропластного генома кукурузы. Гены, в которых обнаружены сайты эдитинга, взяты в рамки; числа в скобках — количество сайтов эдитинга в соответствующем гене [по Maier et al., 1995]

ропластных геномов кукурузы, табака, черной сосны. В 12% случаев эдитинг происходит в первом и лишь в 1% — в третьем нуклеотидах кодонов. Наиболее частые превращения — UCA→UUA (серин → лейцин) и CCA→CUA (пролин → лейцин) [Bock et al., 1997] (табл. 10.2).

Поиск сайтов эдитинга был проведен также в некодирующих областях хлоропластного генома — 3′- и 5′-фланкирующих участках генов и спейсерных участках полицистронных транскриптов. В результате обнаружен сайт эдитинга на расстоянии 10 нуклеотидов от инициирующего кодона *ndhG* гена у кукурузы и риса. C—U-замена в этом случае предположительно дестабилизирует вторичную структуру РНК молекулы, что может облегчить связывание с рибосомой [Bock et al., 1997]. Сайт эдитинга в интерцистрон-

Таблица 10.2

C—U-эдитинг в хлоропластных транскриптах [по Bock et al., 1997]

Первый нуклеотид кодона	Второй нуклеотид кодона				Третий нуклеотид кодона
	U	C	A	G	
U	Phe ←	1x Ser	→ Tyr	Cys	U
	Phe ←	3x Ser	Tyr	Cys	C
	Leu ←	13x Ser	Stop	Stop	A
	Leu ←	4x Ser	Stop	Trp	G
C	Leu ←	1x Pro	1x His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu ←	5x Pro	Gln	Arg	A
	Leu ←	1x Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met ← (старт / внутр.)	3x / 1x Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Примечание. Стрелки указывают направление редактирования кодона, над ними — число наблюдаемых изменений. Три случая превращений треонин—метионин создают старт-кодоны, четвертый (внутренний) приводит к образованию метионинового кодона внутри мРНК.

ном спейсере *psbE* оперона найден также в пластидной мРНК примитивного семенного растения *Ginkgo biloba* [Kudla, Bock, 1999]. До сих пор ни одного сайта эдитинга не обнаружено ни в рРНК, ни в тРНК хлоропластов. Во всех случаях эдитинга хлоропластной мРНК высших растений выявлены только C—U-превращения, тогда как у низших растений обнаружены также U—C-замены [Yoshinaga et al., 1996].

Редактирование в хлоропластах, процессинг и трансляция

Поскольку эдитинг приводит к восстановлению функционально важных аминокислотных последовательностей, *a priori* он должен предшествовать трансляции, поскольку в противном случае могут синтезироваться функционально неполноценные белки с нередактированных мРНК. Действительно, анализ кукурузных первичных полицистронных транскриптов молекул *petB-petD* и пре-мРНК *ycf3*, еще не подвергшихся сплайсингу, показал, что редактирование этих молекул уже полностью или частично состоялось [Freyer et al., 1993; Ruf et al., 1994].

Эдитинг в хлоропластах чаще всего происходит во вторых нуклеотидах кодонов, наиболее частые превращения при этом UCA — UUA (табл. 10.2). Такая закономерность приводит к вопросу о существовании связи между эдитингом и трансляцией. Идеальной системой для проверки этого предположения являются мутанты ячменя *albostrians,* содержащие в белых секторах своих листьев дефектные пластидные рибосомы и потому не способные к трансляции. Ранее обнаруженные три сайта эдитинга хлоропластного гена *rpoB,* а также инициирующий кодон *rpl2* транскрипта редактировались столь же эффективно в мРНК, изолированных из белых секторов мутантов. По-видимому, несмотря на определенные кодонные предпочтения, эдитинг в пластидах не зависит от рибосом и, следовательно, от трансляции в этих органеллах. Другим выводом из этих экспериментов была гипотеза о неучастии белков хлоропластного кодирования в эдитинге: все необходимые для пластидного эдитинга пептиды кодируются ядром и затем импортируются [Hess et al., 1994; Maier et al., 1996].

Более поздние исследования, однако, показали, что некоторые сайты эдитинга в хлоропластах (например, *psbL, psbE, ndhD,* четыре из восьми в мРНК *ndhB*) зависят от трансляции в этих органеллах. Вероятно, продукты трансляции в этих случаях задействованы в облегчении доступности сайта эдитинга для гипотетического эдитосомного комплекса. Подавление трансляции полностью аннулирует эдитинг только в некоторых сайтах, более типичным является неполное угнетение редактирования [Karcher, Bock, 1998].

Таким образом, эдитинг является ранним процессом корректирования мРНК в пластидах, не зависящим от сплайсинга и превращения полицистронных матриц в моноцистронные, но может в ряде случаев зависеть от каких-то продуктов трансляции хлоропластных генов. Ни сами эти продукты, ни их роль в эдитинге пока не установлены.

Специфичность эдитинга мРНК хлоропластов

Проблема специфичности, т.е. нахождения сайтов эдитинга, не решена ни для митохондриальной, ни для пластидной мРНК растений. Число сайтов эдитинга в геноме пластид в десятки раз меньше, чем у митохондрий, тем не менее для них до сих пор не удалось найти ни консенсусных последовательностей, ни gРНК-подобных молекул [Bock et al., 1997; Marchfelder et al., 1998].

Безуспешными пока остаются попытки создать систему *in vitro* для изучения эдитинга пластидной мРНК. Однако весьма информативным при анализе эдитинга оказался метод трансформации пластид [Bock et al., 1994]. Так, с помощью трансформации в пластоме табака ген *psbF* был модифицирован в шпинатный, который отличается от табачного одним нуклеотидом. У шпината в мРНК *psbF* происходит эдитинг этого нуклеотида, в результате чего кодон UCU превращается в UUU (сериновый остаток замещается фенилаланиновым). У табака в данном сайте эдитинг отсутствует, так как триплет UUU кодируется геномно. "Шпинатный кодон" UCU гена *psbF* не редактировался в пластидах табака, что приводило к замедлению роста, снижению концентрации хлорофилла и некоторым другим аномалиям. Данный эксперимент явился первым прямым доказательством роли эдитинга в синтезе функционально полноценных белков пластид, а также продемонстрировал необходимость каких-то цис- или транс-факторов, необходимых для эдитинга и отсутствующих в рассмотренной системе [Bock et al., 1994]. В дальнейших исследованиях удалось достигнуть частичного восстановления способности к эдитингу в результате слияния трансформированных табачных клеток со шпинатными протопластами. Авторы делают вывод о наличии транс-факторов в ядре шпината, которые и определяют специфичность эдитинга. Природа этих транс-факторов пока остается неизвестной [Bock, Koop, 1997].

Метод трансформации хлоропластной ДНК также успешно использовался для определения цис-элементов, контролирующих специфичность эдитинга. При анализе методом трансформации второго сайта редактирования гена *rpoB* табака было показано, что сильнейший эффект оказывает нуклеотид, который находится на "–20" позиции 5′ от сайта эдитинга [Reed et al., 2001].

Используя трансформацию пластидной ДНК, удалось установить, что цис-активные элементы для эдитинга инициирующего кодона *psbL* транскрипта табака расположены в пределах 98-го нуклеотидного фрагмента, окружающего сайт. Оказалось также, что наличие трансформированного *psbL* гена снижает эффективность эдитинга эндогенной *psbL* мРНК, не

влияя при этом на редактирование других мРНК. Авторы делают вывод о том, что дополнительная (трансгенная) и собственная *psbL* мРНК молекулы конкурируют за специфический транс-фактор эдитинга, природа которого неясна [Chaudhuri et al., 1995].

В пользу существования транс-факторов, контролирующих эдитинг в пластидах, свидетельствуют также данные о сравнении сайтов эдитинга *rpoB* транскриптов у ячменя и кукурузы: один из четырех соответствующих сайтов у ячменя не редактируется, хотя фланкирующие последовательности (19 предшествующих нуклеотидов и 24 нижележащих) в точности идентичны таковым у кукурузы, у которой эдитинг происходит. Предположительно наряду с цис-последовательностями, фланкирующими сайт эдитинга, существуют какие-то узнающие элементы, которые у ячменя для данного сайта были, вероятно, потеряны в ходе эволюции [Zelts et al., 1993].

Цис-элементы, контролирующие эдитинг *ndhB* — самого интенсивно редактируемого из всех пластомных генов (рис. 10.9), анализировались при изучении транспластомных растений табака *in vivo*. Создавали химерные конструкции из изучаемых сайтов эдитинга и фланкирующих их последовательностей разной длины. Неожиданно было показано, что разные сайты эдитинга одного и того же гена нуждаются в совершенно разных по длине (или по удаленности от сайта) цис-элементах. При этом замена или делеция нуклеотида в положении -1 (предшествующем сайту эдитинга) резко и избирательно подавляла редактирование в данном сайте, т.е. положение 5′-нуклеотида, ближайшего к любому сайту эдитинга, является критическим. Для двух соседних сайтов эдитинга *ndhB* гена установлена общая цис-последовательность длиной 11 нуклеотидов, фланкирующая 5′-конец и контролирующая редактирование обоих. Эта 11-членная последовательность напоминает критическую "узнающую" последовательность в редактируемой ядерной apoB мРНК млекопитающих [Chang et al., 1998]. В обоих случаях предполагается, что данная последовательность служит связующим звеном между мРНК и гипотетической "эдитосомой" [Bock et al., 1996].

В дальнейшем было установлено, что расстояние между 11-членной цис-последовательностью и двумя сайтами эдитинга, которые она контролирует, является критическим. Только те цитидины, которые находятся на определенном "правильном" расстоянии от этой 5′-фланкирующей последовательности, узнаются системой эдитинга, причем расстояние это контролируется чрезвычайно точно. Удалось добиться эдитинга "неправильного" цитидина, поместив его на нужном расстоянии от вышележащей цис-последовательности (рис. 10.10). Показано, что механизм редактирования в пластидах имеет некоторое сходство с редактированием ядерного гена *apoB* у млекопитающих [Chang et al., 1998]: мРНК молекулы несут цис-элементы, определя-

ющие связывание с гипотетической "эдитосомой" (а возможно, и сборку самой эдитосомы), транс-элементы неизвестной пока природы выполняют роль "указателей" сайта эдитинга [Hermann, Bock, 1999].

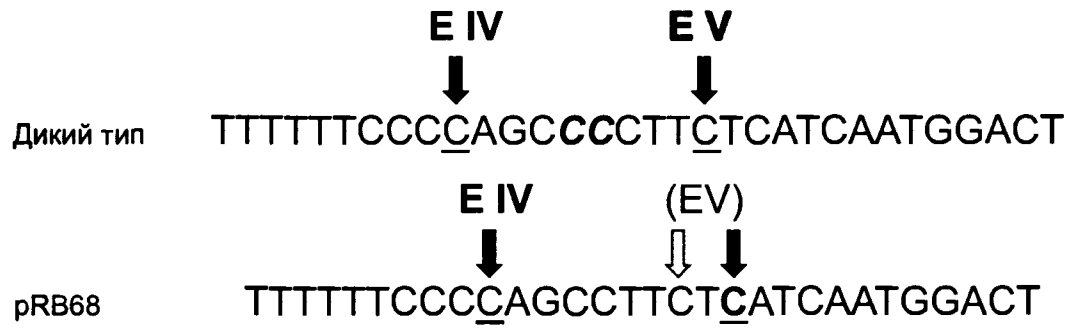


Рис. 10.10. РНК-эдитинг в трансластомных растениях табака. Сдвиг сайта эдитинга EV *ndhB* гена к гетерологичному цитидину у трансластомной линии табака, несущей делецию двух нуклеотидов (***CC***) у табака дикого типа. Расстояние между сайтом EIV и новым сайтом (⇩) сохраняется неизменным — девять нуклеотидов. Цитидин, редактирующийся в мРНК дикого типа (EV), в линии pRB68 не редактируется [по Hermann, Bock, 1999]

Изменение или удаление нуклеотидов 3′-фланкирующего района почти не влияло на эдитинг изученных сайтов [Bock et al., 1996]. 5′-фланкирующий участок, как уже обсуждалось, весьма важен в контроле эдитинга не только хлоропластов, но и митохондрий.

Для того чтобы установить, является ли данная 11-членная последовательность типичной при редактировании разных мРНК пластид или она сайт-специфична, был выполнен компьютерный скрининг хлоропластного генома табака. Не удалось выявить гомологичных последовательностей, 5′-фланкирующих другие сайты эдитинга в хлоропластах. Поэтому предполагается, что выявленная последовательность индивидуальна для данной пары близко расположенных сайтов, она связывается со специфическими транс-факторами (пока не найденными [Chaudhuri et al., 1995]), которые и запускают эдитинг [Bock et al., 1996].

В процессе поиска транс-факторов эдитинга предпринято несколько попыток найти gРНК в пластидах. Фракции низкомолекулярных РНК анализировались путем гибридизации, осуществлялся компьютерный поиск возможных кандидатов на эту роль в пластоме методом "нокаута" (избирательного разрушения) [Rochaix, 1997; Bock et al., 1999]. Исследовался также участок пластома табака, предположительно кодирующий gРНК для эдитинга *psbL* гена. Однако все эти попытки до сих пор не привели к обнаружению gРНК молекул в пластидах, и поиск факторов специфичности продолжается [Hermann, Bock, 1999].

Ферменты эдитинга пластидных мРНК

До сих пор не установлено, какие ферменты осуществляют С—U-редактирование пластидных мРНК. Основными кандидатами на эту роль, как и в случае митохондриального эдитинга, являются цитидиндезаминаза и трансаминазы, обратимо превращающие С в U [Bock, 1998]. Гипотетическая "эдитосома", как предполагается, формирует определенную пространственную конфигурацию, обеспечивающую избирательное ферментативное дезаминирование некоторых цитидинов. Однако клонированный и секвенированный ген цитидиндезаминазы *Arabidopsis thaliana*, как было показано, не имеет сродства к РНК и поэтому участие его в С—U-превращениях маловероятно [Faivre-Nitschke et al., 1999]. Не изученным остается вопрос о ферментах, катализирующих встречающиеся у низших растений обратные превращения U—С [Yoshinaga et al., 1996].

Сходство пластидных и митохондриальных систем РНК-эдитинга у растений

Основным типом превращений как в митохондриальных, так и в хлоропластных РНК является С—U-эдитинг. Крайне редко в обоих типах органелл отмечается U—С-эдитинг [Shuster et al., 1990; Yoshinaga et al., 1996].

Сходство проявляется также в наиболее частом редактировании вторых нуклеотидов кодонов, при этом в обоих случаях, как правило, наблюдаются определенные типы превращений (табл. 10.2). Примечательно, что полное отсутствие эдитинга у маршанции также затрагивает как митохондриальный, так и пластидный геномы [Bock et al., 1997].

Как в митохондриях, так и в хлоропластах эдитингу подвергаются преимущественно мРНК; при этом редкие случаи эдитинга описаны для митохондриальных тРНК и рРНК [Binder et al., 1994; Maréchal-Drouard et al., 1996], однако ни одного такого случая до сих пор не зафиксировано в пластидах [Maier et al., 1996]. Благодаря гомологии между хлоропластными *ndhA* и митохондриальными *ndh1* генами удалось показать, что эдитинг в транскриптах этих генов происходит в гомологичных позициях (см. рис. 10.8) [Maier et al., 1992].

Несколько консенсусных последовательностей, связанных непосредственно с сайтами эдитинга, было обнаружено для транскриптов негомологичных генов пластид и митохондрий: *rpoB, ndhB, cox3, nad3, cob*. Это позволило предположить, что данные сайты могут узнаваться с помощью одних и тех же транс-факторов, определяющих специфичность. И хотя

gРНК молекул ни для хлоропластов, ни для митохондрий пока обнаружить не удалось, теоретически это возможно [Maier et al., 1996].

Для проверки предположения, могут ли митохондриальные сайты успешно редактироваться в пластидах, были созданы трансгенные растения табака, несущие в своих пластидах митохондриальные *cox2* последовательности петунии. Ни один из семи сайтов эдитинга, активных в митохондриях, не редактировался в пластидах [Sutton et al., 1995]. Позднее исследовалась обратная ситуация: фрагмент пластидной ДНК, несущий *rpoB* ген и перенесенный у риса в ходе эволюции в митохондриальный геном, также не редактировался ни в одном из трех сайтов, активных в пластидной мРНК [Zeltz et al., 1996]. Это говорит о том, что сходство не безгранично — существуют определенные различия механизмов эдитинга в данных органеллах.

Основным отличием процесса эдитинга в митохондриях от пластидного является его разная частота. В митохондриях растений эдитингу подвергаются 500—1200 сайтов, что составляет до 2% всех нуклеотидов белок-кодирующих областей, в то время как в пластидах — 25—30 сайтов (0,1%). Причина столь резких различий пока не ясна, равно как загадочны и истоки сходства эдитинга в митохондриях и пластидах [Bock et al., 1997].

Происхождение и эволюция РНК-редактирования

В различных генетических системах в редактировании задействованы совершенно непохожие механизмы: вероятно, в эволюции мРНК-эдитинг неоднократно возникал заново [Hermann, Bock 1999]. На кардинальный вопрос: является ли эдитинг "реликтом" пребиотического РНКового мира или это позднейшее приобретение — до сих пор не получено однозначного ответа. С одной стороны, отсутствие эдитинга в органеллах водорослей и некоторых других низших растений (рис. 10.11) [Steinhauser et al., 1999] говорит в пользу более позднего его появления. Однако с этой точки зрения плохо объяснимы некоторые факты. Так, спектр сайтов эдитинга в транскриптах *ndhB* и *petB* генов у кукурузы имеет больше сходства с таковыми у табака, чем у ячменя [Freyer et al., 1993]. В этом случае проще предположить, что эдитинг был присущ изначально всем растениям, затем у отдельных видов в определенных сайтах терялся в результате, например, возникновения С—Т-мутаций на ДНК-уровне, т.е. более предпочтительной кажется "реликтовая" модель [Bock et al., 1997].

Возникновение эдитинга часто связывают с выходом растений на сушу. Действительно, редактирование выявлено во всех группах наземных растений, включая мхи, печеночники (кроме некоторых видов маршанциевых), папоротники и высшие семенные растения [Malek et al., 1996]. 7 видов *Marchantiidae* составляют удивительное исключение, в то время как у *Junger-*

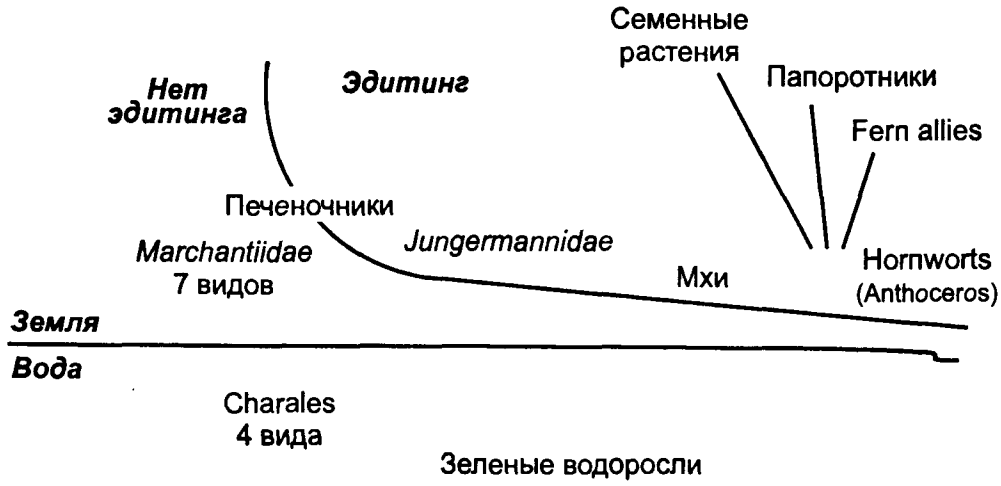


Рис. 10.11. Схема распространения РНК-эдитинга (РНК-эдитинг обнаружен во всех существующих группах наземных растений, кроме *Marchantiidae*) [по Marchfelder et al., 1998]

mannidae — другой группы печеночников — наблюдается типичное для наземных растений редактирование мРНК органелл [Steinhauser et al., 1999]. В табл. 10.3 в обобщенном виде представлено многообразие систем РНК-редактирования, отраженное в публикациях ко времени написания этой главы.

Существует определенная корреляция между количеством цитидинов в отдельном гене и частотой C—U-эдитинга. Остается неясным, является ли увеличенная частота эдитинга компенсирующей (приводящей к снижению содержания G—C) или она оказывается чисто вероятностным следствием возрастания количества цитидинов [Malek et al., 1996].

После переноса органельных генов в ядро они, как правило, перестают редактироваться [Bock et al., 1997].

Все рассмотренные в этой главе факты приводят к заключению, что эдитинг — весьма распространенный процесс в органельных мРНК растений, особенно в митохондриях, существование которого требует значительных информационных и энергетических ресурсов организма. Что же приобретают организмы в результате мРНК редактирования?

С увеличением масштабов исследования эдитинга, несомненно, расширится спектр организмов, у которых будет обнаружена посттранскрипционная модификация РНК-матриц. Однако очевидно, что данный феномен распространен преимущественно во внеядерных генетических системах — митохондриях и хлоропластах, тогда как случаи эдитинга ядерных транскриптов чрезвычайно редки. Эдитинг имеет адаптивное значение, в противном случае такой энергоемкий процесс не сохранялся бы в природе. Пример с паразитической *Leishmania tarentolae,* у которой культивирование *in vitro* приводит к утрате эдитинга мРНК значительного количества белков, не нужных в культуре, — свидетельство лабильности этого признака.

Таблица 10.3

Перечень систем РНК-эдитинга, обнаруженных у разных организмов [по Bock et al., 1997, с дополнениями из Benne, Speyer, 1998]

Таксон	Тип эдитинга	Клеточный компартмент	Источник
Trypanosoma	U-инсерции/делеции	Митохондрии	Benne, 1994
Acanthamoeba castellani, *Spizellomyces punctatus*	U—A, G—A, A—G, U—G, U—C	»	Lonergan, Gray, 1993; Laforest et al., 1997
Physarum polycephalum	Инсерции нуклеотидов (в основном C), C—U-конверсии	»	Mahendran, 1991; Gott et al., 1993; Gott, Visomirski-Robic, 1998
Дельта вирус гепатита человека	A—I-конверсия	Цитоплазма хозяина	Polson et al., 1996
Вирусы *Ebola*	A-инсерция	» »	Volchkov et al., 1995
Парамиксовирусы	G-инсерция	» »	Thomas et al., 1988
Высшие растения	C—U-конверсии U—C-конверсии	Митохондрии	Bonnard et al., 1992; Shuster, Brennicke, 1994
» »	C—U-конверсии	Хлоропласты	Kössel et al., 1993
Млекопитающие	C—U-конверсии A—I-конверсии U—C-конверсии G—A-конверсии U—A-конверсии	Ядро	Chen et al., 1987; Powell et al, 1987; Sommer et al., 1991; Sharma et al., 1994; Rajput et al., 1994; Novo et al., 1995
Улитки, однопроходные, сумчатые	Различные нуклеотидные конверсии	Митохондрии	Yokobori, Pääbo, 1996; Janke, Pääbo, 1993
Drosophila melanogaster	A—I-конверсии	Ядро	Petschek et al., 1996

Возможно, в определенных случаях эдитинг задействован в тонкой регуляции количества транслируемых мРНК. Например, редактирование мРНК — образование инициирующего кодона в *nad1* гене пшеницы — является более быстрым, чем синтез мРНК *de novo* [Chapdelaine, Bonen, 1991].

Адаптивная роль эдитинга в настоящее время установлена в нижеописанных органельных и ядерных генетических системах [Даниленко, 2001].

— Эдитинг мРНК непосредственно влияет на трансляцию путем создания или ликвидации старт- и стоп-кодонов и аннулирования сдвига рамки считывания (кинетопластный эдитинг, органельный эдитинг у растений, инсерционный эдитинг в митохондриях *Physarum*).

— В клеточных органеллах транслируются обычно только прошедшие эдитинг мРНК. В случае трансляции неполностью отредактированных матриц синтезированные белки не включаются в функционально важные комплексы и вскоре деградируют.

— Показано совмещение функций двух тРНК в одном гене, происходящее при участии эдитинга (в митохондриях опоссума *Didelphis virginiana*). Ряд митохондриальных транспортных РНК в результате эдитинга восстанавливают способность к нормальному процессингу и участию в трансляции. Не прошедшие эдитинг тРНК не связываются с аминокислотами и деградируют (высшие растения, примитивные млекопитающие, моллюски и др.).

— Благодаря эдитингу два функционально различающихся белка синтезируются на мРНК-матрице с одного и того же ядерного гена у млекопитающих (ApoB, GluR) [Navaratnam et al., 1995; Yang et al., 1995].

* * *

Таким образом, феномен РНК-редактирования — строго специфическое посттранскрипционное изменение информационных и структурных РНК, состоящее во вставках, заменах и выпадениях нуклеотидов.

РНК-эдитинг обнаружен во множестве организмов, относящихся к различным систематическим группам и находящихся на разных ступенях эволюционной лестницы — от вирусов, простейших, миксомицетов до высших растений и млекопитающих.

Распространено РНК-редактирование преимущественно во внеядерных генетических системах: хлоропластах и митохондриях различных систематических групп. Очевидно, малые по размеру геномы органелл являются более пластичными и благодаря своей множественности более безопасными компартментами клетки для эволюционного становления эдитинга.

Механизм эдитинга во многом остается загадкой. Как минимум, гипотетическая "эдитосома" должна: 1) узнавать сайт редактирования; 2) идентифицировать правильный нуклеотид, который должен быть вставлен, или заместить редактируемый; 3) катализировать реакции эдитинга.

Специфичность эдитинга может определяться с помощью ядерно кодируемых РНК-проводников (gРНК), которые были обнаружены в некоторых

(но далеко не во всех) системах. Специфичность процесса редактирования в митохондриях и пластидах растений определяется сочетанием *цис*-(органельных) и *транс*-(ядерных) факторов, которые также пока не удалось идентифицировать.

Охарактеризован фермент, участвующий в эдитинге ядерного гена *apoB* млекопитающих — им оказалась цинк-зависимая цитидиндезаминаза [Navaratnam et al., 1998]. Предположительно цитидиндезаминазы участвуют в C—U-превращениях и в других системах. В инсерционном эдитинге кинетопластных простейших вставки уридинов осуществляются, вероятно, с помощью терминальной уридинтрансферазы (TUTазы).

РНК-эдитинг — необычный, сложный, требующий координирования большого количества факторов энергоемкий генетический процесс, возникновение которого в эволюции и разнообразные проявления во многих генетических системах являются непреложными, хотя во многом пока непонятными феноменами.

Литература

Даниленко Н.Г. РНК-эдитинг: генетическая информация корректируется после транскрипции // Генетика. 2001. Т. 37, № 3. С. 294—316.

Колесников А.А., Шониан Г., Пресбер В. Редактируемый участок кинетопластного гена MURF4 (ATPase 6) у лейшманий имеет сходную структуру // Молекулярная биология. 2000. Т. 34, № 2. С. 210—213.

Alfonzo J.D., Blanc V., Estevez A.M. et al. C to U editing of the anticodon of imported mitochondrial tRNA(Trp) allows decoding of the UGA stop codon in *Leishmania tarentolae* // EMBO J. 1999. Vol. 18, No. 24. P. 7056—7062.

Begu D., Graves P.V., Domec C. et al. RNA editing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9 mRNA: direct protein and cDNA sequencing // Plant Cell. 1990. Vol. 2. P. 1283—1290.

Benne R. RNA editing: how a message is changed // Curr. Opinion in Genet. and Devel. 1996. Vol. 6. P. 221—231.

Benne R. RNA editing in trypanosomes // Eur J. Biochem. 1994. Vol. 221. P. 9—23.

Benne R., Van den Burg J., Brakenhoff J. et al. Major transcript of the frameshift *coxII* from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA // Cell. 1986. Vol. 46. P. 819—826.

Binder S., Marchfelder A., Brennicke A. RNA editing of $tRNA^{Phe}$ and $tRNA^{Cys}$ in mitochondria of *Oenothera berberiana* is initiated in precursor molecules // Mol. Gen. Gen. 1994. Vol. 244. P. 67—74.

Blanc V., Jordana X., Litvak S., Araya A. Control of gene expression by base deamination: the case of RNA editing in wheat mitochondria // Biochimie. 1996. Vol. 78. P. 511—517.

Bock R. Analysis of RNA editing in plastids // Methods: A companion to methods in enzymology. 1998. Vol.15. P. 75—83.

Bock R., Albertazzi F., Freyer R. et al. Transcript editing in chloroplasts of higher plants // Eukaryotism and Symbiosis. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. P. 123—137.

Bock R., Drescher A., Ruf S. Reverse genetics in higher plant plastids // From Symbiosis to Eukaryotism. Endocytobiology VII. Geneva: Geneva University Press, 1999. P. 427—437.

Bock R., Hagemann R., Kössel H., Kudla J. Tissue-specific and stage-specific modulation of RNA-editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids — a new regulatory mechanism? // Mol. Gen. Gen. 1993. Vol. 240. P. 238—244.

Bock R., Hermann M., Kössel H. In vivo dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing // The EMBO J. 1996. Vol. 15(18). P. 5052—5059.

Bock R., Koop H.U. Extraplastidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts // EMBO J. 1997. Vol. 16(11). P. 3282—3288

Bock R., Kössel H., Maliga P. Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype // EMBO J. 1994. Vol. 13(19). P. 4623—4628.

Bonnard G., Grienenberger J.M. A gene proposed to encode a transmembrane domain of an ABC transporter is expressed in wheat mitochondria // Mol. Gen. Gen. 1995. Vol. 246. P. 81—99.

Bonnard G., Gualberto J.M., Lamattina L., Grienenberger J.M. RNA editing in plant mitochondria // CRC Crit. Rev. Plant Sci. 1992. Vol. 10. P. 503—524.

Börner G.V., Morl M., Wissinger B. et al. RNA editing of a group II intron in *Oenothera* as a prerequisite for splicing // Mol. Gen. Gen. 1995. Vol. 246. P. 739—744.

Chang B.H.-J., Lau P.P., Chan L. Apolipoprotein B mRNA editing // Modification and editing of RNA. Washington: ASM Press, 1998. P. 325—342.

Chapdelaine Y., Bonen L. The wheat mitochondrial gene for subunit-I of the NADH dehydrogenase complex — a trans-splicing model for this gene-in-pieces // Cell. 1991. Vol. 65. P. 465—472.

Chaudhuri S., Carrer H., Maliga P. Site-specific factor involved in the editing of the *psbL* mRNA in tobacco plastids // EMBO J. 1995. Vol. 14. P. 2951—2957.

Chen S.H., Habib G., Yang C.Y. et al. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon // Science. 1987. Vol. 238. P. 363—366.

Covello P.S., Gray M.W. RNA editing in plant mitochondria // Nature. 1989. Vol. 341. P. 662—666.

Covello P.S., Gray M.W. Differencies in editing at homologous sites in messenger RNAs from angiosperm mitochondria // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 5189—5196.

Faivre-Nitschke S.E., Grienenberger J.-M., Gualberto J.M. A prokaryotic-type cytidine deaminase from *Arabidopsis thaliana* — gene expression and functional characterization // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 263, No. 3. P. 896—903.

Freyer R., Hoch B., Neckerman K. et al. RNA editing in maize chloroplasts is a processing step independent of splicing and cleavage to monocistronic mRNAs // Plant J. 1993. Vol. 4. P. 621—629.

Giege P., Brennicke A. RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96, No. 26. P. 15324—15329.

Gonzalez D.H., Bonnard G., Grienenberger J.-M. A gene involved in the biogenesis of c-type cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria // Curr. Genet. 1993. Vol. 21. P. 248—255.

Gott J.M., Visomirski-Robic L.M. RNA editing in *Physarum* mitochondria // Modification and Editing of RNA. Washington: ASM Press, 1998. P. 395—411.

Gott J.M., Visomirski L.M., Hunter J.L. Substitutional and insertional RNA editing of the cytochrome *c* oxidase subunit I mRNA of *Physarum polycephalum* // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 25483—25486.

Grohmann L., Thieck O., Herz U. et al. Translation of nad9 mRNAs in mitochondria of *Solanum tuberosum* is restricted to completely edited transcripts // Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 3304—3311.

Gualberto J.M., Bonnard G., Lamattina L., Grienenberger J.-M. Expression of the wheat mitochondrial *nad3–rps12* transcription unit: correlation between editing and mRNA maturation // Plant Cell. 1991. Vol. 3. P. 1109—1120.

Gualberto J.M., Lamattina L., Bonnard G. et al. RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences // Nature. 1989. Vol. 341. P. 660—662.

Gualberto J.M., Weil J.-H., Grienenberger J.-M. Editing of wheat *coxIII* transcript: evidence for twelve C-to-U and one U-to-C conversions and for sequence similarities around editing sites // Nucl. Acids Res. 1990. Vol.18. P. 3771—3776.

Hajduk S.L., Sabatini R.S. Mitochondrial mRNA editing in kinetoplastid protozoa // Modification and Editing of RNA. Washington: ASM Press, 1998. P. 377—393.

Hanson M.R., Sutton C.A., Lu B. Plant organellar gene expression: altered by RNA editing // Trends Plant Sci. 1996. Vol. 1. P. 57—64.

Hermann M., Bock R. Transfer of RNA-editing activity to novel sites suggests a critical role of spacing in editing–site recognition // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96. P. 4856—4861.

Hernould M., Mouras A., Litvak S., Araya A. RNA editing of the mitochondrial *atp9* transcript from tobacco // Nucl. Acids Res. 1992. Vol. 20. P.1809.

Hess W.R., Hoch B., Zeltz P. et al. Inefficient *rpl2* splicing in barley mutants with ribosome-deficient plastids // Plant Cell. 1994. Vol. 6. P. 1455—1465.

Hiesel R., Wissinger B., Schuster W., Brennicke A. RNA editing in plant mitochondria // Science. 1989. Vol. 246. P. 1632—1634.

Hiesel R., Wissinger B., Brennicke A. Cytochrome oxidase subunit II mRNAs in *Oenothera* mitochondria are edited at 24 sites // Curr. Genet. 1990. Vol. 18. P. 371—375.

Hiesel R., Combettes B., Brennicke A. Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the bryophyta // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 629—633.

Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R. et al. The complete sequence of the rice *(Oryza sativa)* chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of cereals // Mol. Gen. Gen. 1989. Vol. 217. P.185—194.

Hirose T., Kusumegi T., Tsudzuki T., Sugiura M. RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity // Mol. Gen. Gen. 1999. Vol. 262, No. 3. P. 462—467.

Hoch B., Maier R.M., Appel K. et al. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon // Nature. 1991. Vol. 353. P. 178—180.

Howad W., Kempken F. Cell type-specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 11090—11095.

Janke A., Pääbo S. Editing of a tRNA anticodon in marsupial mitochondria changes its codon recognition // Nucl. Acids Res. 1993. Vol. 21. P. 1523—1524.

Karcher D., Bock R. Site-selective inhibition of plastid RNA editing by heat shock and antibiotics: a role for plastid translation in RNA editing // Nucl. Acids Res. 1998. Vol. 26, No. 5. P. 1185—1190.

Kössel H., Hoch B., Maier R.M. et al. RNA editing in chloroplasts of higher plants // Plant mitochondria. VCH, Weinheim, 1993. P. 93—102.

Kubo N., Kadowaki K. Involvement of 5′ flanking sequence for specifying RNA editing sites in plant mitochondria // FEBS Lett. 1997. Vol. 413, No.1. P. 40—44.

Kudla J., Igloi G.L., Metzlaff M. et al. RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* messenger RNA by a C to U substitution within the initiation codon // EMBO J. 1992. Vol. 11. P. 1099—1103.

Kumar R., Levings C.S. III. RNA editing of a chimeric maize mitochondrial gene transcript is sequence specific // Curr. Genet. 1993. Vol. 23. P. 154—159.

Laforest M.G., Roewer I., Lang B.F. Mitochondrial tRNAs in the lower fungus *Spizellomyces punctatus:* tRNA editing and UAG "stop" codons recognized as leucine // Nucl. Acids Res. 1997. Vol. 25. P. 626—632.

Lippok B., Brennicke A., Wissinger B. Differential RNA editing in closely related introns in *Oenothera* mitochondria // Mol. Gen. Gen. 1994. Vol. 243. P. 39—46.

Lonergan K.M., Gray M.W. Predicted editing of additional transfer RNAs in *Acanthamoeba castellani* mitochondria // Nucl. Acids Res. 1993. Vol. 21. P. 4402.

Lu B., Wilson R.K., Phreaner C.G. et al. Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene // Mol. Cell Biol. 1996. Vol. 16. P. 1543—1549.

Maas S., Gerber A.P., Rich A. Identification and characterization of a human tRNA-specific adenosine deaminase related to the ADAR family of pre-mRNA editing enzymes // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96. P. 8895—8900.

Maas S., Kim Y.G., Rich A. Sequence, genomic organization and functional expression of the murine tRNA-specific adenosine deaminase ADAT // Gene. 2000. Vol. 243, No. 1—2. P. 59—66.

Madison-Antenucci S., Sabatini R.S., Pollard V.W., Hajduk S.L. Kinetoplastid RNA-editing-associated protein 1 (REAP-1): a novel editing complex protein with repetitive domains // EMBO J. 1998. Vol. 17, No. 21. P. 6368—6376.

Mahendran R., Spottswood M., Miller D.L. RNA editing by cytidine insertion in mitochondria of *Physarum polycephalum* // Nature. 1991. Vol. 349. P. 434—438.

Maier R.M., Neckermann K., Hoch B. et al. Identification of editing positions in in the *ndhB* transcript from maize chloroplasts reveals sequence similarities between editing sites of chloroplasts and plant mitochondria // Nucl. Acids Res. 1992. Vol. 20. P. 6189—6194.

Maier R.M., Zeltz P., Kössel H. et al. RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts // Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 32. P. 343—365.

Malek O., Brennicke A., Knoop V. Evolution of trans-splicing plant mitochondrial introns in pre-Permian times // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 553—558.

Malek O., Lättig K., Hiesel R. et al. Mitochondrial RNA editing in bryophytes and molecular phylogeny of land plants // EMBO J. 1996. Vol. 15. P.1403—1411.

Marchfelder A., Binder S., Brennicke A., Knoop V. RNA editing by base conversion in plant organellar RNAs // Modification and editing of RNA. Washington: ASM Press, 1998. P. 307—323.

Maréchal-Drouard L., Cosset A., Remacle C., Small I. RNA editing of larch mitochondrilal $tRNA^{His}$ precursors is a prerequisite for processing // Nucl. Acids Res. 1996. Vol. 24. P. 3229—3234.

Maslov D.A., Hollar L., Haghighat P., Nawathean P. Demonstration of mRNA editing and localization of guide tRNA genes in kinetoplastid-mitochondria of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens* // Mol. Biochem. Parasitol. 1998. Vol. 93, No. 2. P. 225—236.

Mulligan R.M., Williams M.A., Shanahan M.T. RNA editing site recognition in higher plant mitochondria // J. Heredity. 1999. Vol. 90, No. 3. P. 338—344.

Navaratnam N., Bhattacharya S., Fujino T. et al. Evolutionary origins of *apoB* mRNA // Cell. 1995. Vol. 81. P. 187—195.

Navaratnam N., Shah R., Patel D. et al. Apolipoprotein B mRNA editing is associated with UV crosslinking of proteins to the editing site // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1993. Vol. 90. P. 222—226.

Navaratnam N., Fujino T., Bayliss J. et al. Escherichia coli cytidine deaminase provides a molecular model for ApoB RNA editing and a mechanism for RNA substrate recognition // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 275, No. 4. P. 695—714.

Neckermann K., Zeltz P., Igloi G.L. et al. The role of RNA editing in conservation of start codons in chloroplast genomes // Gene. 1994. Vol. 146. P. 177—182.

Novo F.J., Kruszewski A., MacDermot K.D. et al. Editing of human α-galactosidase RNA resulting in a pyrimidine to purine conversion // Nucl. Acids Res. 1995. Vol. 23. P. 2036—2040.

Petschek J.P., Mermer M.J., Scheckelhoff M.R. et al. RNA editing in Drosophila *4f-rnp* gene nuclear transcripts by multiple A-to-G conversions // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 259. P. 885—890.

Phreaner C.G., Williams M.A., Mulligan R.M. Incomplete editing of rps12 transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria // Plant Cell. 1996. Vol. 8. P. 107—117.

Polson A.G., Bass B.L., Casey J.L. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase // Nature. 1996. Vol. 380. P. 454—456.

Powell L.M., Wallis S.C., Pease R.J. et al. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine // Cell. 1987. Vol. 50. P. 831—840.

Price D.H., Gray M. Editing of tRNA // Modification and editing of RNA. Washington: ASM Press, 1998. P. 289—305.

Pring D., Brennicke A., Schuster W. RNA editing gives a new meaning to the genetic information in mitochondria and chloroplasts // Plant Mol. Biol. 1993. Vol. 21. P. 1163—1170.

Rajput B., Ma J., Vijaj I.K. Structure and organization of mouse GlcNac-1-phosphate transferase gene // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 9590—9597.

Reed M.L., Peeters N.M., Hanson M.R. A single alteration 20 nt 5′to an editing target inhibits chloroplast RNA editing in vivo // Nucl. Acids Res. 2001. Vol. 29, No.7. P. 1507—1513.

Rochaix J.-D. Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes // Trends Plant Sci. 1997. Vol. 2. P. 419—425.

Ruf S., Zeltz P., Kössel H. Complete RNA editing of unspliced and dicistronic transcripts of the intron-containing reading frame IRF170 from maize chloroplasts // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 2295—2299.

Sabatini R.S., Adler B.K., Madison-Antennuci S. Biochemical methods for analysis of kinetoplastid editing // Methods. 1998. Vol. 15, No. 1. P. 15—26.

Scott J. A place in the world for RNA editing // Cell. 1995. Vol. 81. P. 833—836.

Sharma P.M., Bowman M., Madden S.L. et al. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, *WT1* // Genes Dev. 1994. Vol. 8. P. 720—731.

Shuster W., Brennicke A. The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing and gene migration to nucleus // Annu. Rev. Plant Physiol. 1994. Vol. 45. P. 61—78.

Shuster W., Hiesel R., Wissinger B., Brennicke A. RNA editing in the cytochrome *b* locus of the higher plant *Oenothera berteriana* includes a U to C transition // Mol. Cell Biol. 1990. Vol. 10. P. 2428—2431.

Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution // Annu. Rev. Microbiol. 1987. Vol. 42. P. 363—382.

Simpson L., Thiemann O.H. Sense from nonsense: RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa and slime molds // Cell. 1995. Vol. 81. P. 837—840.

Sommer B., Köhler M., Sprengel R., Seeburg P.H. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels // Cell. 1991. Vol. 67. P. 11—20.

Steinhauser S., Beckert S., Capesius I. et al. Plant mitochondrial RNA editing // J. Mol. Evol. 1999. Vol. 48, No. 3. P. 303—312.

Sutton C.A., Zoubenko O.V., Hanson M.R., Maliga P. A plant mitochondrial sequence transcribed in transgenic tobacco chloroplasts is not edited // Mol. Cell Biol. 1995. Vol. 15. P. 1377—1381.

Takano H., Kawano S., Kuroiwa T. No editing of mitochondrial plasmid transcripts in mitochondria of *Physarum* that have an RNA-editing system // DNA Res. 1997. Vol. 4, No. 1. P. 67—71.

Thiemann O.H., Maslov D.A., Simpson L. Disruption of RNA editing in *Leishmania tarentolae* by the loss of minicircle-encoded guide RNA genes // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 5689—5700.

Thomas S.M., Lamb R.A., Paterson R.G. Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5 // Cell. 1988. Vol. 54. P. 891—902.

Unseld M., Marienfeld J. Brandt P., Brennicke A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366924 nucleotides // Nat. Genet. 1997. Vol. 15. P. 57—61.

Visomirski-Robic L.M., Gott J.M. Insertional editing of nascent mitochondrial RNAs in *Physarum* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 4324—4329.

Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A. et al. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases // Virology. 1995. Vol. 214. P. 421—430.

Yang J.H., Sklar P., Axel R., Maniatis T. Editing of glutamate receptor subunit B pre-mRNA *in vitro* by site-specific deamination of adenosine // Nature. 1995. Vol. 374. P. 77—81.

Yokobori S., Pääbo S. tRNA editing in metazoans // Nature (London). 1995. Vol. 377. P. 490.

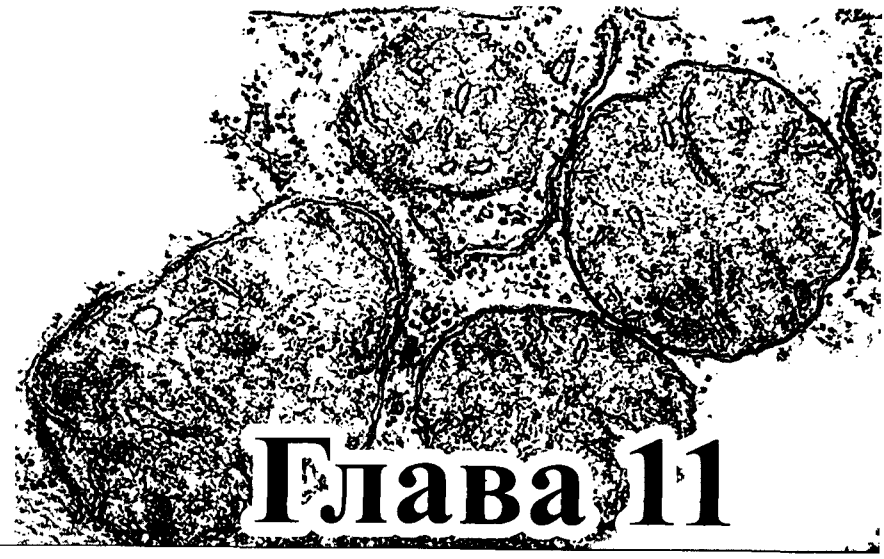
Yoshinaga K., Iinuma H., Masuzawa T., Ueda K. Extensive RNA editing of U to C in addition to U to C substitution in the *rbcL* transcript of hornwort chloroplasts and the origin of RNA editing in green plants // Nucl. Acids Res. 1996. Vol. 24. P. 1008—1024.

Yu W., Shuster W. Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C-to-U RNA editing of plant mitochondria // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 18227—18233.

Zeltz P., Börner T., Kössel H. Editing of the chloroplast *rpoB* transcript is independent of chloroplast translation and shows different patterns in barley and maize // EMBO J. 1993. Vol. 12, No. 11. P. 4291—4296.

Zeltz P., Kadowaki K., Kubo N. et al. A promiscuous chloroplast DNA fragment is transcribed in plant mitochondria, but the encoded RNA is not edited // Plant Mol Biol. 1996. Vol. 31. P. 647—656.

Zheng H., Fu T.B., Lazinski D., Taylor J. Editing on the genomic RNA of human hepatitis delta virus // J. Virol. 1992. Vol. 66. P. 4693—4697.



Глава 11

Молекулярно-генетическая природа цитоплазматической мужской стерильности растений

Мужская стерильность (МС) у растений проявляется в формировании нежизнеспособной пыльцы. Данный признак может контролироваться как ядерным геномом (генная мужская стерильность, ГМС), например, у томатов картировано более 40 ядерных локусов, контролирующих МС [Hanson, 1991], так и цитоплазматическим геномом.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) — это контролируемое внеядерными генетическими системами нарушение развития пыльцы у растений. ЦМС описана более чем у 150 видов высших растений, относящихся к 47 родам и 20 семействам [Frank, 1989; Hanson, 1991; Levings, 1990; Nair, 1993], а по некоторым данным, ЦМС найдена более чем у 300 видов [Эльконин, Тырнов, 2000]. ЦМС широко используется в семеноводстве для получения гибридных семян — это самая "доходная" цитоплазматическая мутация, ежегодно приносящая большие прибыли. Не останавливаясь на истории открытия [Rhoades, 1933] и ранних этапах исследования данного феномена [Duvick, 1965; Хаджинов, 1968; Палилова, 1969; Крупнов, 1973; Flavell, 1974; Турбин, Палилова, 1975], в настоящей главе мы рассмотрим современные представления о природе ЦМС, механизмах нарушения микроспорогенеза и процессах восстановления фертильности.

Происхождение ЦМС-растений и ядерных генов-восстановителей фертильности

Растения с ЦМС часто появляются спонтанно и обнаруживаются обычно при анализе значительных по объему популяций различных сельскохозяйственных культур [Rhoades, 1933; Duvick, 1965; Палилова, 1969; Hanson, 1991]. Нередко ЦМС-формы обнаруживаются у диких родичей культивируемых сельскохозяйственных культур [Ogura, 1968; Hanson, 1991; Riesberg et al., 1994]. Согласно недавно выдвинутому предположению, у самоопыляющихся растений (бобовые) ЦМС-мутация сохраняется у множества диких форм в субстехиометрических количествах, а при определенных ядерно-плазменных комбинациях количество ее копий в митохондриях может возрастать в 1000—2000 раз [Arrieta-Montiel et al., 2001].

Но, пожалуй, наиболее часто ЦМС-растения имеют так называемую "гибридную природу". Впервые случай возникновения ЦМС при гибридизации был описан у межсортовых гибридов сорго [Хаджинов, 1937]. В ходе выполнения различных селекционных программ, в которых серия обратных скрещиваний (беккроссов) ведет к замещению ядерного генома одного вида (А) на другой (Б) при сохранении цитоплазматического генома исходного

вида А (см. главу 13), нередко образуются растения с ЦМС. Такие эксперименты привели к представлению о цитоплазматической стерильности пыльцы как результате ядерно-плазменной несовместимости. Классическими примерами стерильности такого типа являются аллоплазматические пшеницы *Triticum aestivum* на цитоплазме *Aegilops ovata* [Kihara, 1951] или *T. timopheevi* [Wilson, Ross, 1962; Палилова, 1969; Крупнов, 1973], линии подсолнечника *Helianthus annuus* на цитоплазме *H. petiolaris* [Leclercq, 1969], серия стерильных линий табака *Nicotiana tabacum* на цитоплазме *N. repanda* [Burk, 1967; Gerstel, 1980], ЦМС-формы у различных видов рода *Brassica* [Braun et al., 1992] и др.

ЦМС может возникнуть и в результате некоторых внутривидовых скрещиваний [Hanson, Conde, 1985], а также при соматической гибридизации [Эльконин, Тырнов, 2000].

Искусственное получение новых мужски стерильных форм осуществляется также с использованием сомаклональной изменчивости, характерной для культур *in vitro*. Так были отобраны ЦМС-формы табака, риса, кукурузы, сорго [Эльконин, Тырнов, 2000].

Недавно описан новый тип — так называемая фотопериод-чувствительная ЦМС (PCMS), возникающая у аллоплазматической пшеницы *T. aestivum* на цитоплазме *A. crassa* [Murai, Tsunewaki, 1993] и представляющая собой крайне интересный пример ядерно-органельного взаимодействия при органогенезе (см. далее в этой главе).

В природных популяциях растений разных видов выявлены и продолжают выявляться ядерные гены *Rf* (**r**estoration of **f**ertility), восстанавливающие полностью или частично фертильность пыльцы, независимо от происхождения ЦМС [Duvick, 1965; Laughman, Gabay-Laughman, 1983; Lonsdale, 1987; Newton, 1988; Levings, Brown, 1989; Braun et al., 1992]. В случае доминантных *Rf* генов фертильность восстанавливается уже в гибридах F1 ("стерильная" цитоплазма, гетерозиготное по генам *Rf* ядро), что играет решающую роль в их практическом использовании [Duvick, 1965]. В некоторых случаях этот процесс происходит с помощью не одного, а нескольких *Rf* генов [Duvick, 1965; Палилова, 1969; Laughnan, Gabay-Laughnan, 1983; Hanson, 1991]. Механизмы восстановления фертильности мы обсудим далее в этой главе.

Таким образом, ЦМС независимо от того, является ли она результатом спонтанной мутации или несовместимости внутриклеточных геномов при гибридизации, представляет собой феномен ядерно-плазменного взаимодействия, в котором участвуют гены как органелл (митохондрий), так и ядра (гены — восстановители фертильности *Rf*). Поэтому механизм функционирования может быть окончательно понят при рассмотрении совместного действия этих генов.

ЦМС и клеточные органеллы

Уже ранние цитохимические и электронномикроскопические исследования, посвященные ЦМС, свидетельствовали о серьезных нарушениях в митохондриях стерильных растений [Палилова и др., 1966, 1967]. Предположения о мутации в митохондриальной ДНК были сделаны на основе этих данных [Палилова, 1969].

В следующее десятилетие получены первые данные об отличии митохондриальных ДНК стерильных растений кукурузы от нормальных; кроме того, было показано, что каждый тип стерильности — T, C и S — характеризовался своим уникальным спектром фрагментов мтДНК при эндонуклеазной рестрикции [Levings, Pring, 1976; Pring et al., 1977].

В дальнейшем эксперименты по соматической гибридизации позволили окончательно связать признак ЦМС с митохондриями. При слиянии соматических клеток хлоропласты обычно подвергаются сегрегации, и растения, выросшие из такой "зиготы", или их потомки обычно имеют хлоропласты того или другого родителя. В соматических гибридах *Nicotiana, Brassica* и *Petunia* у стерильных растений нередко выявлялись пластиды фертильного родителя и наоборот — у фертильного соматического гибрида обнаруживались пластиды стерильного родителя [Belliard et al., 1978; Clark et al., 1985; Pelletier et al., 1983]. Эти эксперименты явились доказательством связи признака ЦМС не с хлоропластами, а, вероятнее всего, с митохондриями.

В настоящее время ЦМС-локусы локализованы в митохондриальных ДНК растений различных видов. Практически все исследованные типы ЦМС у растений разных систематических групп связаны с реорганизацией митохондриального генома, во многих случаях приводящей к образованию так называемых химерных генов [Hanson, 1991; Saumitou-Laprade et al., 1994; Kubo et al., 1999; Budar, Pelletier, 2001].

Химерные гены в митохондриях и происхождение ЦМС

ЦМС T-, C- и S- типов у кукурузы. При исследовании митохондриальной ДНК кукурузы с T-типом ЦМС с помощью геномной библиотеки была обнаружена область, экспрессирующаяся во всех тканях стерильных растений иначе, чем у нормальных. Так был впервые локализован ЦМС-ген T-*urf13* и его продукт — белок 13 кД [Dewey et al., 1986]. Данный химерный ген (рис. 11.1) — продукт как минимум семи рекомбинаций митохондриальной ДНК. Интересно, что основная часть этого гена состоит из фрагментов,

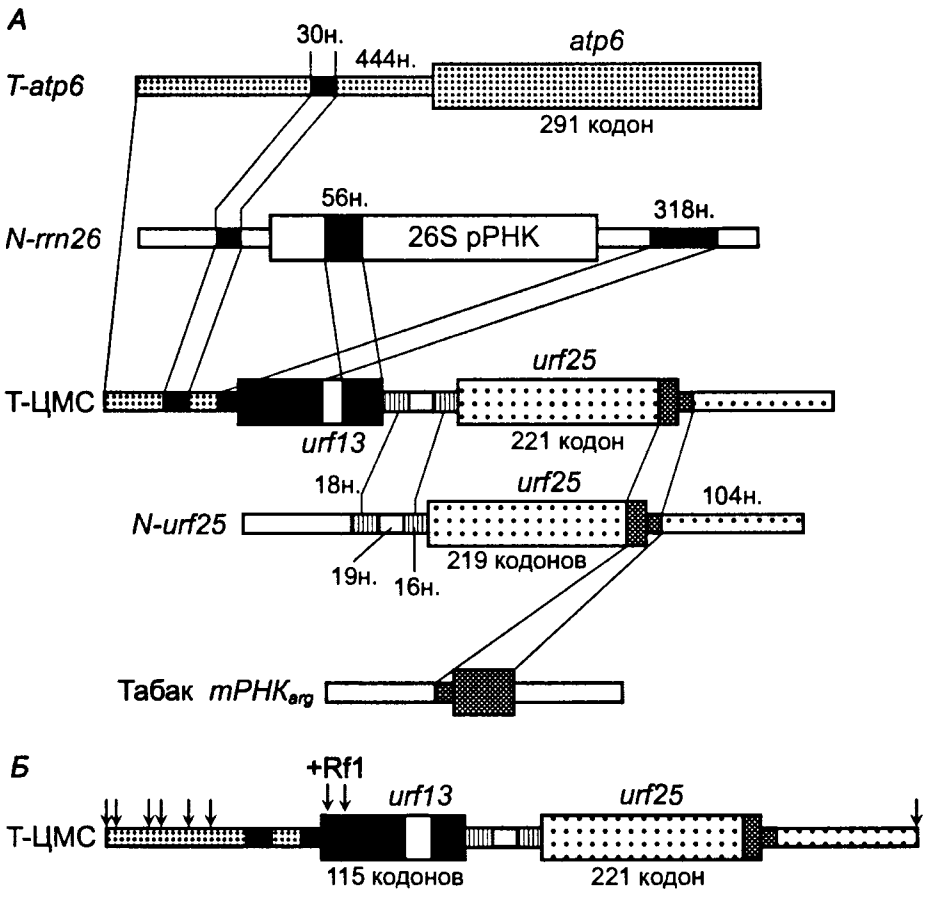


Рис. 11.1. Структура локусов, связанных с ЦМС техасского (Т) типа кукурузы [по Hanson, 1991]. *А* — высокие прямоугольники обозначают открытые рамки считывания (гены). Участки *urf13* образовались из нормальных генов *atp6* и 26S рРНК. *atp6* и 26S рРНК присутствуют в других сайтах мтДНК Т-ЦМС кукурузы, но *urf25*, располагающийся за *urf13*, присутствует в Т-ЦМС в единственной копии. Хлоропластные последовательности ДНК, представляющие фрагменты гена тРНК аргинина, находятся на 3'-конце гена *urf25* как нормальной фертильной, так и Т-ЦМС линий кукурузы. *Б* — границы транскриптов у ЦМС-локуса кукурузы. Стрелки указывают расположение картированных границ. Стрелка с пометкой +Rf1 указывает на транскрипт, который доминирует у линий с *Rf1* аллелем [см. также Kennell, Pring, 1989]

гомологичных области, фланкирующей ген *rrn26* (318 п.н.), и участку (56 п.н.) самого *rrn26* гена, который кодирует 26S рРНК. Между ними находится последовательность неизвестного происхождения (27 п.н.). 5'-фланкирующая последовательность перед геном Т-*urf13* гомологична 5'-фланкирующей области *atp6* гена — вероятно, промотор гена Т-*urf13* появился в результате дупликации участка мтДНК — промотора гена *atp6* и дальнейшей рекомбинации. Нормальные копии генов *atp6* и *rrn26* находятся в геноме в полном неизмененном виде [Kennell, Pring, 1989; Hanson, 1991].

Область 3 кД, включающая в себя Т-*urf13* и 5'-фланкирующий район *atp6* гена, кроме реорганизаций ДНК-последовательностей содержит также шесть малых инсерций и делеций: три прямых повтора по пять нуклеоти-

дов, два повтора по 4 нуклеотида, разделенные одним нуклеотидом, и инсерцию в 4 нуклеотида. Большинство этих изменений напоминают мутации сдвига рамки, которые возникают при неправильном спаривании повторов ДНК [Kennell, Pring, 1989].

Химерный ген, связанный с С-типом стерильности у кукурузы, также состоит из фрагментов трех разных генов: *atp6*-ген на N-терминальном конце сливается с 13 кодонами *atp9* и 141 кодоном пластидного происхождения, тогда как 5′-фланкирующий район и часть кодирующей области *atp6* объединены с геном *cox2* [Hanson, Folkerts, 1992, см. литературу к главе 4].

В отличие от ЦМС Т- и С-типов ЦМС-S у кукурузы связан с двумя автономно реплицирующимися плазмидами S-1 (6,4 т.п.н.) и S-2 (5,4 т.п.н.) [Pring et al., 1977]. Хотя S-1 и S-2 не найдены в других цитоплазматических геномах разных линий кукурузы, сходные элементы, названные R-1 и R-2, обнаружены у некоторых мужски фертильных латиноамериканских рас *Zea mays* [Weissinger et al., 1982]. S-элементы содержат идентичные терминальные инвертированные повторы размером 208 п.н., их 5′-концы кэпированы белками, аналогичными тем, которые связаны с ДНК аденовирусов и фагов *Bacillus* [Levings, Brown, 1989]. В дальнейшем у S-митохондрий кукурузы также были обнаружены митохондриальные реорганизации, результатом которых явились два химерных гена: *orf355* и *orf77*. Первый состоит из области, гомологичной R-1 фертильных цитоплазм кукурузы, и связанных с ней 336 нуклеотидов неизвестного происхождения. Рядом с ним (на 3′-конце) находится второй химерный ген *orf77*, имеющий сходство с кодирующей и 3′-фланкирующей областями *atp9*, которые перемежаются участками, сходными с 3′-фланкирующей последовательностью гена *orf221* [Zabala et al., 1997].

ЦМС у петунии. У *Petunia* с ЦМС связан участок мтДНК, называемый *S-pcf* локус, который состоит из трех котранскрибируемых генов: *pcf*, *nad3* и *rps12*. Химерный ген *pcf* составлен из трех частей: участка, гомологичного гену *atp9*, фрагмента гена *cox2* и неизвестной последовательности *urf-S* (рис.11.2). Нормальные копии генов *atp9* и *cox2*, как у ЦМС-Т линий кукурузы, присутствуют в мтДНК стерильной *Petunia* [Boeshore et al., 1985; Young, Hanson, 1987].

ЦМС у риса. Один из типов ЦМС риса, так называемый ЦМС-bo ("Chinsurah boro II"), связан с наличием в мтДНК стерильных растений дополнительной модифицированной копии гена *atp6*: *B-atp6*. Кодирующая часть гена не изменена, однако последовательность 3′-фланкирующего района *B-atp6* является результатом сложных рекомбинаций, в которые вовлечены гены *cox1*, *cox2* и $tRNA^{fmet}$. Эти перестройки обусловливают различия между транскриптами двух генов — *atp6* и *B-atp6*. ЦМС-bo коррелирует с

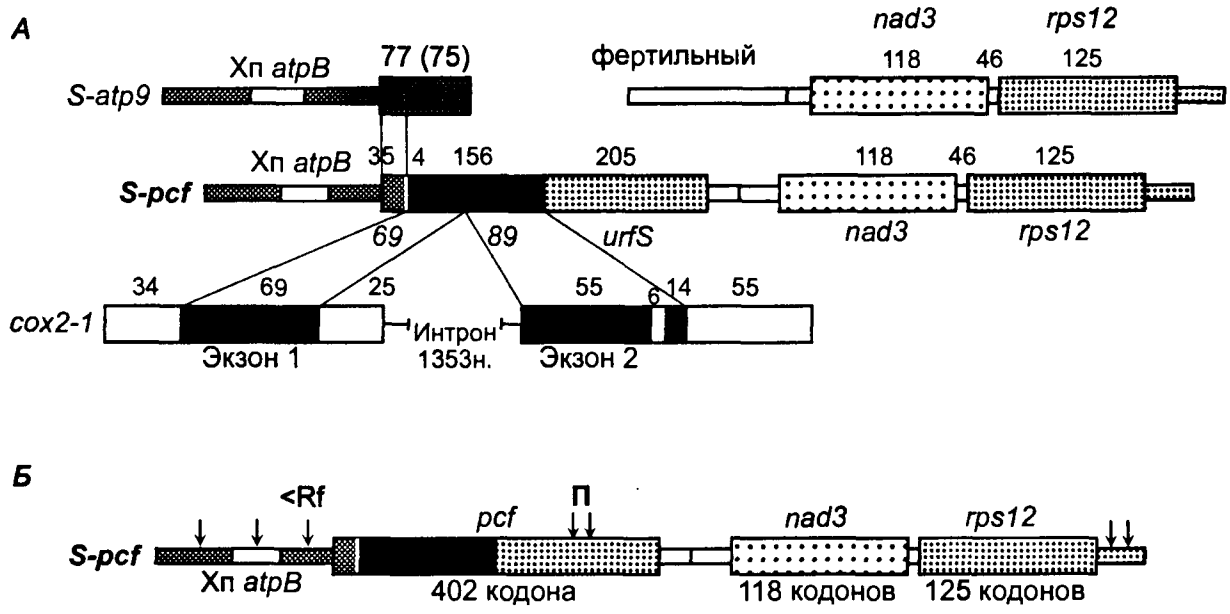


Рис.11.2. *А* — структура ЦМС-локуса у петунии. Цифры над прямоугольниками указывают количество кодонов. ДНК-последовательность *S-atp9* предопределяет *orf* в 77 кодонов, но РНК-редактирование укорачивает ее до 75 кодонов. Первые 35 кодонов *pcf* идентичны *atp9*, 4 нуклеотида после этого, возможно, появились в результате рекомбинации с *cox2*. Последовательности обоих экзонов *cox2* присутствуют без интронов. За *cox2* зоной *pcf* следует неидентифицированная рамка считывания *urfS*. Нормальные гены *atp9* и *cox2* присутствуют в ЦМС-линиях петунии, тогда как единственные копии *nad3* и *rps12* находятся за *pcf* и не отличаются от таковых фертильной линии петунии. *Б* — границы транскриптов ЦМС-локусов петунии. Стрелка, помеченная значком <Rf, указывает на транскрипт, количество которого уменьшается в линиях с восстановленной фертильностью. Стрелки, помеченные П, указывают на границы транскриптов, которые значительно увеличиваются в почках определенных генотипов по сравнению с листьями и суспензионными культурами [по Hanson, 1991]

экспрессией гена *B-atp6*. Как и в предыдущих случаях, нормальные копии *atp6* присутствуют в мтДНК стерильных растений [Saumitou-Laprade et al., 1994].

ЦМС у фасоли. У двух видов фасоли — *Phaseolus vulgaris* и *P. coccineus* ЦМС-последовательности в мтДНК на 99,9% идентичны между собой и представляют область размером 3,7 т.п.н. — так называемую *pvs*-область *(Phaseolus vulgaris sterility). Pvs* транскрипционно активна и состоит из двух генов: *orf98* и *orf239* и фланкирующих их последовательностей (рис. 11.3) [Johns et al., 1992; Chase, Ortega, 1992], образованных путем многочисленных рекомбинаций мтДНК (рис.11.4) [Arrieta-Montiel et al., 2001].

ЦМС у подсолнечника. Митохондриальная ДНК цитоплазмы PET1 *Helianthus petiolaris,* вызывающей ЦМС у потомков при скрещивании с *H. annuus,* отличается от мтДНК *H. annuus* наличием инверсии размером 11 т.п.н. и вставки 5 т.п.н., несущей ген *orf522.* Область реорганизации ограничена инвертированными повторами размером 261 п.н. (рис.11.5). Новая

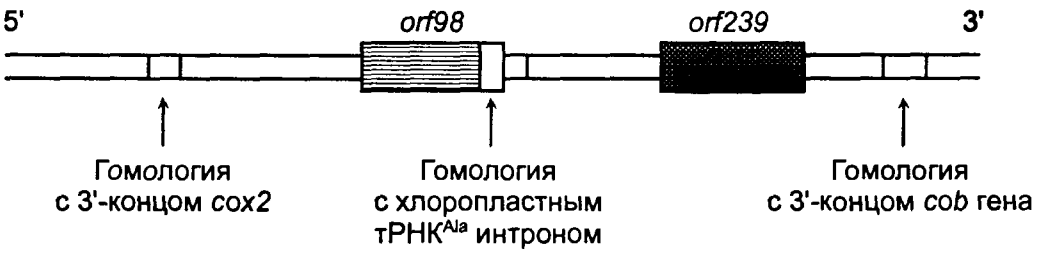


Рис. 11.3. Структура *pvs*-локуса у фасоли с ЦМС. Область размером 3 т.п.н. содержит несколько открытых рамок считывания, образованных при рекомбинациях мтДНК. 3'-фланкирующая область *orf98* произошла из внутренней области хлоропластного аланинового тРНК интрона, а 3'-часть *pvs*-локуса на 96% сходна с кодирующим участком *cob* гена [по Saumitou-Laprade et al., 1994]

orf котранскрибируется с геном *atpA,* образуя дополнительный транскрипт [Köhler et al., 1991; Laver et al., 1991]. Интересно, что ген *orf 522* и вся 5 т.п.н.-инсерция состоят из фрагментов не только митохондриальных, но и ядерных ДНК, а также фрагментов неизвестного происхождения [Zetche, Horn, 1993].

Впоследствии был обнаружен новый тип ЦМС у подсолнечника, CMS3, отличающийся от PET1. По данным блот-гибридизации, по меньшей мере пять локусов CMS3 (*atp6, atp9, atpA, nad1+5, cox3*) отличаются по организации от PET1. Ген *atpA* в фертильной цитоплазме отделен от *orfB-cox3* локуса 60 нуклеотидами, тогда как в CMS3 они расположены рядом; ген *atp6* имеет дополнительные нуклеотиды на 5'-конце [Spassova et al., 1994].

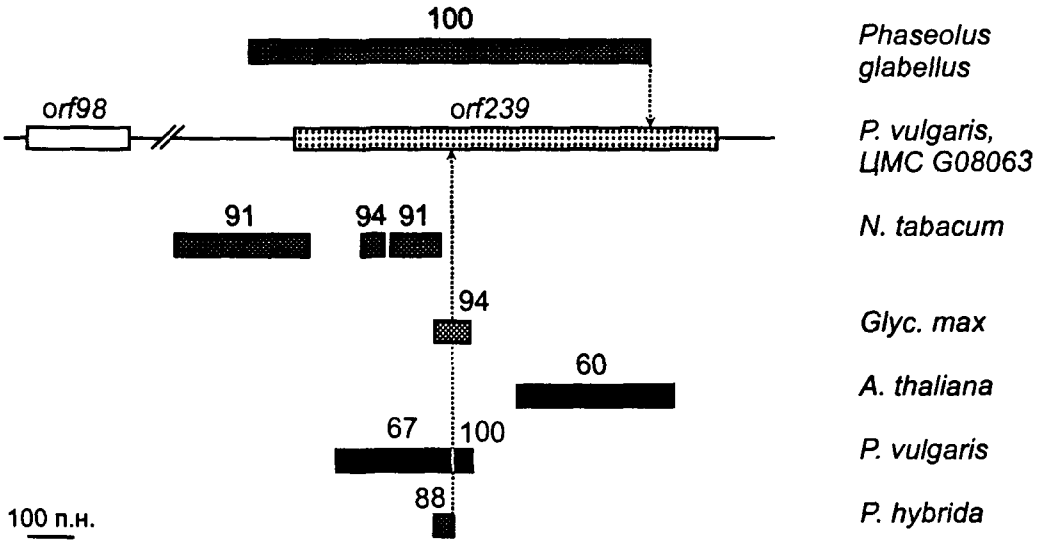


Рис. 11.4. Схематическое сравнение последовательности *pvs-orf239* и ее гомологов, выявленных у других видов растений. Цифры — процент идентичных нуклеотидов. Ядерные последовательности обозначены черным цветом, митохондриальные — мелкой штриховкой. Пунктирными линиями обозначены две области, где предположительно произошли рекомбинации, что привело к образованию *pvs-orf239* [по Arrieta-Montiel et al., 2001]

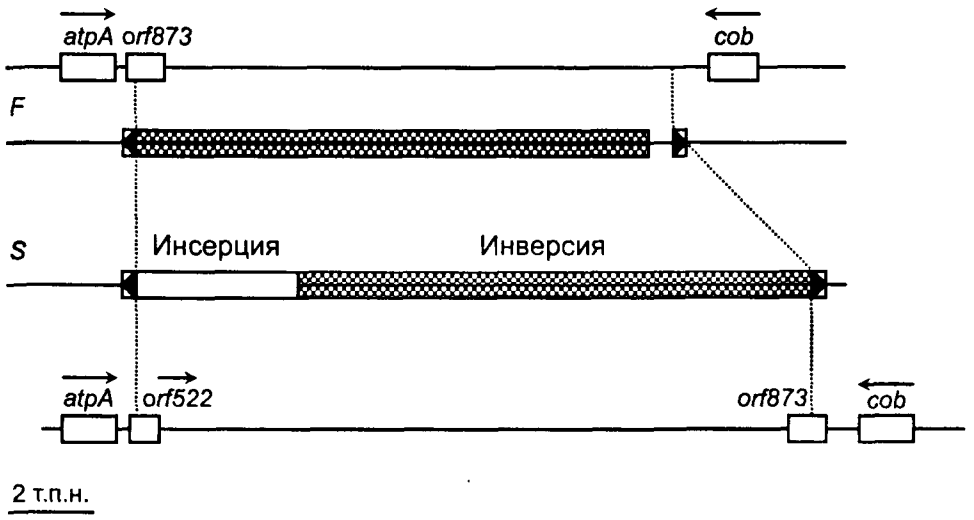


Рис. 11.5. Структура ЦМС-локуса у подсолнечника. Митохондриальные ДНК фертильной линии *Baso (F)* и ЦМС-*Baso (S)* отличаются инверсией размером 11т.п.н. и инсерцией 5 т.п.н. с геном *orf522*. Реорганизованная область фланкирована инвертированными повторами (черные треугольники) размером 261 нуклеотид. Стрелки указывают направление транскрипции. Не выявлено транскриптов *orf873* [по Köhler et al., 1991]

ЦМС у сорго. Митохондриальная ДНК цитоплазмы сорго 9Е, индуцирующей стерильность пыльцы, содержит измененный ген *cox1*: благодаря рекомбинации на 3′-конце ген становится на 303 основания длиннее, чем в мтДНК фертильной цитоплазмы Milo. Субъединица COX1 в цитоплазме 9Е соответственно содержит на 101 аминокислоту больше, чем COX1 Milo, что связывают с формированием стерильной пыльцы у сорго [Bailey-Serres et al., 1986].

У другой стерильной линии сорго IS1112C химерный ген *orf107* кодирует полипептид, одна часть которого (31 аминокислота N-конца) гомологична *atp9*. На С-конце того же белка найдена последовательность в 49 аминокислот, на 80% сходная с той, что найдена у ЦМС-формы риса. Такое сходство последовательностей химерных генов, связанных с ЦМС, у разных видов растений вряд ли является случайным [Tang et al., 1996]. Показано сходство также между сайтами, по которым происходит процессинг транскриптов при ЦМС у сорго и ЦМС-Т у кукурузы [Dill et al., 1997].

ЦМС у редиса. ЦМС-система *ogu* названа по фамилии исследователя, открывшего ее у нескольких японских сортов редиса [Ogura, 1968]. В митохондриальном геноме растений с цитоплазмой *ogura* найден ряд "новшеств": на 5′-конце *atp6* появился ген *orf105*, который нарушил структуру рамки считывания, транскрибируясь вместе с *atp6* [Makaroff et al., 1989]. Кроме того, обнаружен новый фрагмент длиной 120 п.н. на 5′-конце гена *cox1*, а также изменены транскрипты митохондриальных генов *aptA* и *cox2* [Makaroff, Palmer, 1988; Makaroff et al., 1991].

ЦМС у растений рода *Brassica.* Из нескольких ЦМС-систем, описанных для растений рода *Brassica* (*mur, nap, pol, nig, ana*), большинство возникло в результате ядерно-плазменной несовместимости при межвидовой гибридизации. Так, ЦМС *nigra* возникает при переносе ядра *B. oleracea* в цитоплазму *B. nigra* [Pearson, 1972]. ЦМС-растения возникают у ряда видов при сочетании их ядерных геномов с цитоплазмой вида "Polima" (*pol* ЦМС). В этом случае митохондриальная ДНК в результате реорганизации образует химерный ген *orf224,* предшествующий гену *atp6,* который котранскрибируется вместе с *atp6* [Braun et al., 1992]. Ген *orf224* состоит из трех фрагментов: первые 58 кодонов и 5'-участок соответствуют митохондриальному гену *orfB,* функция которого пока неясна, следующие 43 кодона соответствуют части экзона 1 *rps3,* происхождение последних 456 нуклеотидов неизвестно [Handa et al., 1995]. *Nap*-система ЦМС несет весьма похожий, но не идентичный химерный ген *orf222,* его аминокислотный продукт на 79% аналогичен белку ORF224, он образуется почти в том же районе мтДНК, что и *orf224* (рис. 11.6) [L'Homme et al., 1997].

Химерный ген *orfB-CMS* обнаружен также у моркови: на 3'-конце *orfB*-последовательности находится 170 п.н. неизвестного происхождения, такой ген несут все пятнадцать исследованных стерильных линий моркови [Nakajima et al., 2001].

Таким образом, рассмотренные нами примеры ЦМС у высших растений разных систематических групп связывают реорганизации митохондриального генома, ведущие к образованию новых химерных генов или новых полицистронных транскриптов, с нарушением формирования пыльцы. Иногда удается установить происхождение всех фрагментов химерных генов, однако чаще всего источник некоторых последовательностей остается загадкой. В случае ЦМС Т-типа у кукурузы удивительным является образование белок-кодирующего гена из генных фрагментов, которые исходно кодируют не белки, а РНК рибосом. Каким образом происходит экспрессия этих химерных генов и как она может быть функционально связана с нарушением формирования пыльцы?

Экспрессия ЦМС-генов в митохондриях

Транскрипция локусов, связанных с ЦМС

В ЦМС-локусах ряда видов обнаружены множественные сайты инициации и терминации транскрипции (см. рис. 11.1, 11.2). Такая множественность не является чем-то уникальным и описана для ряда обычных митохондриальных генов растений [Mulligan et al., 1988a, 1988b, см. литературу

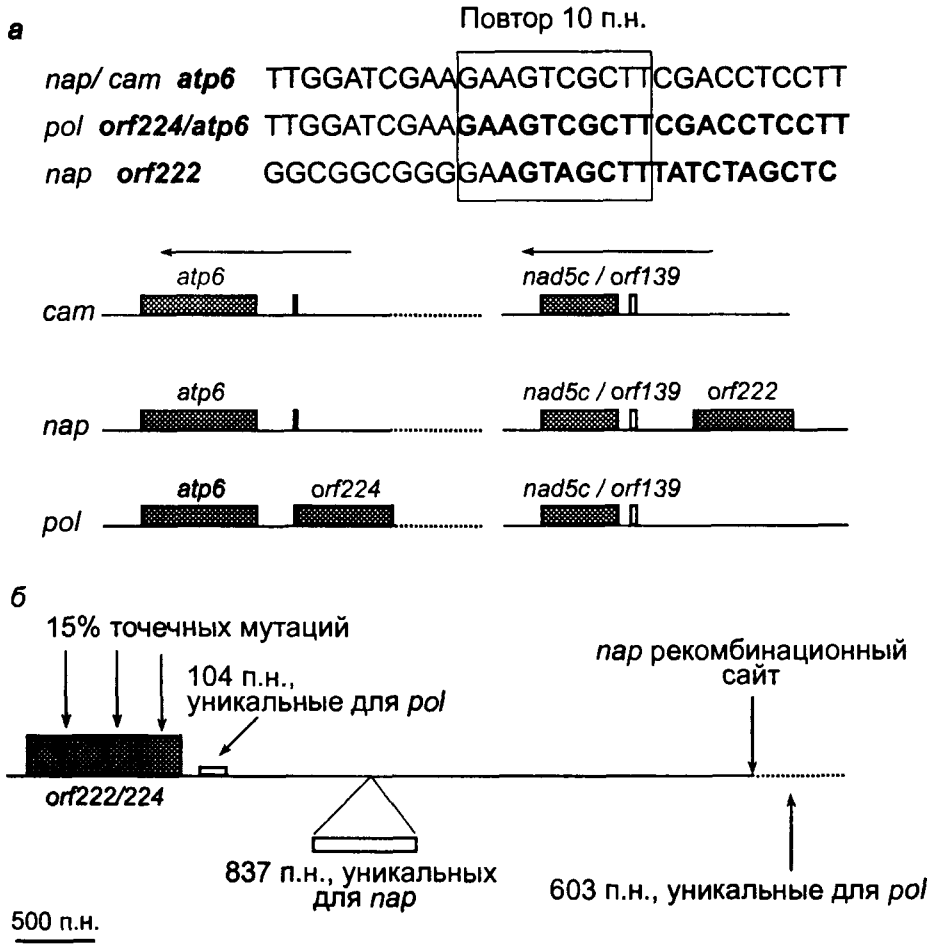


Рис. 11.6. Структура 4,5 т.п.н. сегментов мтДНК *Brassica* с разными типами ЦМС. *а* — последовательности вокруг 10-нуклеотидного повтора (в рамке) и его расположение по отношению к генам *atp6* и химерным *nap* и *pol* ORF. Жирным шрифтом выделены нуклеотиды кодирующих участков. Пунктирными линиями отмечены дополнительные ДНК-последовательности. Заштрихованные прямоугольники — открытые рамки считывания, малый незаштрихованный прямоугольник — *nad5c* экзон, малый черный прямоугольник — 10-нуклеотидный повтор, стрелки указывают направление транскрипции. *б* — реорганизация последовательности между *nap* и *pol* 4,5 т.п.н. сегментами. Незаштрихованные прямоугольники и пунктирные линии соответствуют уникальным последовательностям [по L'Homme et al., 1997]

к главе 4]. Каково функциональное значение этой множественности, пока неясно [Hanson, 1991], эти данные следует рассматривать в свете полученных недавно фактов об участии нетранслируемых участков в контроле стабильности мРНК (см. главы 3, 4). Так, у кукурузы с ЦМС Т-типа обнаружено семь транскриптов различной длины химерного гена *urf13* и котранскрибируемого с ним *orf221* [Hoffmann et al., 2001, см. литературу к главе 4].

Увеличение в 4—5 раз количества малого транскрипта *pcf* гена наблюдается при ЦМС именно в тканях пыльников, при этом концентрация другого транскрипта, *atp,* остается неизменной во всех тканях [Levings, Brown, 1989].

Химерные гены, как отмечалось выше, часто котранскрибируются вместе с нормальными, например,*pcf* с *nad3* и *rps12 (Petunia), orf224* с *atp6 (pol-Brassica), orf222* с участком гена *nad5* и *orf139 (nap-Brassica), orf105* с *atp6* (редис), *orf 522* с *atpA (Helianthus), orf274* с *atp1* (аллоплазматическая ЦМС табака: *Nicotiana tabacum* на цитоплазме *N. repanda* [Bergman et al., 2000]). В других случаях у химерных генов оказались собственные сайты инициации транскрипции, переместившиеся из других *orf* в результате реорганизаций мтДНК: например, промотор гена *atp6* инициирует транскрипцию *urf13* кукурузы и химерной *orf* риса с ЦМС-Во.

Итак, можно заключить, что транскрипция ЦМС-локусов происходит по общим законам, эволюционно выработанным для нормальных митохондриальных генов с промоторов, уже существовавших в митохондриальных геномах.

РНК-эдитинг и ЦМС

Рассмотренный в предыдущей главе феномен РНК-редактирования особенно распространен при экспрессии митохондриальных генов растений: мРНК каждого гена редактируется в 5—70 точках. В связи с этим важно отметить, что Т-*urf13* является единственным известным в настоящее время у высших растений белок-кодирующим митохондриальным геном, не подвергающимся РНК-эдитингу [Maier et al., 1996, см. литературу к главе 10]. Вероятно, это связано с тем, что его составные части происходят из так называемых структурных генов, в которых сайты эдитинга, как правило, отсутствуют.

У химерного гена *Brassica orf224* эдитинг выявлен только во фрагменте первого экзона *rps3,* в том самом месте, в котором он происходит у нормального гена *rps3.*

В химерном гене, связанном с С-типом стерильности у кукурузы и состоящем также из фрагментов трех разных генов, эдитинг происходит в 19 позициях, точно соответствующих точкам редактирования полных транскриптов этих генов [Maier et al., 1996, см. литературу к главе 10].

У сорго обнаружен не описанный до этого феномен транскрипт-специфической утраты РНК-эдитинга. В митохондриях пыльников линии *Sorghum bicolor* А3Т·398 (ЦМС) было избирательно подавлено редактирование транскрипта *atp6.* При этом транскрипты *atp9, nad3, nad4, rps12* нормально редактировались как в пыльниках, так и в этиолированных проростках. Феномен явно зависит от ядерного генома: у одних линий с такой же цитоплазмой *atp6* пыльников нормально редактировались, у других — нет. Подавление *atp6* РНК-эдитинга наблюдалось как в спорофитных, так и в гаметофитных тканях пыльника, но ни в каких других [Howad, Kempken,1997; Howad et al., 1999].

Таким образом, изучение РНК-редактирования транскриптов химерных генов при ЦМС обнаружило несколько особенностей, интересных не только в связи с возникновением пыльцевой стерильности: во-первых, в митохондриях растений найден первый нередактируемый белок-кодирующий ген (*urf13),* во-вторых, описан находящийся под контролем ядра феномен транскрипт-специфического подавления РНК-эдитинга в митохондриях тканей пыльника. Наконец, показано, что фрагменты нормальных митохондриальных генов, входящие в химерные *orf,* редактируются точно в тех же позициях, что и их интактные копии.

Трансляция ЦМС-генов

Первым митохондриальным белком, выявленным в связи с ЦМС, был белок 13 кД, синтезированный *in vitro* изолированными митохондриями Т-стерильных, но не фертильных растений кукурузы [Forde et al., 1978; Forde, Leaver, 1980], идентифицированный еще до описания гена *urf13.* Размер продукта гена *urf13* соответствовал уже известному белку 13 кД. На основе первичной последовательности гена *urf13* были синтезированы полипептиды, антитела к которым реагировали с 13 кД белком в ЦМС линиях [Dewey et al., 1987].

Таким же способом был обнаружен ЦМС-белок у *Petunia*: полипептид 25 кД отсутствовал у фертильных аналогов, синтезировался изолированными митохондриями ЦМС-линий и не реагировал с антителами к *cox2* району *pcf.* Это доказывает, что после транскрипции *pcf*-локуса происходит N-терминальный процессинг, после чего с *urf-S* мРНК транслируется 25 кД белок (см. рис.11.2) [Hanson, 1991].

Дополнительный белок 15 кД образуется у ЦМС-Baso линии подсолнечника в результате трансляции *orfH522* [Laver et al., 1991]. У кукурузы с С-типом ЦМС вместо мембранно-связанного полипептида 15,5 кД, синтезируемого N, T и S митохондриями, наблюдается трансляция нового растворимого полипептида 17,5 кД [Forde, Leaver, 1980].

В отличие от ЦМС-белков кукурузы, петунии, подсолнечника, выявляющихся во всех органах стерильных растений, белок фасоли *pvs*-ORF239 оказался специфичным только для репродуктивных тканей: семяпочек, материнских клеток пыльцы и микроспор мужски стерильных растений [Abad et al., 1995]. Как показали исследования, ген *orf239* транскрибируется как у проростков, так и в генеративных тканях [Chase, 1994]. Транскрипт связывается с полисомами на обеих стадиях, однако белковый продукт данного гена размером ~27 кД обнаруживается лишь в репродуктивных тканях [Abad et al., 1995; He et al., 1996].

В главе 4 обсуждались те немногие имеющиеся данные, которые свиде-

тельствуют о регуляции экспрессии митохондриальных генов растений, в частности о дифференциальной экспрессии митохондриальных транскриптов в проростках кукурузы [Li et al., 1996, см. литературу к главе 4]. Модуляция экспрессии гена *orf239* — первый известный случай посттранскрипционной регуляции в митохондриях растений. Согласно данным экспериментов *in vitro* и *in vivo, orf239* транслируется и в вегетативных, и в репродуктивных тканях, однако в первом случае происходит быстрое разрушение белка 27 кД благодаря специфическому действию митохондриальной протеазы [Sarria et al., 1998].

Доказательства того, что именно белок 27 кД — продукт *pvs* гена *orf239* — вызывает развитие абортивной пыльцы, были получены в экспериментах с встраиванием гена *orf239* в ядерный геном табака. Действительно, несколько трансформантов характеризовались мужски стерильным или полустерильным фенотипом, а иммуноцитохимический анализ обнаруживал белок ORF239 в клеточной стенке аномальных микроспор (см. далее в этой главе о механизмах формирования ЦМС) [He et al., 1996].

Ядерные гены-восстановители фертильности: механизм действия

Ядерный геном участвует во всех без исключения клеточных процессах, в том числе и происходящих в органеллах. Нарушение развития пыльцы у растений с мутантной цитоплазмой также может быть откорректировано специальными ядерными генами *Rf* — восстановителями фертильности. Причем, как было установлено, эта коррекция происходит на разных этапах — от репликации ДНК до взаимодействия с ЦМС-белками.

Эффект генов Rf на митохондриальный геном

Восстановление фертильности у мужски стерильных линий *Phaseolus vulgaris* происходит с помощью генов *Fr* и *Fr2*. Механизмы действия этих генов совершенно различны: под действием гена *Fr2* изменяется концентрация ЦМС-белка ORF239 и нормализуется развитие пыльников. При этом транскрипция *orf239* не нарушается, т.е. эффект *Fr2* проявляется посттранскрипционно [Abad et al., 1995]. Введение же гена *Fr* приводит к изменению структуры митохондриальной ДНК: из генома митохондрий исчезает *pvs*-последовательность. Такое же изменение в митохондриальной ДНК наблюдается при редких спонтанных реверсиях к фертильности у стерильных растений *P. vulgaris* [Mackenzie et al., 1988]. При совместном введении в ядро генов *Fr* и *Fr2* наблюдалось подавление эффекта *pvs*-локуса под действием *Fr2,* в этом случае ген *Fr* уже не вызывал исчезновения *pvs*-после-

довательности. Таким образом, чтобы эффект *Fr* проявился, *pvs*-локус должен экспрессироваться. Для полного исчезновения *pvs*-локуса и соответственно полного восстановления фертильности ген *Fr* должен быть в гомозиготном состоянии *(FrFr)*. Одна доза гена *(Frfr)* инициирует процесс элиминации *pvs*-локуса и проявляется в полустерильном фенотипе: продуцируется как стерильная, так и фертильная пыльца. Хотя окончательно механизм действия гена *Fr* не установлен, авторы предположили, что продукт гена *Fr* прямо или косвенно вызывает сегрегацию митохондрий. Избирательно элиминируются те органеллы, которые содержат *pvs*-локус, при этом селективное преимущество получают нормальные митохондрии, которые скорее всего в незначительном количестве сохраняются даже при ЦМС [He et al., 1995]. Дальнейшие исследования *pvs-orf239*-последовательности у стерильных растений и спонтанных фертильных ревертантов показали, что органеллы, содержащие *pvs*-локус, у фертильных ревертантов сохраняются в субстехиометрическом количестве — менее одной копии на 100 клеток [Arrieta-Montiel et al., 2001] (рис. 11.7).

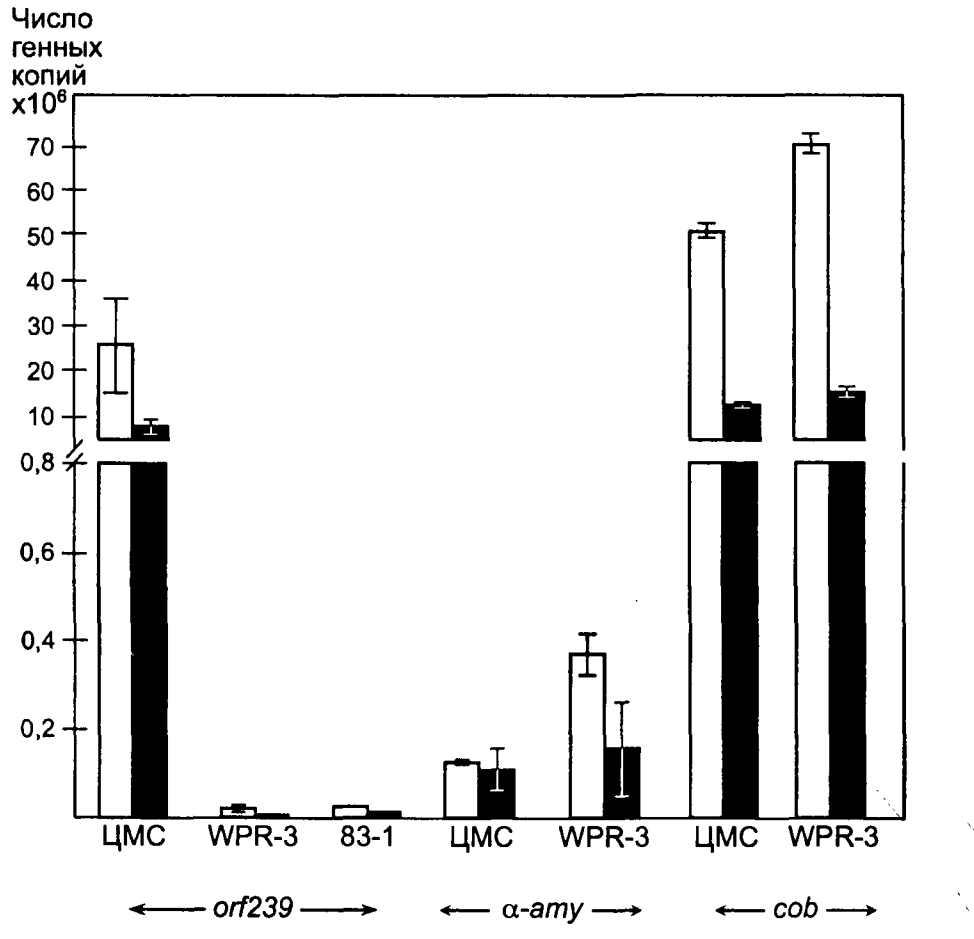


Рис. 11.7. Число генных копий *pvs-orf239* в сравнении с геном митохондрий апоцитохрома *b (cob)* и ядерным геном альфа-амилазы *(α–amy)* у мужски стерильной линии фасоли CMS-Sprite и двух независимых спонтанных ревертантов WPR-3 и 83-1. Черные столбцы — анализировалась ДНК молодых проростков, белые — зрелых листьев. Число копий *pvs-orf239* у фертильных ревертантов уменьшается в тысячи раз [по Arrieta-Montiel et al., 2001]

Изменения в структуре митохондриальной ДНК при реверсии ЦМС-растений к фертильности выявлены у проса (*Pennisetum americanum* L.) [Smith et al., 1987]. Модифицируется структура митохондриального генома и при восстановлении S-типа стерильности у кукурузы под действием гена *Rf3*: у линии M825 S1- и S2-репликоны исчезают как самостоятельные ДНК молекулы, при этом в митохондриальном геноме обнаруживаются S2-последовательности. Потеря S-элементов происходит при восстановлении фертильности не у всех линий: фертильные ревертанты линии WF9 сохраняют S1- и S2-плазмиды [Levings, Brown, 1989].

Эффект генов Rf на экспрессию ЦМС-локусов

Экспрессия многих ЦМС-транскриптов подавляется генами-восстановителями фертильности. Так, присутствие гена *Rf1* незначительно снижает количество мРНК *urf13*. Далее первичные транскрипты подвергаются процессингу, в результате чего основным у растений с *Rf1* аллелем становится "укороченный" транскрипт, содержащий неполную последовательность *urf13*. Именно с этой посттранскрипционной модификацией, а не с нарушением собственно транскрипции, как полагают, связано снижение количества 13 кД белка. Интересно, что сайт процессинга у Т-ЦМС-локуса кукурузы и аналогичный сайт у ЦМС-локуса сорго весьма сходны — по всей видимости, определенная последовательность в обоих случаях узнается продуктами ядерных генов-восстановителей [Dill et al.,1997]. Заметим, что первоначально предполагался другой механизм: действие *Rf1* гена на один из этапов трансляции, в результате чего преждевременно завершается синтез большинства, но не всех белков [Kennell, Pring, 1989], однако доказательств этого не получено.

Растения кукурузы с Т-типом цитоплазмы и геном *Rf1* в ядре, несмотря на уменьшение количества 13 кД белка, остаются мужски стерильными. Лишь в присутствии доминантного аллеля второго гена-восстановителя — *Rf2* (который кодирует белок, чрезвычайно сходный с митохондриальной альдегид-дегидрогеназой) восстанавливается нормальный процесс формирования жизнеспособной пыльцы [Hanson, Folkerts, 1992; Wise et al., 1999; Эльконин, Тырнов, 2000]. Недавно показано, что функцию гена *Rf1* может брать на себя любой из двух других генов-восстановителей: *Rf8* или *Rf**. Ведется работа по созданию системы трансформации Т-цитоплазмы и идентификации ДНК-маркеров, связанных с локусом *Rf8* [Wise et al., 1999].

Ген-восстановитель фертильности *Rf3* у кукурузы с другим типом аномалии, ЦМС-S, приводит к появлению более коротких транскриптов митохондриальных генов *cob, atp6, orf355, orf77* в пыльце восстановленных растений по сравнению со стерильной пыльцой. Такие же короткие транс-

крипты *cob* и *atp6* генов найдены в листьях нормальных и восстановленных растений с цитоплазмой S-типа. Вероятно, *Rf3* ген кодирует либо активизирует какой-то модификатор митохондриальной транскрипции (Mmt), который действует не только на ЦМС-гены *orf355, orf77,* но и на транскрипты нормальных генов *cob* и *atp6* [Wen, Chase, 1999]. ЦМС-S и система восстановления фертильности с помощью гена *Rf3* отличаются тем, что действуют на гаметофитном уровне. Растения, гетерозиготные по гену *Rf3,* являются полустерильными: половина пыльцевых зерен жизнеспособна, вторая половина — стерильна. Очевидно, продукт, вызывающий ЦМС, либо накапливается на стадии развивающейся пыльцы, либо только на этой стадии является токсичным. Ген *Rf3,* присутствуя у половины всех гамет, каким-то образом уменьшает количество этого продукта или делает его неактивным [Wen, Chase, 1999].

У петунии под действием генов-восстановителей также происходит снижение уровня 25 кД белка, кодируемого S-*pcf*-локусом [Hanson, 1991].

Тканеспецифическое уменьшение количества молекул транскриптов химерного цистрона *atpA-orf522* показано у восстановленных форм подсолнечника: оно происходит только в мужских цветках восстановленных растений, а точнее, в предмейотических материнских клетках пыльцы [Monéger et al., 1993]. Механизмом, приводящим к уменьшению количества молекул мРНК *atpA-orf522* под действием гена-восстановителя, является полиаденилирование РНК-матриц, которое, как уже обсуждалось (см. главу 4), вызывает ускоренную деградацию молекул рибонуклеазами [Gagliardi, Leaver, 1999].

Скорость транскрипции цистрона *orf224/atp6* одинакова как у стерильных, так и у восстановленных линий *Brassica napus (pol).* Однако ген-восстановитель тканеспецифически изменяет полученный транскрипт: в отличие от стерильных линий, где обнаруживаются два полноразмерных транскрипта размером 2,2 и 1,9 т.п.н, у восстановленных линий появляются более короткие, прошедшие процессинг транскрипты 1,4 и 1,3 т.п.н. Характерно, что такие транскрипты обнаруживаются в лепестках, тычинках, плодолистиках, но не в чашелистиках. Таким образом, ген-восстановитель действует дифференцированно в разных тканях [Menassa et al., 1999].

Эффект генов Rf на посттрансляционную регуляцию

Ядерные гены-восстановители часто не оказывают никакого влияния на транскрипцию ЦМС-локусов, однако изменяют концентрацию белков, связанных с признаком стерильности. Так, у рапса с *ogura*-типом ЦМС в присутствии гена *Rfo* отмечается снижение количества белка ORF138, причем

эффект сильнее всего выражен в пыльниках на той стадии, на которой обычно экспрессируется стерильный фенотип. При этом показано, что транскрипция и трансляция гена *orf138* в почках и пыльниках как стерильных, так и восстановленных растений осуществляются с равной эффективностью. Таким образом, можно заключить, что *Rfo* ген действует на посттрансляционном уровне, уменьшая стабильность белка ORF138 и восстанавливая фертильность [Bellaoui et al., 1999].

Эффект генов Rf на РНК-редактирование

Механизм действия *Rf3* гена у ЦМС-линий риса (цитоплазма Chinsurah Boro II) связан с восстановлением нормального эдитинга *atp6* мРНК. В присутствии *Rf3* гена происходит процессинг дицистрона *atp6-orf79* мРНК: от *atp6* отщепляется измененный 3′-участок, который, видимо, является причиной ЦМС, *atp6* мРНК проходит полный эдитинг; в результате этих событий фертильность пыльцы восстанавливается [Iwabuchi et al., 1993].

В рассмотренном примере с ЦМС-восстановлением у риса процессинг транскрипта, обеспечиваемый геном-восстановителем, предшествует эдитингу.

Действие *Rf3* гена у другого вида — сорго, вероятно, зависит от эдитинга. У стерильной линии сорго IS1112C химерный ген *orf107* при экспрессии образует три длинных транскрипта размером 1110, 870 и 810 нуклеотидов и лишь следовое количество прошедшего процессинг транскрипта длиной 380 нуклеотидов. У фертильного аналога этой линии, восстановленного под действием генов *Rf3* и *Rf4*, на 75% снижено содержание транскриптов длиной 1110, 870 и 810 нуклеотидов, при этом происходит накопление короткого транскрипта (размером 380 нуклеотидов) [Tang et al., 1996]. Как показали исследования, ген *Rf3* у сорго облегчает процессинг прошедших эдитинг транскриптов, однако механизм этого процесса до сих пор неясен [Pring et al., 1998].

Кроме связи эдитинга с действием генов-восстановителей, данный пример позволяет установить еще одну адаптивную роль РНК-редактирования в дополнение к тем, что обобщены в главе 10: эдитинг может регулировать экспрессию генов (по крайней мере химерных генов митохондрий) путем нормализации процессинга отредактированных матриц.

Восстановление фертильности у другой стерильной линии сорго А3Т·398 (ЦМС) коррелировало с восстановлением нормального редактирования *atp6* транскрипта, нарушенного в стерильных пыльниках (см. выше). Согласно предположению авторов, механизм действия *Rf* генов в данной системе заключается либо в супрессии какого-то ингибитора редактирова-

ния, либо в обеспечении какого-то важного кофактора этого процесса. Возможно также, что между процессингом *orf107* и редактированием *atp6* существует причинная связь [Howad, Kempken, 1997].

Гены Rf — клонирование in vitro

К сожалению, большинство генов *Rf* до сих пор не клонированы. Исключением является ген *Rf* в модельной системе — аллоплазматической мужски стерильной линии табака *Nicotiana tabacum* (цитоплазма *N. repanda).* Восстановление фертильности в этой системе достигалось с помощью интрогрессии при гибридизации хромосомного фрагмента *N. repanda* — донора цитоплазмы. Интрогрессированный фрагмент содержал центромеру и ядрышковый организатор и стабильно наследовался в гомозиготном состоянии в восстановленной линии табака. Легко различимый на метафазных пластинках, данный фрагмент был выделен с помощью микроманипуляций, и после проведения микродиссекции его ДНК была микроклонирована. Удалось картировать и определить транскрибируемые ДНК-последовательности, специфические для восстановления фертильности. Решение следующей задачи — определение функции выявленных последовательностей — позволит создать полную картину процесса восстановления фертильности в данной системе [Hernould et al., 1997].

Какими бы разнообразными ни были системы ЦМС у разных растений, эффект ядерных генов-восстановителей фертильности может быть двух типов:

— если ЦМС возникает в результате потери или инактивации какого-то фактора, то ген-восстановитель должен обеспечить растение комплементарно действующим субстратом;

— если ЦМС возникает в результате синтеза новым химерным геном какого-то токсического продукта, ген-восстановитель должен каким-то образом инактивировать этот ген либо его продукт.

Большинство исследованных к настоящему времени ЦМС-систем и генов-восстановителей представляют пример второго типа [Saumitou-Laprade et al., 1994].

Рассмотренные в данном разделе примеры позволяют заключить, что гены-восстановители фертильности разных ЦМС-систем могут: 1) снижать количество полноразмерных транскриптов ЦМС-генов, влияя на РНК-процессинг и РНК-эдитинг; 2) изменять число копий митохондриальных хромосом, несущих ЦМС-ген; 3) уменьшать количество продукта ЦМС-генов, действуя посттрансляционно. Системы восстановления фертильности, вероятно, не менее разнообразны, чем ЦМС-системы.

ЦМС у пшеницы: ядерно-плазменный конфликт

Полвека прошло с тех пор, как японский генетик Кихара обнаружил, что при сочетании ядерного генома гексаплоидной мягкой пшеницы *Triticum aestivum* с цитоплазмой *Aegilops ovata* нарушается развитие пыльцы [Kihara, 1951]. Позднее было установлено, что и цитоплазматические геномы некоторых других видов *Triticum* и *Aegilops* при сочетании с ядром *T. aestivum* приводят к ЦМС. Так, цитоплазма *A. kotschyi* приводит к ЦМС в случае сочетания с ядром *T. spelta* или сортами пшеницы, имеющими пшенично-ржаную транслокацию 1B/1R [Panayotov, 1980]. Ряд цитоплазматических геномов вызывают раннюю стерилизацию пыльцы в онтогенезе (*A. caudata, T. monococcum),* другие — позднюю (*T. timopheevi, T. dicoccoides, T. zhukovskyi),* цитоплазмы *A. speltoides* и *A. comosa* являются промежуточными по этому признаку [Орлов, 2001]. Среди разнообразных "гибридных" ЦМС наибольшее практическое использование приобрела система с цитоплазмой *T. timopheevi.*

Молекулярный анализ митохондриальной ДНК 100 видов пшениц показал, что некоторые из них весьма близки между собой (цитоплазмы *T. durum* и *T. aestivum),* тогда как в других (среди них и *T. timopheevi)* выявляюся значительные различия [Terachi et al., 1990]. Дальнейшие исследования обнаружили, что определенные митохондриальные гены в цитоплазмах *T. aestivum* и *T. timopheevi* организованы по-разному [Bonen, 1995]:

— митохондриальные гены *cox1, atpA, atp6* и *atp9* имеют разную структурную организацию;

— 5′-концевые последовательности генов *atp6* и *orf25* имеют разную организацию, транскрипты их в разных цитоплазмах различаются между собой по размеру;

— ген *atp6* в цитоплазме *T. timopheevi* представлен одной копией, тогда как у *T. aestivum* — четырьмя [Kück et al., 1995];

— гены *cob* и *atpA /atp9* представлены в митохондриальном геноме *T. aestivum* одной копией, а у *T. timopheevi* — двумя. Две копии *cob* гена различаются своими 3′-фланкирующими последовательностями, и стабильные транскрипты обнаружены только с одной копии [Bonen, 1995];

— непосредственно перед геном *cox1* у мтДНК *T. timopheevi* имеется вставка, содержащая новую рамку считывания — *orf256,* не выявленную у *T. aestivum.* Происхождение этой последовательности неясно, так как ни в ядерном, ни в хлоропластном геномах *T. aestivum* и *T. timopheevi* гомологичных фрагментов не найдено [Bonen, 1995].

Митохондрии как *T. aestivum,* так и *T. timopheevi* несут химерные гены подобно описанным для других видов растений с ЦМС [Mohr et al., 1993].

Так, в обеих цитоплазмах химерным является 5'-фланкирующий район генов *atp6* и *orf25* [Kück et al., 1995]. Химерный ген *orf256* является матрицей для нового белка размером 7 кД, присутствующего только у стерильных растений и локализованного, вероятно, на внутренней мембране митохондрий. У восстановленных растений на цитоплазме *T. timopheevi* данного белка не обнаружено [Song, Hedgcoth, 1994].

Поиск малых экстрахромосомных элементов проводился в митохондриях как нормальных, так и стерильных пшениц. Плазмидных ДНК не обнаружено, однако в мтДНК обеих пшениц найдены последовательности, гомологичные S1- и S2-эписомам ЦМС-S-типа кукурузы [Rathburn, Hedgcoth, 1992; Bonen, 1995].

Несмотря на все эти перестройки, у самих эуплазматических растений *Triticum aestivum,* так же как и у *T. timopheevi,* успешно формируется фертильная пыльца. Однако при сочетании цитоплазмы *T. timopheevi* с ядром вида, имеющего другой тип мтДНК, например *T. aestivum,* возникает ЦМС. Анализ приведенных в данной монографии многочисленных фактов ядерно-цитоплазматического взаимодействия в процессе жизнедеятельности организма позволяет, не колеблясь, отнести ЦМС у пшеницы к примерам ядерно-цитоплазматического конфликта. Ядерные гены-восстановители впервые описаны для данной ЦМС-системы еще в 60-е годы [Wilson, Ross, 1962]. В дальнейшем они были локализованы на хромосомах 1A и 6B, а также более слабые — так называемые модификаторы *Rf*-генов — на 1B, 4B и 4D хромосомах [Maan et al., 1984]. Локус *Rf* на хромосоме 1B (вблизи ядрышко-образующего участка) эффективно восстанавливает стерильность, вызванную введением различных чужеродных цитоплазм [Tsunewaki, 1993; Mukai, Endo, 1992].

Фотопериод-чувствительная ЦМС (PCMS) — еще одна разновидность ЦМС у пшеницы, которая наблюдается при замене у сорта Norin26 (N26) пшеничной цитоплазмы на цитоплазму *Aegilops crassa.* Если аллоплазматические растения *(cr)-N26* находятся в режиме светового дня менее 15 часов, они формируются нормально, при более продолжительном световом дне у них развивается пистиллоидность пыльников [Ogihara et al., 1997]. У линии с PCMS наблюдаются изменения в структуре гена *orf25* и его транскриптах. Кодирующая часть гена не изменена, однако 5'-фланкирующий участок *orf25* у *A. crassa* трансформирован в результате рекомбинации с участком, фланкирующим у *Triticum aestivum* ген *rps7.* В результате данной рекомбинации у митохондрий *A. crassa* и аллолиний на этой цитоплазме перед *orf25* образуется новая открытая рамка считывания *orf48,* т.е. образуется дицистрон *orf48-orf25.* Было показано, что у аллолинии *(cr)-N26* процессинг этого дицистрона нарушается, что приводит, вероятно, к аномальному развитию

пыльников. Как именно наблюдаемые нарушения в митохондриальном геноме связаны с пистиллоидностью и какую роль в этих процессах играет продолжительность светового дня, пока не ясно [Ogihara et al., 1999].

Природа дефектов, возникающих при ЦМС

Первые признаки аномального развития пыльников часто, хотя и не всегда, наблюдаются на стадии мейоза материнских клеток пыльцы. Так, у *Petunia* в это время клетки тапетума становятся аномально вакуолизированными [Hanson, 1991]. Аномалии в тапетуме и среднем слое пыльников наблюдаются у ЦМС-растений кукурузы, сахарной свеклы, лука и др. [Warmke, Lee, 1977; Палилова, 1969; Протасевич, 1984; Hanson, 1991]. В клетках тапетума количество митохондрий увеличено в 20—40 раз по сравнению с другими тканями растений [Warmke, Lee, 1978].

Прямые доказательства критической роли тапетума в развитии пыльцы получены на трансгенных растениях: было показано, что чужеродный рибонуклеазный ген, экспрессирующий токсический продукт под действием специфического для ткани тапетума промотора, вызывает формирование стерильных пыльников [Mariani et al., 1990].

Определяющая роль тапетума в микроспорогенезе вызывает вопрос о том, почему именно в этой ткани проявляется дефект митохондриального генома, который несут все клетки ЦМС-растения. Исследование тотальных белковых экстрактов клеток ЦМС-растений *Petunia* показало, что *pcf*-белок присутствует в экстрактах пыльников в большем количестве, чем в экстрактах листьев. Увеличение экспрессии аномальных генов и накопление продукта их деятельности в тканях пыльников может отчасти объяснить локальный эффект ЦМС-генов [Hanson, 1991].

Иной механизм приводит к формированию стерильности у *Phaseolus vulgaris*. У ЦМС-растений фасоли, как уже обсуждалось, белок — продукт гена *orf239* — не обнаруживается в вегетативных тканях, так как быстро разрушается специфической митохондриальной протеазой. В генеративных тканях (как пыльниках, так и зародышевом мешке) белок был найден ассоциированным с внутренней мембраной митохондрий и, что оказалось совершенно неожиданным, с каллозным слоем и первичной клеточной стенкой развивающихся пыльцевых клеток. Эти данные указывают на то, что происходит экспорт этого белка из митохондрий в цитоплазму и затем к периферии клетки, где он вызывает нарушение отложения каллозы. Является ли это непосредственной причиной стерильности или каким-то вторичным эффектом экспрессируемого *orf239* гена, неясно [Abad et al., 1995], как неясен и механизм транспорта белка из митохондрий к клеточной стенке [Mackenzie, McIntosh, 1999, см. литературу к главе 4].

Для подтверждения роли *orf239* гена в формировании стерильности пыльцы он был введен в ядерный геном табака. Трансформанты, получившие *orf239,* имели стерильную или полустерильную пыльцу, при этом их митохондрии не несли никаких мутаций. По мнению авторов, митохондриальный геном растений может быть высокочувствительным к мутациям, изменяющим его фенотип, и, вероятно, митохондрии обладают механизмом экспорта в цитоплазму мутантных белковых продуктов [He et al., 1996].

С Т-типом ЦМС у кукурузы связана, как давно известно, высокая чувствительность к токсину, вырабатываемому грибом *Helminthosporium maydis* [Miller, Koeppe, 1971], а также к пестициду метомилу [Koeppe et al., 1978]. Кодирующая последовательность *urf13* ЦМС-Т кукурузы была введена в экспрессируемом векторе в *E. coli.* Трансформированные бактериальные штаммы отличались морфологическими изменениями и/или замедленным ростом и, так же как ЦМС-Т растения, были чувствительны к грибному токсину [Braun et al., 1989]. Периплазматические мембраны этих штаммов имели повышенную проницаемость, а токсин *H. maydis* и метомил вызывали у них потерю дыхательной активности. Если ген *urf13* изменялся в результате мутации, все перечисленные эффекты исчезали [Braun et al., 1989; Hanson, 1991]. При введении в ядерный геном дрожжей *urf13*-последовательности совместно с митохондриальной "направляющей" (targeting) последовательностью дрожжи также приобретают повышенную чувствительность к токсину [Huang et al., 1990].

В клетках растений с Т-типом цитоплазмы происходит аналогичный процесс: токсин *H. maydis* связывается с белком URF13 в митохондриях, что приводит к увеличению проницаемости мембран митохондрий, выделенных из этиолированных проростков кукурузы, и нарушению дыхания [Holden, Sze, 1984, 1987]. Однако в отсутствие токсина растения с Т-цитоплазмой абсолютно не проявляют фенотипической депрессии, лишь развитие пыльцы останавливается. Согласно высказанной еще до обнаружения *urf13* и до сих пор не опровергнутой гипотезе, пыльники продуцируют какое-то вещество, которое действует аналогично Т-токсину или метомилу [Flavell, 1974]. Природа данного вещества и сам факт его существования не установлены.

У растений кроме обычного пути окислительно-восстановительных реакций через систему цитохромов и цитохромоксидазы, типичного также для животных, имеется альтернативный путь — с участием фермента цианид-резистентной альтернативной оксидазы [Elthon, McIntosh, 1987]. Данный фермент имеется у растений, грибов и некоторых простейших [Vanlerberghe, McIntosh, 1997]. Активность альтернативной оксидазы возрастает при различных стрессах, таких, как холод, атаки патогенов, засуха, раневые повреждения [Mackenzie, McIntosh, 1999, см. литературу к главе 4].

Снижение активности альтернативной оксидазы в клетках или изолированных митохондриях стерильных растений по сравнению с фертильными аналогами обнаружено у линий *Petunia,* восстановление фертильности пыльцы сопровождается повышением активности этого фермента до нормального уровня. Возможно, высокий уровень активности альтернативной оксидазы необходим в тканях тапетума при синтезе многих компонентов, важных для формирования фертильной пыльцы, а при ЦМС у *Petunia* регуляция этого фермента нарушается [Hanson, 1991]. У одного из видов капусты ингибиторы альтернативного респираторного пути вызывали ЦМС [Kishitani, Konno, 1990]. Противоречащие этим данным результаты были получены у подорожника [Van Dijk, Kuiper, 1989] и при исследовании G-типа ЦМС, широко распространенного у свеклы. Оказалось, что у G-стерильных растений уровень цитохромоксидазы снижен вдвое по сравнению с контрольными, а активность альтернативной оксидазы повышена, что компенсировало, по мнению авторов, недостаточность цитохромоксидазы [Ducos et al., 2001]. Вероятно, у различных ЦМС-систем природа нарушений, приводящих к формированию нежизнеспособной пыльцы, может существенно различаться.

ЦМС и апоптоз

Роль митохондрий в программируемой клеточной смерти (апоптозе) установлена у млекопитающих (см. главу 14). При изучении PET1-ЦМС-системы подсолнечника показан преждевременный апоптоз клеток тапетума, распространяющийся затем и на другие ткани пыльника [Balk, Leaver, 2001]. Обнаружено, что высвобождение цитохрома *c* активирует протеолитический ферментный каскад, что приводит к деградации ядерной ДНК и смерти клетки. У ЦМС-растений иммуноцитохимический анализ показал, что цитохром *c* частично выделяется из митохондрий в цитозоль клеток тапетума, что предшествует значительным изменениям этих клеток. Оказалось, что снижение содержания цитохрома *c* в митохондриях, выделенных из стерильных цветков подсолнечника, наблюдалось еще до нарушения целостности наружной митохондриальной мембраны и показателей дыхания. На данном примере впервые показано, что митохондрии растений, так же как и млекопитающих, играют ключевую роль в индукции программируемой клеточной смерти [Balk, Leaver, 2001].

* * *

Значительный прогресс в изучении молекулярной природы ЦМС связан с применением высокоразрешающих методов исследования митохондриального генома стерильных растений и последовательных этапов его экс-

прессии. Почти у всех исследованных ЦМС-форм выявлены химерные гены, образованные путем реорганизации молекул митохондриальных ДНК, показана экспрессия этих генов. Доказано влияние генов-восстановителей на репликацию и разные этапы экспрессии аномальных митохондриальных генов. *Rf* гены картированы у ряда ЦМС-систем, выяснен молекулярный механизм действия некоторых из них. Однако для полного понимания процессов, которые приводят к образованию абортивной пыльцы, необходимо установить, как контролируется тканеспецифическая экспрессия ЦМС-генов, как регулируется во времени и пространстве экспрессия ядерных генов-восстановителей, связать эти данные с особенностями метаболизма в тканях пыльников и с явлениями апоптоза. Маловероятно, что в основе формирования стерильной пыльцы у разных видов растений лежит нарушение одной и той же митохондриальной функции, скорее всего дефекты в различных митохондриальных функциях могут приводить к одному и тому же фенотипическому проявлению.

Примечательно, что изучение цитоплазматической мужской стерильности привело к открытию ряда явлений, ключевых для понимания фундаментальных процессов в растительной клетке. Так, благодаря детальному анализу этой системы впервые была показана посттранскрипционная регуляция в митохондриях растений, обнаружен единственный не редактируемый в митохондриях растений белок и установлена ключевая роль самих митохондрий в индукции программируемой клеточной смерти органов и тканей растений.

Феномен цитоплазматической мужской стерильности растений представляет собой не только практически значимую мутацию для производства гибридных гетерозисных семян, но и прекрасную теоретическую модель для изучения взаимодействия ядерных и цитоплазматических генетических систем клетки. Первоначально открытый у многих видов растений как неменделевски наследующийся признак, он был затем востребован практикой. Широкое и экономически эффективное использование этого феномена стимулировало многочисленные исследования геномов органелл растений, открыло перспективы новых молекулярных исследований, которые, несомненно, снова будут востребованы практикой в гораздо более широком объеме. Таким образом, история почти векового изучения ЦМС замечательно иллюстрирует тесную взаимосвязь и взаимозависимость прикладной и фундаментальной науки.

Литература

Крупнов В.А. Генная и цитоплазматическая мужская стерильность растений. М.: Колос, 1973. 279 с.

Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. Минск, 2001. 170 с.

Палилова А. Н. Цитоплазматическая мужская стерильность у растений. Минск: Наука и техника, 1969. 211с.

Палилова А.Н., Турбин Н.В., Серпокрылова Л.С. Цитохимическое изучение активности дыхательных ферментов в пыльниках стерильных и фертильных линий кукурузы //Докл. АН СССР. Сер. биол. 1966. Т. 169, № 3. С. 677—679.

Палилова А.Н., Турбин Н.В., Атрашенок Н.В. Электронномикроскопическое изучение семяпочек кукурузы с различной цитоплазмой // Докл. АН СССР. Сер. биол. 1967. Т. 176, № 1. С. 202—204.

Протасевич Р.Т. Морфолого-анатомические особенности растений с мужской стерильностью. Минск: Наука и техника, 1984. 105 с.

Турбин Н.В., Палилова А.Н. Генетические основы цитоплазматической мужской стерильности у растений. Минск: Наука и техника, 1975. 184 с.

Хаджинов М.И. Стерильность у межрасовых гибридов сорго // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1937. Сер. 2. № 7. С. 417—446.

Хаджинов М.И. Генетические основы цитоплазматической мужской стерильности // Гетерозис: теория и практика. Л., 1968. С. 23—45.

Эльконин Л.А., Тырнов В.С. Генетический контроль цитоплазматической мужской стерильности растений: состояние, проблемы и современные подходы для ее исследования // Генетика. 2000. Т. 36, № 4. С. 437—450.

Abad A.R., Mehrtens B.J., Mackenzie S.A. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean // Plant Cell. 1995. Vol.7. P. 271—285.

Arrieta-Montiel M., Lyznik A., Woloszynska M. et al. Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean// Genetics. 2001. Vol. 158. P. 851—864.

Bailey-Serres J., Hanson D.K., Fox T.D., Leaver C.J. Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome c oxidase subunit I gene in sorghum// Cell. 1986. Vol. 47. P. 567—576.

Balk J., Leaver C.J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release // Plant Cell. 2001. Vol. 13, No. 8. P. 1803—1818.

Bellaoui M., Grelon M., Pelletier G., Budar F. The restorer gene *Rfo* acts post-translationally on the stability of the ORF138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids // Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 40, No. 5. P. 893—902.

Belliard G., Pelletier G., Vedel F., Quetier F. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum* //Mol. Gen. Gen. 1978. Vol. 165. P. 231—237.

Bergman P., Edqvist J., Farbos I., Glimelius K. Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio // Plant Mol. Biol. 2000. Vol. 42, No. 3. P. 531—544.

Boeshore M.L., Hanson M.R., Izhar S. A variant mitochondrial DNA arrangement specific to *Petunia* sterile somatic hybrids// Plant Mol. Biol. 1985. Vol. 4. P. 125—132.

Bonen L. Wheat mitochondrial genome // The Molecular Biology of Plant Mitochondria. 1995. P. 345—364.

Braun C.J., Brown G.G., Levings C.S. III. Cytoplasmic male sterility // Plant gene research: Cell organelles. Wein: Springer Verlag. 1992. P. 219—245.

Braun C.J., Siedow J.N., Williams M.E., Levings C.S. III. Mutations in the maize mitochondrial T-*urf13* gene eliminate sensitivity to a fungal pathotoxin // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1989. Vol. 86. P. 4435—4439.

Budar F., Pelletier G. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use // C.R. Acad. Sci III. 2001. Vol. 324, No. 6. P. 543—550.

Burk L. G. An interspecific bridge-cross: *Nicotiana repanda* through *N. sylvestris* to *N. tabacum* // J. Heredity. 1967. Vol. 58. P. 215—218.

Chase C.D. Expression of CMS unique and flanking mitochondrial DNA sequencies in *Phaseolus vulgaris L.* // Curr. Genet. 1994. Vol. 25. P. 245—251.

Chase C.D., Ortega V.M. Organization of ATPA coding and 3′ flanking sequences associated with cytoplasmic male sterility in *Phaseolus vulgaris* //Curr. Genet. 1992. Vol. 22. P. 147—153.

Clark E.M., Izhar S., Hanson M.R. Independent segregation of the plastid genome and cytoplasmic male sterility in *Petunia* somatic hybrids // Mol. Gen. Gen. 1985. Vol. 199. P. 440—445.

Dewey R.E., Levings C.S. III., Timothy D.H. Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm // Cell. 1986. Vol. 44. P. 439—449.

Dewey R.E., Timothy D.H., Levings C.S. III. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1987. Vol. 84. P. 5374—5378.

Dill C.J., Wise R.P., Schnable P.S. Rf8 and Rf* mediate unique T-*urf13*-transcript accumulation, revealing a mitochondrial consensus sequence associated with RNA processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize// Genetics. 1997. Vol. 147. P. 1367—1379.

Ducos E., Touzet P., Boutry M. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes // Plant J. 2001. Vol. 26, No. 2. P. 171—180.

Duvick D.N. Cytoplasmic pollen sterility in corn // Adv. Genet. 1965. Vol. 13. P. 1—55.

Elthon T.E., McIntosh L. Identification of the alternative terminal oxidase of plant mitochondria // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1987. Vol. 84. P. 8399—8403.

Flavell R. A model for the mechanism of cytoplasmic male sterility in plants, with special reference to maize// Plant Sci. Lett. 1974. Vol. 3. P. 259—263.

Forde B.G., Leaver C.J. Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1980. Vol. 77. P. 418—422.

Forde B.G., Oliver R.J.C., Leaver C.J. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasms in maize // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1978. Vol. 75. P. 3841—3845.

Frank S.A. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility // Amer. Natur. 1989. Vol. 133. P. 345—376.

Gagliardi D., Leaver C.J. Polyadenylation accelerates the degradation of mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 3757—3766.

Gerstel D.U. Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana* (a review) //NC Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 1980. Vol. 263. P. 1—31.

Handa H., Gualberto J.M., Grienenberger J.-M. Characterization of the mitochondrial *orfB* gene and its derivative, *orf224*, a chimeric open reading frame specific to one mitochondrial genome of the "Polima" male-sterile cytoplasm in rapeseed *(Brassica napus* L.)// Curr. Genet. 1995. Vol. 28. P. 546—552.

Hanson M.R. Plant mitochondrial mutations and male sterility // Annu. Rev. Genet. 1991. Vol. 25. P. 461—486.

Hanson M.R., Conde M.F. Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in plants // Int. Rev. Cytol. 1985. Vol. 94. P. 213—267.

He S., Abad A.R., Gelvin S.B., Mackenzie S.A. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco// Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1996. Vol. 93. P. 11763—11768.

Hernould M., Glimelius K., Veuskens J. et al. Microdissection and amplification of coding sequences from a chromosome fragment restoring male fertility in alloplasmic male-sterile tobacco // Plant J. 1997. Vol. 12, No. 3. P. 703—709.

Holden M.J., Sze H. Helminthosporium maydis T toxin increased membrane permeability to Ca^+ in susceptible corn mitochondria // Plant Physiol. 1984. Vol. 75. P. 235—237.

Holden M.J., Sze H. Dissipation of the membrane potential in susceptible corn mitochondria by the toxin of the *Helminthosporium maydis.* Race T and toxin analogs // Plant Physiol. 1987. Vol. 84. P. 670—676.

Howad W., Kempken F. Cell type-specific loss of *atp6* RNA editing in cytoplasmic male sterile *Sorghum bicolor* // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 11090—11095.

Howad W., Tang H.V., Pring D.R., Kempken F. Nuclear genes from TxCMS maintainer lines are unable to maintain *atp6* RNA editing in any anther cell-type in the *Sorghum bicolor* A3 cytoplasm // Curr. Genet. 1999. Vol. 36, No.1-2. P. 62—68.

Huang J., Lee S.H., Lin C. et al. Expression in yeast of the T-URF13 protein from Texas male-sterile maize mitochondria confers sensitivity to methomyl and to Texas-cytoplasm-specific fungal toxins // EMBO J. 1990. Vol. 9. P. 339—347.

Iwabuchi M., Kyozuka J., Shimamoto K. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice // EMBO J. 1993. Vol. 12. P. 1437—1446.

Johns C., Lu M., Lyznik A., Mackenzie S. A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants //Plant Cell. 1992. Vol. 4. P. 435—449.

Kennell J.C., Pring D.R. Initiation and processing of *atp6*, T-*urf13* and *orf221* transcripts from mitochondria of T cytoplasm maize // Mol. Gen. Gen. 1989. Vol. 216. P. 16—24.

Kihara H. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations // Cytologia. 1951. Vol. 16. P. 177—193.

Kishitani S., Konno N. Inhibitors of cyanide-insensitive respiratory pathway induce male sterility in broccoli (*Brassica oleracea)* // Jpn. J. Breed. 1990. Vol. 40. P. 217—222.

Koeppe D.E., Cox J.K., Malone C.P. Mitochondrial heredity: a determinant in the toxic response of maize to the insecticide methomyl // Science. 1978. Vol. 201. P. 1227—1229.

Köhler R.H., Horn R., Lössl A., Zetsche K. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene //Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 227. P. 369—376.

Kubo T., Nishizawa S., Mikami T. Alterations in organization and transcription of the mitochondrial genome of cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Mol. Gen. Gen. 1999. Vol. 262, No. 2. P. 283—290.

Kück U., Laser B., Mohr S. et al. CMS in wheat and triticale // Genetic Mechanisms for Hybrid Breeding. Blackwell Sci., Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 1995. P. 19—36.

Laughnan J.R., Gabay-Laughnan S. Cytoplasmic male sterility in maize // Annu. Rev. Genet. 1983. Vol. 17. P. 27—48.

Laver H.K., Reynolds S.J., Moneger F., Leaver C.J. Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower *(Helianthus annuus)* // Plant J. 1991. Vol. 1. P. 185—193.

Leclercq P. Une stérilité male cytoplasmique chez le tournesol // Ann. Amél Plant. 1969. Vol. 19. S. 99—106.

Levings C.S. III. The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility // Science. 1990. Vol. 250. P. 942—947.

Levings C.S.III., Brown G. G. Molecular biology of plant mitochondria // Cell. 1989. Vol. 56. P.171—179.

Levings C.S.III, Pring D.R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male sterile maize // Science. 1976. Vol. 193. P. 158—160.

L'Homme Y., Stahl R.J., Li X.-Q. et al. Brassica nap cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the *pol* CMS-associated *orf224* gene //Curr. Genet. 1997. Vol. 31. P. 325—335.

Lonsdale D.M. Cytoplasmic male sterility: a molecular perspective // Plant Physiol. Biochem. 1987. Vol. 25. P. 265—271.

Maan S.S., Lucken K.A., Bravo J.M. Genetic analysis of male-fertility restoration in wheat. Chromosomal location of *Rf* genes // Crop Sci. 1984. Vol. 24. P. 17—20.

Mackenzie S.A., Pring D.R., Bassett M.J., Chase C.D. Mitochondrial DNA rearrangement associated with fertility restoration and cytoplasmic male sterility in *Phaseolus vulgaris* L. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 2714—2717.

Makaroff C.A., Apel I.J., Palmer J.D. The *atp-6* coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in mitochondrial genome of cytoplasmic male sterile radish // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 11706—11713.

Makaroff C.A., Apel I.J., Palmer J.D. The role of *cox1* associated repeated sequences in plant mitochondrial DNA rearrangements and radish cytoplasmic male sterility // Curr. Genet. 1991. Vol. 19. P. 183—190.

Makaroff C.A., Palmer J.D. Mitochondrial DNA rearrangements and transcriptional alteration in the male sterile cytoplasm of *Ogura* radish // Mol. Cell. Biol. 1988. Vol. 8. P.1474—1480.

Mariani C., DeBeuckeleer M., Truettner J. et al. Induction of male sterility in plants by chimaeric ribonuclease gene // Nature. 1990. Vol. 347. P. 737—741.

Menassa R., L'Homme Y., Brown G.G. Post-transcriptional and developmental regulation of a CMS-associated mitochondrial gene region by a nuclear restorer gene // Plant J. 1999. Vol. 17. P. 491—499.

Miller R.J., Koeppe D.E. Southern corn leaf blight: susceptible and resistant mitochondria // Science. 1971. Vol. 173. P. 67—69.

Mohr S., Schulte-Kappert E., Odenbach W. et al. Mitochondrial DNA from cytoplasmic male sterile *Triticum timopheevi:* rearranged upstream sequences of the *atp6* and *orf25* genes // Theor. Appl. Gen. 1993. Vol. 86. P. 259—268.

Monéger F., Smart C.J., Leaver C.J. Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene // EMBO J. 1993. Vol. 13. P. 8—17.

Mukai Y., Endo T.R. Physical mapping of cytoplasm-specific nuclear genes in wheat // Nuclear and Organellar Genomes of Wheat Species. Kihara Memorial Foundation, Yokohama, Japan, 1992. P. 85—92.

Murai K., Tsunewaki K. Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat with *Aegilops crassa* cytoplasm //Euphytica. 1993. Vol. 67. P. 41—48.

Nair C.K.K. Mitochondrial genome organization and cytoplasmic male sterility in plants // J. Biosci. 1993. Vol. 18. P. 407—422.

Nakajima Y., Yamamoto T., Muranaka T., Oeda K. A novel orfB-related gene of carrot mitochondrial genomes that is associated with homeotic cytoplasmic male sterility (CMS) // Plant Mol. Biol. 2001. Vol. 46. P. 99—107.

Newton K. J. Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1988. Vol.39. P. 503—532.

Ogihara Y., Futami K., Tsuji K., Murai K. Alloplasmic wheats with *Aegilops crassa* cytoplasm which express photoperiod-sensitive homeotic transformations of anthers, show alterations in mitochondrial DNA structure and transcription // Mol. Gen. Gen. 1997. Vol. 255. P. 45—53.

Ogihara Y., Kurihara Y., Futami K. et al. Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat: nuclear-mitochondrial incompatibility results in differential processing of the mitochondrial *orf25* gene // Curr. Genet. 1999. Vol. 36. P. 354—362.

Ogura R. Studies on the new sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seed // Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 1968. Vol. 6. P. 115—120.

Panayotov I. New cytoplasmic male sterility sources in common wheat: their genetical and breeding considerations // Theor. Appl. Gen. 1980. Vol. 56. P. 153—160.

Pearson O.H. Cytoplasmically inherited sterility characters and flavor components from the species cross *Brassica nigra* (L.) Koch. × *B.oleracea* L.// J. Amer. Hort. Sci. 1972. Vol. 97. P. 397—402.

Pelletier G., Primard C., Vedel F. et al. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion // Mol. Gen. Gen. 1983. Vol. 191. P. 244—250.

Pring D.R., Chen W., Tang H.V. et al. Interaction of mitochondrial RNA editing and nucleolytic processing in the restoration of male fertility in sorghum // Curr. Genet. 1998. Vol.33. P. 429—436.

Pring D.R., Levings C.S.III, Hu W.W.L., Timothy D.H. Unique DNA associated with mitochondria in the "S"-type cytoplasm of male-sterile maize // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1977. Vol. 74, No. 7. P. 2904—2908.

Rathburn H., Hedgcoth C. Maize S1 and S2 sequences in wheat mitochondrial DNA // Plant Sci. 1992. Vol. 85. P. 151—160.

Rhoades M.M. The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays* // J.Genet. 1933. Vol. 27. P. 71—93.

Riesberg L.H., Van Fossen C., Arias D., Carter R.L. Cytoplasmic male sterility in sunflower: origin, inheritance, and frequency in natural populations // J. Heredity. 1994. Vol. 85, No. 3. P. 233—238.

Sarria R., Lyznik A., Vallejos C.E., Mackenzie S.A. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated // Plant Cell. 1998. Vol. 10. P. 1217—1228.

Saumitou-Laprade P., Cuguen J., Vernet P. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict // Tree. 1994. Vol. 9, No. 11. P. 431—435.

Smith R.L., Chowdhury M.K., Pring D.R. Mitochondrial DNA rearrangements in *Pennisetum* associated with reversion from cytoplasmic male sterility to fertility // Plant Mol. Biol. 1987. Vol. 9. P. 277—286.

Song J.S., Hedgcoth C. A chimeric gene *(orf256)* is expressed as protein only in cytoplasmic male-aterile lines of wheat // Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 26. P. 535—539.

Spassova M., Moneger F., Leaver C.J. et al. Characterization and expression of the mitochondrial genome of a new type of cytoplasmic male-sterile sunflower //Plant Mol. Biol. 1994. Vol. 26. P. 1819—1831.

Tang H.V., Pring D.R., Shaw L.C. et al. Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male sterile sorghum //Plant J. 1996. Vol. 10, No. 1. P. 123—133.

Terachi T., Ogihara Y., Tsunewaki K. The molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops* // Theor. Appl. Gen. 1990. Vol. 80. P. 366—373.

Tsunewaki K. Genome-plasmon interactions in wheat // Jpn. J. Genet. 1993. Vol. 68. P. 1—34.

Van Dijk H., Kuiper P.J. No evidence for pleiotropic relationship between male sterility and cyanide-resistant respiration in *Plantago lanceolata* // Physiol. Plant. 1989. Vol. 77. P. 579—586.

Vanlerberghe G.C., McIntosh L. Alternative oxidase: from gene to function //Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 48. P. 703—734.

Warmke H.E., Lee S.-L.J. Pollen abortion in T cytoplasmic male-sterile corn (*Zea mays*): a suggested mechanism // Science. 1978. Vol. 200. P. 561—563.

Weissinger A.K., Timothy D.H., Levings C.S.III et al. Unique plasmid-like mitochondrial DNAs from indigenous maize races of Latin America // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1982. Vol. 79, No. 1. P. 1—5.

Wen L., Chase C.D. Pleiotropic effects of a nuclear restorer of fertility locus on mitochondrial transcripts in male-fertile and S male-sterile maize // Curr. Genet. Vol. 35, No. 5. P. 521—526.

Wilson J.A., Ross W.M. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevi* cytoplasm // Wheat Info. Service. 1962. Vol. 14. P. 29—30.

Wise R.P. Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize // J. Heredity. 1999. Vol. 90, No. 3. P. 380—385.

Young E.G., Hanson M.R. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated // Cell. 1987. Vol. 50. P. 41—49.

Warmke H.E., Lee S.-L.J. Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers // J. Heredity. 1977. Vol. 68. P. 213—222.

Zabala G., Gabay-Laughnan S.J., Laughnan J.R. The nuclear gene *Rf3* affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence R implicated in S-type male sterility in maize // Genetics. 1997. Vol. 147. P. 847—860.

Zetche K., Horn R. Molecular analysis of cytoplasmic male sterility in sunflower *(Helianthus annuus)* // Plant Mitochondria with Emphasis on RNA Editing and Cytoplasmic Male Sterility. Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer, VCH Publishers, 1993. P. 411—422.

Глава 12

Ядерно-плазменные химеры и моделирование растительной клетки

Как уже отмечалось, классические генетические подходы — гибридологический, рекомбинационный и цитогенетический — оказались не столь успешными при изучении генов органелл по сравнению с генами клеточного ядра. Эти подходы лишь продемонстрировали наличие генов, расположенных за пределами клеточного ядра, но не позволили получить информацию об их организации. С возникновением молекулярных методов исследований появилась непосредственная возможность "заглянуть внутрь" геномов органелл и распознать функциональные гены. Вместе с тем нашему пониманию роли органельных геномов в жизнедеятельности эукариот чрезвычайно способствовали специальные экспериментальные системы, позволяющие моделировать поведение ядерных и цитоплазматических генетических систем путем создания новых ядерно-цитоплазматических комбинаций. Все известные подходы к созданию ядерно-цитоплазматических химер можно условно разделить на три группы:

— моделирование на уровне организма (реципрокные гибриды, алло- и изоплазматические линии);

— моделирование на уровне отдельных гибридных клеток и регенерантов, полученных из них (соматическая гибридизация, создание цибридов и их сравнительное изучение);

— моделирование на уровне геномов органелл (трансформация отдельных генов в геномы органелл). В данной главе мы рассмотрим первые два подхода, а в последующей — третий подход к моделированию растительной клетки.

Реципрокные гибриды, алло- и изоплазматические линии

Задолго до геномных исследований некоторые простые модели демонстрировали наличие генов вне ядра и эффекты этих генов на те или иные количественные и качественные признаки.

Самой простой из таких моделей являются реципрокные гибриды, особенно удобно их использовать у обоеполых организмов, в частности у растений. В действительности, если мы имеем прямые и обратные гибридные комбинации двух генотипов **A** и **B**, то гибриды F1 имеют половину ядерных генов от каждого из родителей **A** и **B** независимо от направления скрещивания и, следовательно, будут идентичны друг другу по ним. Гены цитоплазматических органелл в силу их материнского наследования, по крайней мере у большинства видов растений, будут только одного типа — **a** или **b**:

$$A(a) \times B(b) = AB\ (a),$$
$$B(b) \times A(a) = AB\ (b).$$

Если цитоплазматические гены **а** и **в** отличаются друг от друга, то те или иные различия между прямыми и обратными гибридами, наблюдаемые в опыте, можно объяснить действием этих генов.

Следует отметить, что не всякий материнский эффект, не всякие различия в реципрокных гибридах объяснимы разным действием цитоплазматических генов двух гибридизируемых форм. Например, семена прямых и обратных гибридов F1 однодольных различаются геномами своих триплоидных эндоспермов — **ААВ** и **АВВ** соответственно. Генетическая разница между эндоспермами может вызывать несходство в развитии растений, особенно на ранних стадиях их онтогенеза. Как у растений, так и у животных яйцеклетка, несущая значительный объем различных биосинтетических компонентов (в том числе долгоживущих матричных РНК), может предопределять особенности развития организма. Этот материнский эффект обусловлен ядерными генами яйцеклетки, а не различием по органельным генам двух родителей. Таким образом, реципрокные гибриды всего лишь предварительная модель для изучения эффектов цитоплазматичесих генов.

По-видимому, более информативной моделью являются аллоплазматические линии растений. Первоначально их начали создавать еще в начале XX в., используя межвидовые гибриды растений. При многократном бекроссировании одного вида другим возможна практически полная замена хромосом материнской формы на хромосомы отцовской. В силу однородительского наследования генов органелл можно создать формы с ядерными генами одного и цитоплазматическими генами другого родителя.

Сравнивая донор ядра и аллоплазматическую линию по тем или иным признакам, можно судить об эффекте цитоплазматических генов, поскольку у них одинаковые ядерные гены, но разные органельные. Сравнивая донор цитоплазмы и аллоплазматическую линию, можно судить об эффекте ядерных генов, так как у них одинаковые органельные гены, но разные гены ядра (рис.12.1).

Поскольку практический интерес возникает, как правило, только к одному из скрещиваемых видов, обычно создают серии аллоплазматических линий, представляющих комбинацию нескольких ядерных геномов (в основном это разные сорта культивируемого вида) и цитоплазм нескольких видов (чаще всего это дикие родственники культивируемого вида). Такой набор линий дает возможность проводить оценку эффекта ядерных и цитоплазматических генов на те или иные признаки и сравнивать эти эффекты между собой.

Одна из самых больших в мире коллекций аллоплазматических линий создана на пшенице. Первую серию линий получил еще в 1951 г. H. Kihara,

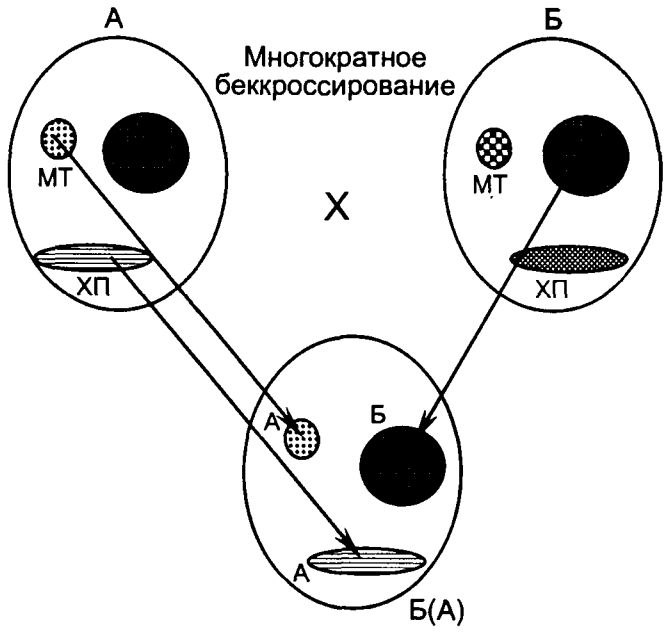


Рис.12.1. Схема создания аллолиний. А — материнская форма (донор цитоплазмы); Б — отцовская форма (донор ядра); Б(А) — аллолиния, сочетающая ядерный геном Б с геномом органелл А

используя ядро мягкой пшеницы и цитоплазму дикого злака *Aegilops ovata* [Kihara, 1951]. Для этого на протяжении 8—10 поколений проводилось беккроссирование растений *A. ovata* пыльцой *Triticum aestivum,* что привело к замещению в ядре хромосом эгилопса на пшеничные, в то время как геномы цитоплазматических органелл, наследующихся по материнской линии, сохранились от *Aegilops* [Kihara, 1951]. В последующие годы были получены замещенные линии пшеницы с ядром *T. aestivum* и *T. durum* и органельными геномами различных видов *Aegilops* [Fukasawa, 1959; Maan, 1973; Panayotov, Gotsov, 1975; Tsunewaki et al., 1976; Tsunewaki, 1980]. Так, коллекция аллоплазматической пшеницы, созданной в Японии учениками и последователями H. Kihara, в настоящее время включает линии с ядерными генотипами 12 сортов гексаплоидной мягкой пшеницы и цитоплазматическими геномами 8 различных видов пшениц (10 источников) и 24 видов эгилопсов (36 источников) — всего 552 комбинации [Tsunewaki et al., 1996].

Позднее белорусскими генетиками была создана коллекция, сочетающая геномы 7 сортов культурного ячменя *Hordeum vulgare* и цитоплазматические геномы 12 форм дикого, полукультурного и культурного ячменя (*H. vulgare* и *H. spontaneum*) — всего 84 ядерно-плазменные комбинации [Sychjova et al., 1998].

Исследование таких обширных коллекций по множеству признаков выявило интересную закономерность — значительная часть количественных признаков растений, в том числе и признаков, влияющих на продуктивность и приспособленность растений, обусловлена действием не только ядерных, но и цитоплазматических генов. Так, по оценке японских исследователей, около 25% генотипической изменчивости обусловлено генами органелл, в то время как 75% приходится на долю ядерного генома [Tsunewaki et al.,

1984]. Удивительно, но факт — менее 1% генов, находящихся в цитоплазме, способно обусловливать до 25% общей генотипической изменчивости. Отчасти этот феномен можно объяснить тем, что гены органелл играют важную роль в обеспечении важнейших энергетических процессов в жизни растения — фотосинтеза и дыхания, протекание которых в отличие от других наиболее тесно связано с различными функциями организма. С другой стороны, при создании аллоплазматических линий используется межвидовая изменчивость по цитоплазматическим генам и, как правило, внутривидовая изменчивость по ядерным генам. Может быть, в этом кроется причина выявления слишком большой роли геномов цитоплазматических органелл?

Для выяснения данного вопроса в 80-х годах в Беларуси была создана коллекция изоплазматических линий пшеницы [Давыденко, Червякова, 1988] и ячменя [Батуро и др., 1988]. Изоплазматические линии названы так по аналогии с изогенными и представляют собой комбинации ядерных и цитоплазматических геномов в пределах одного вида [Davydenko, 1991]. Разные инбредные ("чистые") линии, создаваемые в пределах вида, *a priori* полиморфны по своим ядерных генам, в то время как несходство по цитоплазматическим генам в пределах вида скорее исключение, чем правило. Так, при исследовании сортов многих видов формы, имеющие различия по ДНК своих митохондрий и хлоропластов, являются редкостью: большинство сортов имеют сходные или идентичные геномы органелл. Происходит это, вероятно, в силу материнского наследования геномов органелл и использования одного сорта в качестве материнского компонента скрещиваний для производства множества других сортов. Например, исследования тридцати сортов пшеницы разного географического происхождения методом эндонуклеазной рестрикции не обнаружили различий по хлоропластным ДНК, а выявленная разница по митохондриальным ДНК показала, что большинство исследуемых сортов относятся к одной группе, в то время как уникальными спектрами рестрикции обладают единичные сорта [Давыденко и др., 1988]. Изучение изоплазматических линий пшеницы и ячменя убедительно продемонстрировало наличие внутривидовой цитоплазматической изменчивости и тот факт, что этот вклад вполне сопоставим с вкладом изменчивости ядерных генов в продуктивность и приспособленность растений (табл. 12.1).

Эффекты замещения цитоплазм на гены, контролирующие признаки продуктивности, изучались в полевых экспериментах на коллекции аллоплазматических линий ячменя. Было установлено, что величина и направленность этих эффектов зависят от ядерного и органельных геномов, а также от конкретной аллоплазматической комбинации.

Дисперсионный анализ полевых данных, проведенный отдельно для

Таблица 12.1

Вклад внутривидовой ядерной и цитоплазматической изменчивости в общую генотипическую изменчивость у изоплазматических линий ячменя

Признаки	Доля влияния генетических факторов		
	геном ядра	геномы органелл	взаимодействие геномов ядра и органелл
Высота растений	28,2	2,8	57,0
Продуктивная кустистость	41,0	4,3	27,8
Длина колоса	48,9	4,3	33,2
Число семян в колосе	63,9	2,5	19,3
Число семян с растения	26,3	4,5	16,1
Масса семян в колосе	35,4	8,6	16,0
Масса семян с растения	21,0	8,9	11,6
Чувствительность к гельминтоспориозу	45,0	16,5	20,8
Чувствительность к септориозу	17,0	14,0	34,9

каждой серии линий, показал, что различия наблюдались как по числу признаков продуктивности, на которые замещение генома органелл оказывало достоверный эффект, так и по характеру влияния. По результатам общего дисперсионного анализа для всех изучавшихся серий замещенных линий фактор цитоплазмы оказывал достоверное влияние на признаки высота растения и длина колоса. Взаимодействие факторов ядра и цитоплазмы было достоверным для всех изученных параметров продуктивности, кроме одного (количество семян в колосе). Сравнение сортов и замещенных линий-аналогов показало, что все изучавшиеся органельные геномы оказывают влияние на продуктивность растений. В серии линий с ядром сортообразца Гостинец пять из шести цитоплазмонов (A, L1, W3, W4, W5) достоверно увеличивали большинство параметров продуктивности. Для 8 из 30 линий с отдельными ядерно-цитоплазматическими комбинациями, такими, как Зазерский — на цитоплазмах L1 и W4, Роланд — на цитоплазмах A, W3, W5, Вежа — на цитоплазме W8 и Визит — на цитоплазмах W3 и W4, не наблюдалось достоверных отличий от их родительских сортов. Для остальных замещенных линий введение новых цитоплазм вызывало, как правило, лишь незначительное снижение отдельных параметров продуктивности (табл. 12.2) [Голоенко и др., 2002].

Таблица 12.2

Основные результаты двухфакторного дисперсионного анализа замещенных линий ячменя и сортов-аналогов по некоторым хозяйственно ценным признакам (1998 г.) [по Голоенко, 2003]

Признаки	Ядро		Цитоплазма		Взаимодействие ядра и цитоплазмы		Случайные отклонения
	F-критерий Фишера	Доля влияния по Плохинскому, %	F-критерий Фишера	Доля влияния по Плохинскому, %	F-критерий Фишера	Доля влияния по Плохинскому, %	Доля влияния по Плохинскому, %
Высота растений	598,70*	34,98	13,95*	1,22	16,78*	5,88	51,65
Продуктивная кустистость	108,45*	10,45	1,06	0,15	3,76*	2,17	85,21
Длина колоса	375,78*	28,48	4,24*	0,48	3,85*	1,75	67,00
Число семян в колосе	436,00*	31,97	1,73	0,19	2,88	1,27	64,81
Число семян с растения	14,49*	1,53	0,99	0,16	2,38*	1,80	93,49
Масса семян с растения	15,76*	1,66	0,69	0,11	2,53*	1,60	93,21

* Различия достоверны при $P < 0,01$.

Диаграммы различий по одному из главных признаков — масса семян с растения для двух серий линий с ядром сортов Вежа и Актив демонстрируют, как контрастно может изменяться экспрессия разных ядерных геномов в сочетании с одними и теми же органельными геномами (рис.12.2) [Goloenko et al., 2001].

В целом алло- и изоплазматические линии явились хорошей моделью, демонстрирующей не только вклад генов цитоплазматических органелл в общую генотипическую изменчивость, но и феномены взаимодействия генетических систем, эффект которых часто даже значительно выше, чем эффект собственно цитоплазматических генов (см. табл. 12.1). Это подтверждается в многочисленных исследованиях как алло-, так и изоплазматических линий.

Благодаря изучению различных ядерно-цитоплазматических химер были установлены многочисленные факты влияния геномов органелл на перечисленные ниже процессы и свойства растений:

— экспрессию ядерных генов, контролирующих морфологические и ко-

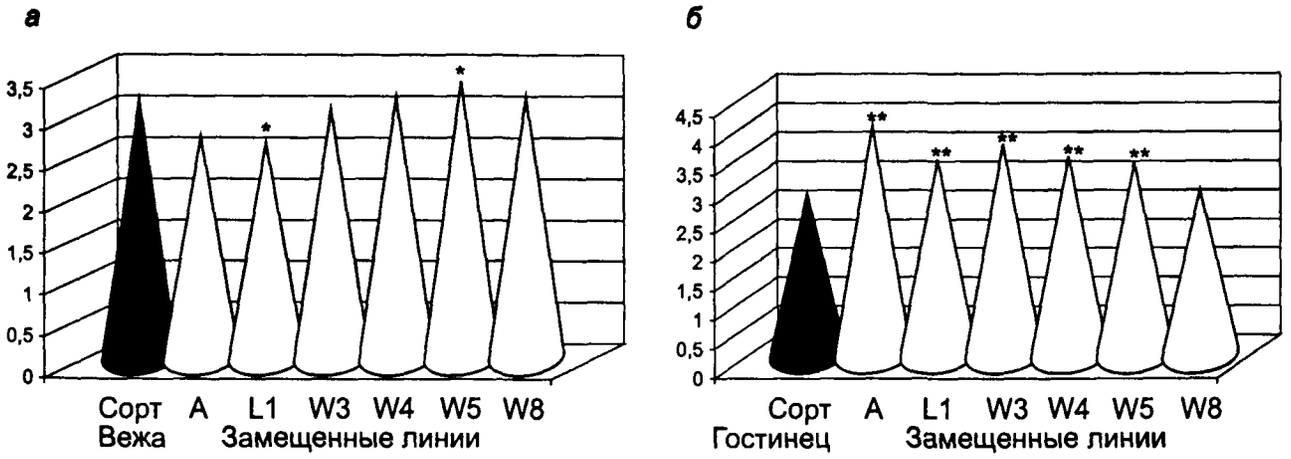


Рис. 12.2. Влияние цитоплазм на признак масса семян с растения в сериях замещенных линий с ядерными геномами сортов Вежа (*а*) и Гостинец (*б*). Различия достоверны: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$

личественные признаки [Kinoshita et al., 1979; Maan, 1980; Panayotov, 1980; Tsunewaki, 1980; Батуро и др., 1989; Давыденко, 1984а, 1989; Сілкова, Палілава, 1986];

— фертильность [Wilson, Ross, 1962; Panayotov, 1980; Tsuji, Maan, 1981; Давыденко, 1984б; Tsunewaki et al., 1996 и др.; см. главу 11, раздел "ЦМС у пшеницы"];

— фотосинтетические и респираторные параметры [Iwanaga et al., 1978; Evans, 1986; Nakamura et al., 1991];

— гаплоидизацию проростков [Tsunewaki et al., 1968];

— устойчивость к патогенам и другим стрессовым факторам [Washington, Maan, 1974; Banga et al., 1984; Петров и др., 1985; Одинцова и др., 1985; Силкова, Палилова, 1987; Палилова и др., 1989; Keane, Jones, 1990; Волуевич, Булойчик, 1991,1992,1999; Волуевич и др., 1995; Орлов, 2001];

— морфогенетические потенции [Орлов, Палилова, 1989; Орлов, 2001];

— конъюгацию хромосом, трансмиссию и рекомбинацию отдельных компонентов ядерного генома [Nakata et al., 1985; Лугинин и др., 1987; Давыденко, 1989; Sychova et al., 1998].

Так, например, с помощью аллоплазматических линий пшеницы и ячменя был исследован феномен нарушения передачи (трансмиссии) отдельных хромосом в поколениях растений и показана роль органельных геномов в этом процессе. Важно отметить, что эффект цитоплазматических геномов на сдвиг в расщеплении маркерных генов ядра локус-специфичен: органельные геномы, вызывающие сдвиг в расщеплении по одному маркеру, могли не вызывать изменения по другим [Давыденко, 1984а, 1989]. В некоторых случаях даже внутривидовые замещения цитоплазматических геномов приводили к нарушению трансмиссии отдельных хромосом у ячменя,

о чем можно было судить по изменению частот расщепления ряда маркерных признаков, кодируемых ядром, в анализирующих скрещиваниях и у F2 гибридов [Голоенко и др., 2002; Голоенко, 2003]. Интересно, что нарушение трансмиссии ядерных генов с одними цитоплазмонами наблюдается в женских, а с другими — в мужских гаметах [Голоенко и др., 2002].

Локус-специфический эффект отмечен при изменении частоты митотических рекомбинаций (сестринских хроматидных обменов — СХО) у замещенных линий пшеницы и ячменя: для разных хромосом и даже разных участков хромосом последствия замещения цитоплазмона были различными (рис. 12.3) [Лугинин и др., 1987; Аксенова, Давыденко, 1995; Sychova et al., 1998]. Для получения прямого доказательства влияния цитоплазмона на частоту мейотических рекомбинаций в последнее время мы использовали молекулярные маркеры — микросателлиты. При исследовании рекомбинаций между морфологическим и микросателлитным локусами 5H группы сцепления в популяциях гибридов аллолиний ячменя с маркерными линиями обнаружены нарушения частот рекомбинаций в гибридных популяциях растений с замещенными цитоплазмами [Голоенко, 2003].

Конкретные механизмы изменения частот ядерных генов и рекомбинаций, как митотических, так и мейотических, в измененном цитоплазмоне пока не ясны. В основе этих феноменов лежит, по-видимому, разная жизнеспособность определенных ядерно-плазменных комбинаций как на зиготном, так и на гаметном уровне, а также избирательность оплодотворения в зависимости от цитоплазмы и генотипа гамет. Выяснение механизмов прямого или опосредованного участия геномов органелл в процессах рекомбиногенеза ядерной ДНК — задача будущих исследований.

Анализируя разнообразные, иногда противоречивые результаты, полученные в экспериментах с аллоплазматическими линиями, следует иметь в виду одно важное соображение. Секвенирование хлоропластных и митохондриальных геномов разных организмов позволило достаточно точно определить их кодирующую способность, хотя функция установлена пока не для всех рамок считывания. Тем не менее, поскольку структурно и функционально органеллы, как митохондрии, так и пластиды, формируются в основном за счет генов ядра, то аллоплазматические формы, строго говоря, различаются только теми компонентами, которые кодируются ДНК самих митохондрий и пластид. Подавляющее большинство органельных белков у аллоплазматических растений синтезируется под контролем своего ядра, и потому у форм с одинаковыми органельными геномами, но разными ядрами сами органеллы не всегда идентичны по своим белковым спектрам, а значит, и по ряду функциональных показателей. Этим отчасти объясняются, на наш взгляд, противоречивые данные о влиянии того или иного цитоплазматичес-

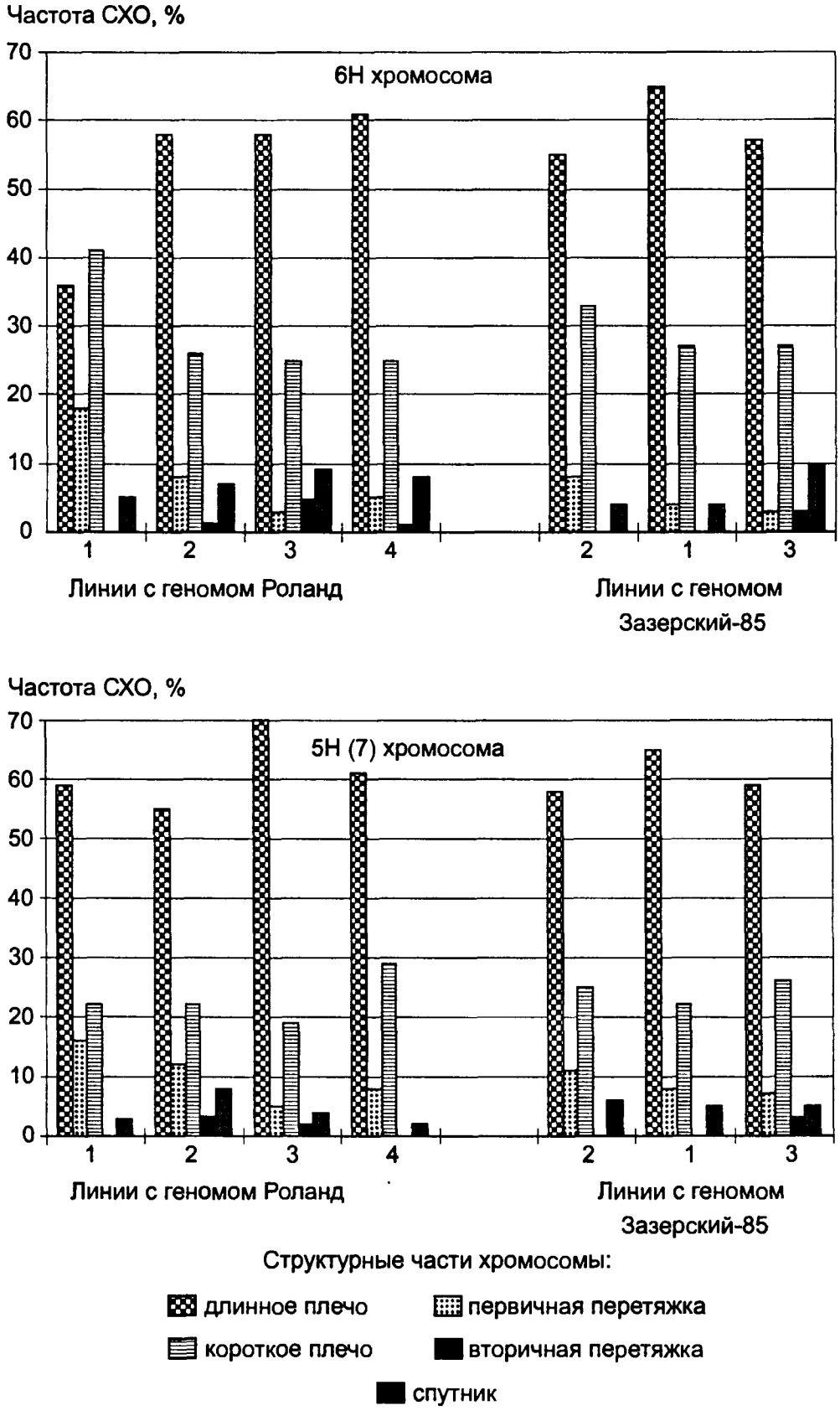


Рис. 12.3. Распределение СХО по структурным участкам хромосом: 6-й спутничной и 5H (7-й по старой классификации) у изоплазматических линий ячменя [по Sychjova et al., 1998]. Замещенные линии с органельными геномами сортов: 1— Роланд; 2 — Зазерский-85; 3 — Ида; 4 — Жодинский-5

кого генома на экспрессию ядерных генов у разных линий, а также другие особенности функционирования различных ядерных геномов в "идентичных" цитоплазмах.

В целом результаты, полученные при исследовании аллоплазматических линий — ядерно-цитоплазматических химер, созданных методами классической генетики, позволили зафиксировать ряд эпигенетических закономерностей, связанных с экспрессией, рекомбинацией и трансмиссией ядерных генов в чужеродной цитоплазме. У аллоплазматических форм разных генотипов выявлены качественные и количественные признаки, наиболее подверженные модификации при замене органельных геномов [Goloenko et al., 2001; Jones et al., 1998] — очевидно, факторы, регулирующие экспрессию их генов, наиболее тесно связаны именно с теми белками органелл, которые кодирует их собственный геном.

Сложные проблемы, связанные со стерильностью ряда аллоплазматических форм и ее ролью в восстановлении отдельных хромосом ядра и определенных ядерных генов, анализируются в опубликованных ранее исследованиях [Ohtsuka, Kihara, 1976; Suzuki et al., 1994; Anderson, Maan, 1995; Tsunewaki et al., 1996; Asakura et al., 1997], обсуждение которых выходит за рамки данной книги.

Ядерно-цитоплазматический гетерозис — реальность или иллюзия?

Одно из основных направлений работы с аллоплазматическими линиями — попытка достичь ядерно-цитоплазматического гетерозиса, т.е. искусственно создать такую комбинацию геномов ядра и органелл, которая окажется более продуктивной, чем оба эуплазматических родителя. Данный поиск проводился по двум основным стратегиям: либо подбирались цитоплазмы видов, наиболее эволюционно удаленных от *Triticum aestivum* (чтобы как можно больше расширить спектр эффектов) [Yonesawa et al., 1986], либо цитоплазмы видов, ближайших к *T. aestivum,* чтобы уменьшить нежелательные эффекты. Полученные результаты неоднозначны: при использовании цитоплазм близких видов одним удалось получить некоторый гетерозис [Kihara, 1973; Panayotov, Gotsov, 1973], попытки других были безуспешны [Edwards, 1983; Yonesawa et al., 1986].

В главах, посвященных геномам пластид и митохондрий и механизмам их взаимодействия с ядром, мы обсуждали процессы регуляции экспрессии органельных генов, которые осуществляются на каждом из уровней: транскрипции, процессинга транскриптов, трансляции, а также на посттрансляционном этапе. Все эти реакции протекают при непосредственном участии большого числа уникальных факторов, кодируемых ядерным геномом. За-

мена органельных геномов может отразиться как на реакциях фотосинтеза, так и на процессах клеточного дыхания, находящихся также под контролем всех трех клеточных геномов. Так, у аллоплазматической пшеницы с цитоплазмой *T. boeoticum* активность *in vitro* ключевого фермента фотосинтеза — рибулозодифосфаткарбоксилазы составляла лишь 71% от активности его у эуплазматической мягкой пшеницы [Evans, 1986].

Исследуя плазматипы различных видов пшениц и эгилопсов, K.Tsunewaki выделил две цитоплазматические формы (обозначенные им D и S), которые наиболее близки к цитоплазме *T. aestivum*; при комбинировании их с ядром мягкой пшеницы показатели урожайности практически не отличались от эуплазматической *T. aestivum* [Bush, Maan, 1978; Tsunewaki et al., 1983; Tsunewaki, 1988]. Опубликованы обнадеживающие результаты по показателям продуктивности аллоплазматических форм мягкой пшеницы Selkirk с цитоплазмами *Aegilopsis cylindrica* и *A. ventricosa* — обе относятся к D-цитоплазмам. При создании двух сортов пшеницы французской селекции Rendezvous и Roazon был использован цитоплазматический геном *A. ventricosa* [Jones et al., 1998].

Геном какой органеллы важнее?

Разумеется, при тотальной замене цитоплазматических геномов вычленить эффекты пластид и митохондрий, а тем более эффекты отдельных компонентов их геномов чрезвычайно трудно. Анализ замещенных линий мягкой пшеницы с цитоплазмами двух видов *Agropyron* показал, что межвидовые структурные различия значительно больше для митохондриальной, чем для хлоропластной ДНК. В связи с этим авторы предположили, что несовместимость (депрессивный фенотип и стерильность пыльцы) цитоплазматического генома *Agropyron* с ядром мягкой пшеницы связана в основном с дивергенцией структуры митохондриальной ДНК [Suzuki et al., 1992].

Возможно, более конкретные выводы о влиянии отдельных органельных генов можно сделать при обнаружении корреляции между определенными особенностями структуры генома пластид или митохондрий и фенотипическими особенностями данной линии. Для этого необходимо иметь серии линий с одинаковым ядром и различающимися цитоплазмами, органельные геномы которых подробно охарактеризованы и места различий однозначно маркированы. Такая работа проводится в лаборатории нехромосомной наследственности: на коллекции замещенных линий ячменя с одинаковым ядром и 12 цитоплазматическими геномами предпринимается попытка связать наблюдаемые цитоплазматические эффекты по ряду признаков с конкретным участком генома определенной органеллы.

Другой возможный подход — использование систем с двуродительским

наследованием, т.е. выявление рекомбинантных по митохондриальной или хлоропластной ДНК форм, подбор форм с митохондриями от одного, а с хлоропластами от другого родителя [Davydenko, 1992; Sinyavskaja et al., 2001]. С помощью этого метода в идеале возможно создание линий, различающихся только по митохондриальным или только по хлоропластным геномам, что позволило бы отнести эффекты замещения к конкретным органеллам. Однако создание таких форм сложно и не всегда возможно; более удобная модель — соматические гибриды с последующей косегрегацией органелл.

Гибридизация путем слияния протопластов — моделирование ядерно-плазменных клеточных химер *in vitro*

Гибридизация неполовых клеток растений — второй способ получения ядерно-цитоплазматических химер — впервые была выполнена в 1972 г. [Carlson et al., 1972]. В последующее десятилетие это направление пережило настоящий бум: опубликованы десятки работ, сообщавших более чем о 70 экспериментах на различных видах *Nicotiana, Petunia, Solanum, Daucus, Brassica, Glycine, Arabidopsis* и некоторых других. Получены внутривидовые, межвидовые, межродовые, межтрибные и даже межсемейственные гибриды. Наибольшее число успешных гибридизаций выполнено у растений семейства пасленовых, несколько гибридов получено у крестоцветных, зонтичных, бобовых [см. подробнее Глеба, Сытник, 1984], а позднее — даже у злаков [Takamizo et al., 1991]. Межродовые цибриды получены, в частности, между *Nicotiana tabacum* и *Petunia hybrida*; регенерация некоторых из этих цибридов приводит к появлению жизнеспособных растений, сочетающих геномы ядра и органелл разных родов [Glimelius, Bonnett, 1986; Bonnett, Glimelius, 1990]. Сообщалось о получении межтрибного соматического гибрида, сочетающего ядро *N. tabacum,* пластиды *Salpiglossis sinuate* и митохондрии рекомбинантного типа. Попытки получить межсемейственные комбинации пластид *Solanum nigrum* и ядра *N. tabacum* не увенчались успехом [Thanh et al., 1988].

Сегрегация органелл у соматических гибридов

Гибридизация протопластов сопровождается, как правило, сортировкой (сегрегацией) органелл в потомстве полученной соматической гибридной клетки. Поскольку сегрегация может происходить достаточно быстро, нередко исследователи в ранних работах по анализу цитоплазмы соматичес-

ких гибридов обнаруживали уже гомозиготные органельные геномы [Belliard et al., 1978; Douglas et al., 1981; Glimelius, Bonnett, 1981; Комарницкий и др., 1981].

Усовершенствование методов исследования и расширение спектра соматических гибридов привело к обнаружению в некоторых случаях смеси пластид в потомстве гибридных клеток [Fluhr et al., 1983; Earle et al., 1992], хотя для растений-регенерантов или каллусных культур типично наличие лишь одного родительского типа пластид [Takamizo et al., 1991; Earle et al., 1992].

Так, у цибридов (*Brassica napus* + *B. napus*/цитопл. *Raphanus sativus*) сегрегация пластид полностью завершилась к 19-му поколению в пользу фертильных хлоропластов *B. napus* [Morgan, Maliga, 1987].

Из 334 растений, регенерировавших после слияния протопластов двух различных сортов *B. napus,* большинство (329) содержало органеллы какого-то одного из родителей (тип органельной ДНК определяли методом анализа спектров эндонуклеазной рестрикции после гидролиза семью ферментами). Таким образом, сегрегация органелл практически завершилась у них еще на стадии каллусов, хотя у одного растения-регенеранта обнаружены оба типа родительской хпДНК, а у трех других растений — смесь мтДНК исходных родительских форм. Во всех четырех случаях сегрегация органелл продолжалась в процессе роста растений и завершилась к моменту цветения и образования семян [Kemble et al., 1988].

Смешанные популяции пластид замечены также в регенерантах цибридов *Medicago* [Rose et al., 1986] и *Nicotiana* [Aviv et al., 1984; Gleba et al., 1985; Sidorov et al., 1981], у некоторых из них сегрегация завершается уже в растениях-регенерантах.

Какой из двух типов пластидной ДНК обнаруживается у соматического гибрида, нередко определяет случай. Так, у соматических гибридов картофеля между *Solanum tuberosum* и *S. commersonii* восемь гибридных растений несли пластиды *S. commersonii* и шесть — *S. tuberosum* [Bastia et al., 2000], аналогичное (примерно равное) соотношение отмечено у гибридов *S. tuberosum* с *S. brevidens* и с *S. nigrum* [Gressel et al., 1984; Pehu et al., 1989]. Однако в том случае, если пластиды *S. tuberosum* обесцвечивались в результате предварительной обработки растений гербицидом SAN 9789, ингибирующим развитие нормальных хлоропластов, то у соматических гибридов *S. tuberosum* + *S. commersonii* обнаружены почти исключительно пластиды *S. commersonii.* Такой прием может быть положен в основу метода направленной элиминации пластид определенного родителя при слиянии клеток [Bastia et al., 2000].

Ситуация с митохондриями соматических гибридов еще более разнообразна: ко времени регенерации растений сегрегация обычно заканчивается,

хотя не всегда [Izhar et al., 1983]. Так, те межродовые цибриды *Nicotiana tabacum* + *Petunia hybrida,* которые росли и развивались нормально, несли митохондриальные геномы, неотличимые от *N. tabacum.* Митохондриальные ДНК аномальных цибридов, хотя несколько и отличались от *N. tabacum* (отсутствие некоторых рестриктных полос, либо дополнительные фрагменты, либо и то, и другое), все же были значительно ближе к ним, чем к мтДНК *P. hybrida.* Все исследованные цибриды содержали при этом ядро *N. tabacum* и пластиды *P. hybrida.* Вероятно, митохондрии *P. hybrida* несовместимы с ядром *N. tabacum* [Bonnett, Glimelius, 1990]. Также не удалось обнаружить ни одного цибрида с митохондриями *Salpiglossis* в межтрибном цибриде с *N. tabacum,* в то время пластиды *Salpiglossis* достаточно успешно сочетаются с ядром *N. tabacum* [Thanh et al., 1988].

Однако, по данным других исследователей, в соматических гибридах могут косегрегировать пластиды и митохондрии от одного и того же родителя [Menczel et al., 1983; Barsby et al., 1987; Aviv, Galun, 1988].

В рассмотренном примере с гибридами *S. tuberosum* + *S.commersonii* их митохондриальные ДНК близки таковым *S. tuberosum* в других гибридных популяциях тех же видов, полученных в разное время разными авторами [Perl et al., 1991; Bastia et al., 2000]. Кроме того, обнаруживались новые фрагменты, которые напоминали все же мтДНК *S. tuberosum.* Из 13 исследованных гибридов три были идентичны одному из родителей как по пластидным, так и по митохондриальным гибридизационным пробам, 4 имели пластиды *S. tuberosum* и реорганизованные митохондрии, 4 несли пластиды *S. commersonii* и митохондрии *S. tuberosum* и 2 гибрида содержали пластиды *S. commersonii* и реорганизованные митохондрии [Bastia et al., 2000]. Ни разу не удавалось обнаружить соматический гибрид, сочетающий пластиды *S. tuberosum* и митохондрии *S. commersonii* [Bastia et al., 1998, 2000].

Изложенные выше результаты по сегрегации пластид и митохондрий у цибридов свидетельствуют о том, что для обеспечения жизнеспособности в таких искусственно создаваемых генетических химерах должны выполняться определенные условия совместимости органелл с ядром или же пластид и митохондрий между собой.

Рекомбинация органельных ДНК у соматических гибридов

В течение некоторого времени, пока не завершится сегрегация органелл, в клетках соматических гибридов присутствуют пластиды и митохондрии обоих родителей. Что происходит с их геномами в этот период?

Рекомбинация хлоропластных ДНК, как уже отмечалось, — явление крайне редкое либо редко обнаруживаемое [Earle et al., 1992].

В многократно цитируемой работе, описывающей межвидовую рекомби-

нацию пластид у соматического гибрида *N. tabacum* + *N. plumbaginifolium,* родительские формы несли три мутации пластома. Мутант *N. tabacum* SR1-A15 был стрептомициноустойчив и дефектен по признаку зеленения пластид. Однако из-за дефектности пластид признак стрептомициноустойчивости не мог проявляться. Второй родитель — мутант *N. plumbaginifolium* LR400 — был линкомициноустойчив и имел зеленые нормальные пластиды. При слиянии протопластов на селективных средах удалось отобрать соматический гибрид pt14 с новой комбинацией признаков, которую авторы объясняют межвидовой рекомбинацией хлоропластной ДНК и подтверждают это анализом рестриктных спектров. Частота такого явления, по их подсчетам, не превышает $2 \cdot 10^{-3}$ — $2 \cdot 10^{-4}$. Именно такой малой вероятностью события, по мнению авторов цитируемой работы, и следует объяснять отрицательные результаты, получаемые обычно при поиске рекомбинантов пластидных ДНК [Medgyesy et al., 1985].

Гораздо чаще рекомбинации хлоропластных ДНК наблюдаются у межвидовых гибридов одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas* [Lemieux et al., 1984, 1990]. Интересно, что частоты рекомбинации различны для разных участков молекулы хлоропластной ДНК. В последовательности IR (большого инвертированного повтора, см. главу 2) рекомбинации происходят в пять раз чаще, чем в одном из однокопийных районов; в свою очередь во втором однокопийном районе рекомбинации происходят в пять раз реже, чем в первом [Lemieux et al.,1990].

Рекомбинации митохондриальных ДНК удается выявлять значительно чаще, чем хлоропластных. Кроме родительских молекул мтДНК у соматических гибридов, как правило, обнаруживаются также новые последовательности, которые обычно являются результатом рекомбинаций между исходными типами мтДНК [Belliard et al., 1979; Galun et al., 1982; Rothenberg et al., 1985; Earle, 1995].

Новые типы молекул мтДНК зафиксированы в культурах соматических гибридов двух видов *Solanum* и межродового гибрида *Nicotiana* + *Petunia* [Kemble et al., 1986; Bonnett, Glimelius, 1990]. Мы уже упоминали выше, что мтДНК нормальных растений-регенерантов данного межродового гибрида не отличается от мтДНК *N. tabacum,* тогда как нарушение роста и развития растений коррелировало с изменениями их мтДНК (см. "Сегрегация органелл у соматических гибридов"). У таких цибридов появлялись новые фрагменты в спектрах рестрикции, часть из них имела тот же размер, что у *P. hybrida,* отмечались и совершенно новые фрагменты, не найденные ни у одного из родителей [Bonnett, Glimelius, 1990]. Кроме того, оказалось, что у некоторых независимо полученных цибридных растений происходит ряд одинаковых изменений в митохондриальном геноме: один из рестриктных

фрагментов BamH1 отсутствовал у всех цибридов с измененной мтДНК, зато имелся дополнительный фрагмент при эндонуклеазном расщеплении Xho1. В общем большинство изменений наблюдалось сразу в нескольких цибридах. Эти факты свидетельствуют о том, что взаимодействие между мтДНК *N. tabacum* и *P. hybrida* происходит не случайным образом, а в строго определенных участках генома [Bonnett, Glimelius, 1990]. Сходные результаты также были получены для соматических гибридов *Solanum* и *Daucus* [Kemble et al., 1986; Kothari et al., 1986].

Подробное изучение 11 соматических гибридов *Brassica campestris* + *B. oleracea* с помощью 46 митохондриальных ДНК-зондов показало неслучайный характер взаимодействия митохондриальных геномов. Новые фрагменты, обнаруженные в цибридах, сосредоточены в основном в районе *atp9*. Некоторые участки реорганизации митохондриальных геномов цибридов идентичны тем, которые модифицируются при длительном культивировании клеток *B. campestris,* а также были изменены в процессе эволюции *(atp9, nad3, rps12)*. Все соматические гибриды имели более крупные молекулы мтДНК, чем *B. campestris* (218,5 т.п.н.), а некоторые даже превышали *ogura* (256,5 т.п.н.) [Earle et al., 1992].

В отличие от этого анализ 334 цибридов, полученных при внутривидовой соматической гибридизации *B. napus,* не выявил ни одного случая рекомбинации митохондриальных геномов. Авторы полагают, что такой результат может быть связан с системой культивирования [Kemble et al., 1988]; возможно, что причина отсутствия гибридных мтДНК кроется в индивидуальных особенностях геномов митохондрий данных родительских форм.

Таким образом, путем неполовой гибридизации клеток удалось получить: а) новые ядерно-плазменные комбинации — так называемые цибриды; б) новые внутриклеточные комбинации хлоропластов и митохондрий; в) новые типы молекул митохондриальных ДНК и крайне редко — хлоропластных ДНК. Цибриды некоторых культур (к примеру, *Solanum, Brassica*) уже используются в селекции при создании новых сортов [Millam et al., 1995; Earle et al., 1992], возможно, этот список будет продолжен.

Соматическая гибридизация и замещение клеточных органелл у животных

История гибридизации соматических клеток животных еще более длительная, чем у растений: первые спонтанно слившиеся клетки обнаружены Barski и сотрудниками еще в 1960 г., а в середине 60-х годов получены первые искусственные межвидовые гибриды. Подробно хронология основных событий в истории гибридизации соматических клеток изложена в прекрас-

ной монографии "Гибридные клетки" [Рингерц, Сэвидж, 1979]. Уже в ранних исследованиях была показана сегрегация митохондриальной ДНК мыши в клеточных гибридах мыши и человека [Clayton et al., 1971; Attardi et al., 1972]. В последующих работах найдена корреляция между утратой хромосом одного из родителей гибрида и соответствующей сегрегацией его митохондриальной ДНК. При этом утрата мтДНК опережала сегрегацию хромосом одного из родителей [Coon et al., 1973]. Была также обнаружена рекомбинация митохондриальных ДНК, которая в клеточных гибридах мыши и человека происходит с высокой частотой [Horak et al., 1974].

Замещение клеточных органелл у животных в отдельных случаях происходило путем насыщающих скрещиваний. При многократном спаривании американских коров *Bos taurus* (европейского происхождения) с привезенными из Индии быками *B. indicus* ядерный геном постепенно замещался на *B. indicus,* тогда как митохондрии (которые передаются по материнской линии, см. главу 1) остались от *B. taurus* [Meirelles et al., 1999]. Однако такой путь чрезвычайно долог и неудобен, поэтому при экспериментальных попытках замены цитоплазмы у животных прибегают к прямой реконструкции путем переноса ядра в ооцит. У широко известной овцы Долли, впервые клонированной из соматической клетки, перенесенной в ооцит другой овцы [Wilmut et al., 1997], митохондриальная ДНК отличалась от таковой донора ядра и полностью соответствовала мтДНК ооцита хозяина [Evans et al., 1999]. Жизнеспособными оказались и так называемые "ксеномитохондриальные" цибриды, совмещающие ядерный геном человека и митохондрии гориллы либо шимпанзе [Kenyon, Moraes, 1997; Barrientos et al., 1998]. Попытки совместить в одной клетке ядро и митохондрии более эволюционно отдаленных видов не увенчались успехом [Meirelles et al., 2001].

Неудачно закончились также опыты по обмену ядрами между зиготами двух линий мышей [Solter et al., 1985]. Ограниченного успеха добились исследователи, пытавшиеся сливать энуклеированные (лишенные ядра) ооциты с фибробластными клетками у овец, свиней, обезьян и крыс с целью конструирования межвидовых гибридных зигот. Удалось добиться первых делений таких зигот и формирования бластоциста, однако при пересадке их в организм приемной матери беременность не наступала [Dominko et al., 1999].

Успешным оказался опыт по реконструкции так называемого "зебулона" — теленка, полученного путем пересадки в энуклеированные ооциты *B. taurus* единичных клеток бластомеров эмбриона *B. indicus.* Жизнеспособные гибридные клетки сочетали ядерный геном *B. indicus* и митохондрии обеих родительских форм. При дальнейших циклах деления данной цибридной клетки количество копий митохондриальной ДНК *B. indicus* быстро

уменьшалось, и животное-регенерант, полученное при имплантации в корову зародыша на стадии бластоциста, содержало митохондриальные ДНК исключительно от *B. taurus* (разрешающая способность измерений составляла 0,05% мтДНК) [Meirelles et al., 2001].

Митохондриальные ДНК *B. indicus* и *B. taurus* различаются примерно на 5% в контрольной области (D-петля, см. главу 6) и на 8% в наиболее гипервариабельной области [Loftus et al., 1994]. Однако участки генома, контролирующие связывание ядерно кодируемых факторов с мтДНК, высоко консервативны. Поэтому взаимодействие между ядерно кодируемыми транс-факторами *B. indicus* и митохондриальной системой репликации *B. taurus* происходит без каких-либо осложнений [Meirelles et al., 2001].

Причина сегрегации митохондрий *B. indicus* неясна; предполагают, что это результат различий в скорости репликации органелл. В эксперименте тех же авторов на гибридной линии мышей наблюдалась стабильная гетероплазмия по мтДНК до 15-го поколения гибридных клеток [Meirelles et al., 2001]. Более того, было показано, что на ранних этапах развития быстрее реплицируются митохондриальные ДНК донора ядра (бластоциста); по-видимому, близость митохондрий к ядру в реконструированной зиготе на ранних этапах развития может давать некоторое преимущество при делении [Meirelles, Smith, 1998]. В другой системе (соматические гибриды двух линий мышей RR и C57) гетероплазмия сдвигалась в пользу митохондриальной ДНК RR независимо от генотипа ядра, что, вероятно, связано с особенностями митохондриального генома RR [Takeda et al., 2000]. Для создания гетероплазматических мышей недавно использован метод микроинъекции митохондрий из соматических клеток в реконструированные ооциты [Irwin et al., 1999]. Возможно, системы клеточных генотипов животных, несущих митохондриальные геномы от нескольких видов, будут иметь определенные преимущества по сравнению с гомоплазменными особями, что позволит улучшить продуктивность и адаптивные потенции домашних животных [Meirelles et al., 2001].

* * *

Попытки совмещения в одном организме генетически компетентных органелл, происходящих из различных источников, увенчались успехом как у растений, так и у животных. Образующиеся ядерно-цитоплазматические гибриды явились полезным инструментом в познании ряда механизмов ядерно-цитоплазматического взаимодействия. И хотя ярких примеров практического использования таких гибридов сравнительно немного, роль данного направления в развитии представлений о взаимозависимости экспрессии клеточных геномов трудно переоценить.

Литература

Аксенова Е.А., Давыденко О.Г. Эффект внутривидовых цитоплазматических и ядерных замещений на частоту хиазм у ячменя //Докл. АН Беларуси. 1995. Т. 39, № 6. С. 72—74.

Батуро Ф.Н., Давыденко О.Г., Кадыров М.А., Аношенко Б.Ю. Замещение цитоплазм у сортов ячменя и их селекционный эффект // Генетика и цитология. 1989. Т. 33, № 7. С. 657—659.

Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Ядерно-цитоплазматические взаимодействия в устойчивости пшеницы к грибным патогенам. II. Влияние цитоплазм культурных и диких злаков на экспрессию генома сорта Ленинградка при взаимодействии с возбудителем мучнистой росы пшеницы //Генетика. 1991. Т. 27, № 12. С. 2103—2108.

Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Ядерно-цитоплазматические взаимодействия в устойчивости пшеницы к грибным патогенам. IV. Количественная устойчивость проростков аллоплазматических линий сорта Chinese Spring к мучнистой росе //Генетика. 1992. Т.28, № 8. С. 104—108.

Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Влияние чужеродного плазмона растения-хозяина на устойчивость мягкой пшеницы к возбудителю твердой головни // Цитология и генетика. 1999. Т. 33, № 4. С. 43—48.

Волуевич Е.А., Булойчик А.А., Палилова А.Н. Эффекты чужеродных и внутривидовых цитоплазм на проявление главных ядерных генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине //Генетика. 1995. Т. 31, № 4. С. 492—498.

Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев: Наукова думка. 1984. 150 с.

Голоенко И.М. Эффект цитоплазм на экспрессию количественных признаков, трансмиссию и рекомбинацию ядерных маркерных генов у алло- и изоплазматических линий ячменя *(Hordeum vulgare, Hordeum spontaneum):* Автореф. дис... канд. биол. наук. Минск, 2003.

Голоенко И.М., Давыденко О.Г., Шимкевич А.М. Нарушение расщеплений маркерных ядерных генов у алло- и изоплазматических линий ячменя // Генетика. 2002. Т. 38, № 7. С. 791—797.

Давыденко О.Г. Нехромосомные мутации. Минск: Наука и техника, 1984а. 165 с.

Давыденко О.Г. Отклонения в расщеплении по признаку мужская стерильность, вызванные влиянием цитоплазм // Цитология и генетика. 1984б. Т. 18. С. 218—222.

Давыденко О.Г. Роль цитоплазматической изменчивости в эволюции и селекции растений // Цитология и генетика. 1989. Т. 24. С. 66—76.

Давыденко О.Г., Комарницкий И.К., Самойлов А.М., Глеба Ю.Ю. Внутривидовая изменчивость митохондриального генома у *Triticum aestivum* // Докл. АН УССР. Сер. биол. 1988. № 4. С. 58—61.

Давыденко О.Г., Червякова Т.О. Внутривидовая цитоплазматическая изменчивость у пшеницы мягкой // Докл. АН БССР. 1988. Т. 32, № 11. С. 1032—1036.

Комарницкий И.К., Кучко А.А., Шлумуков Л.Р., Бутенко Р.Г. Анализ ДНК хлоропластов межвидового соматического гибрида картофеля // Докл. АН СССР. 1981. Т. 256, № 2. С. 495—496.

Лугинин Н.В., Давыденко О.Г. Векшин С.Р. Эффект цитоплазмы на частоту сестринских хроматидных обменов у пшеницы // Цитология и генетика. 1987. Т. 21. С. 330—333.

Одинцова И.Г., Гуриели О.А., Скурыгин Н.А. Влияние цитоплазмы на устойчивость пшеницы к бурой ржавчине // Сб. науч. тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции /ВНИИ растениеводства. 1985. Вып. 92. С. 11—15.

Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. Минск, 2001. 170 с.

Орлов П.А., Палилова А.Н. Модифицирующее влияние чужеродных цитоплазм на индукцию и рост каллуса аллоплазматических линий пшеницы // Генетика. 1989. Т. 25, № 12. С. 168—175.

Палилова А.Н., Волуевич Е.А., Левданская В.В. Влияние цитоплазмы на поражаемость бурой ржавчиной растений пшеницы на разных этапах онтогенеза// Генетика. 1989. Т.25, № 7. С. 1239—1247.

Петров П.Д., Шиндрова П., Пенчев Е. Влияние на цитоплазма *Helianthus petiolaris* върху устойцивоста към сина китка // Растениевъед. науки. 1985. Т.22. С. 38—41.

Рингерц Н., Сэвидж Р. Гибридные клетки. М.: Мир. 1979. 415 с.

Сілкова Т.А., Палілава А.Н. Уплыў чужародных цытаплазм на экспрэсію ядзернага генома мяккай пшаніцы сорту Penjamo-62 // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1986. № 5. С. 26—30.

Силкова Т.А., Палилова А.Н. Формирование продуктивности у новой серии аллоплазматических линий пшеницы под влиянием чужеродных цитоплазм // Сельскохоз. биология. 1987. № 12. С. 3—5.

Anderson J.A., Maan S.S. Interspecific nuclear-cytoplasmic compatibility controlled by genes on group1 chromosomes in *durum* wheat //Genome. 1995. Vol. 38. P. 803—808.

Asakura N., Nakamura C., Ohtsuka I. A nuclear compatibility gene, *Ncc-tmp,* of *Triticum timopheevi* for the cytoplasm of *Aegilops squarrosa* //Genes Gen. Syst. 1997. Vol.72. P.71—78.

Attardi B., Attardi G. Fate of mitochondrial DNA in human-mouse somatic cell hybrids // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1972. Vol. 69. P. 129—133.

Aviv D., Arzee-Gonen P., Bleichman S., Galun E. Novel alloplasmic *Nicotiana* plants by "donor-recipient" protoplast fusion: cybrids having *N. tabacum* or *N. sylvestris* nuclear genomes and either or both plastomes and chondriomes from alien species // Mol. Gen. Gen. 1984. Vol. 196. P. 244—253.

Aviv D., Galun E. Transfer of cytoplasmic organelles from an oligomycin-resistant *Nicotiana* cell suspension into tobacco protoplasts yielding oligomycin-resistant cybrid plants // Mol. Gen. Gen. 1988. Vol. 215. P.128—133.

Banga S.S., Labana K.S., Medhi B.N. Alternaria incidence in some alloplasmic lines of Indian mustard // Theor. Appl. Gen. 1984. Vol. 67. P.195—196.

Barrientos A., Kenyon L., Moraes C.T. Human xenomitochondrial cybrids. Cellular models of mitochondrial complex I deficiency // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 14210—14217.

Barsby T.L., Yarrow S.A., Kemble R.J., Grant I. The transfer of cytoplasmic male sterility to winter-type oilseed rape (*Brassica napus* L.) by protoplast fusion // Plant Sci. 1987. Vol. 53. P. 243—248.

Bastia T., Scotti N., Monti L. et al. Genetic and molecular analysis of male fertility and cytoplasmic DNA variation in interspecific *Solanum* spp. somatic hybrids // Plant Biotechnology and *in vitro* Biology in the 21st Century. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. P. 105—108.

Bastia T., Carotenuto N., Basile B. et al. Induction of novel organelle DNA variation and transfer of resistance to frost and Verticillium wilt in *Solanum tuberosum* through somatic hybridization with 1EBN *S. commersonii*// Euphytica. 2000. Vol. 116. P. 1—10.

Belliard G., Pelletier G., Vedel F., Quetier F. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum* // Mol. Gen. Gen. 1978. Vol. 165. P. 231—237.

Belliard G., Vedel F., Pelletier G. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion //Nature. 1979. Vol. 281. P. 401—403.

Bonnett H.T., Glimelius K. Cybrids of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* have an intergeneric mixture of chloroplasts from *P. hybrida* and mitochondria identical or similar to *N. tabacum* // Theor. Appl. Gen. 1990. Vol. 79. P. 550—555.

Bush R.H., Maan S.S. Effects of alien cytoplasms on agronomic and breadmaking traits of two spring wheat cultivars // Crop Sci. 1978. Vol. 18. P. 864—866.

Carlson P.S., Smith H.H., Dearing R.D. Parasexual interspecific plant hybridization // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1972. Vol. 69. P. 2292—2294.

Clayton D.A., Teplitz R.L., Nabholz M. et al. Mitochondrial DNA in human-mouse cell hybrids // Nature. 1971. Vol. 234. P. 560—562.

Coon H.G., Horak I., Dawid I.B. Propagation of both parental mitochondrial DNAs in rat-human and mouse-human hybrid cells // J. Mol. Biol. 1973. Vol. 81. P. 285—298.

Davydenko O.G. Cytoplasmic effect on expression of some morphological traits, transmission and mitotic recombination in allo- and isoplasmic lines // Nuclear and organellar genomes of wheat species. Prof. Kihara Memorial Symposium on Cytoplasmic Engineering in wheat. Yokohama: Kihara Memorial Foundation, 1991. P. 214—222.

Davydenko O., Terekhov A.Yu., Fomchenko N.S. Structural alteration of chloroplast and mitochondrial DNA in progenies of alloplasmic wheat with rye cytoplasm // Wheat Inf. Service. 1992. No 75. P. 7—13.

Dominko T., Mitalipova M., Haley B. et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species // Biol. Reprod. 1999. Vol. 60. P.1496—1502.

Douglas G.C., Keller W.A., Setterfield G. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *Nicotiana tabacum.* III. Biochemical, morphological and cytological analysis of somatic hybrids // Can. J. Bot. 1981. Vol. 59. P. 228—237.

Earle E.D. Mitochondrial DNA in somatic hybrids and cybrids // The Molecular Biology of Plant Mitochondria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1995. P. 557—584.

Earle E.D.,Temple M., Walters T.W. Organelle assortment and mitochondrial DNA rearrangements in *Brassica* somatic hybrids and cybrids // Physiol. Plantarum. 1992. Vol. 85. P. 325—333.

Edwards I.B. An assessment of the role of cytoplasmic-genetic systems in hybrid wheat production //Plant Mol. Biol. Reporter. 1983. Vol. 1. P. 139—143.

Evans J.R. The relationship between carbon dioxide limited photosynthetic rate and Rubisco content in two nuclear-cytoplasmic substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose biphosphate-carboxylation and electron transport capacities // Planta. 1986. Vol. 167. P. 351—358.

Evans M.J., Gurer C., Loike J.D., Wilmut I. et al. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep // Nat. Genet. 1999. Vol. 23. P. 90—93.

Fluhr R., Aviv D., Edelman M., Galun E. Cybrids containing mixed and sorted-out chloroplasts following interspecific somatic fusions in *Nicotiana* // Theor. Appl. Gen. 1983. Vol. 65. P. 289—294.

Fukasawa H. Nucleus substitution and restoration by means of successive backcrosses in wheat and its related genus *Aegilops* // Jpn. J. Bot. 1959. Vol. 17. P. 55—91.

Galun E., Arzee-Gonen P., Fluhr R. et al. Cytoplasmic hybridization in *Nicotiana:* Mitochondrial DNA analysis in progenies resulting from fusion between protoplasts having different organelle constitutions // Mol. Gen. Gen. 1982. Vol. 186. P. 150—156.

Gleba Y., Komarnitsky I.K., Kolesnik N.N. et al. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana.* 2. Plastome heterozygotes // Mol. Gen. Gen. 1985. Vol. 198. P. 476—481.

Glimelius K., Bonnett H.T. Somatic hybridization in *Nicotiana:* restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids // Planta. 1981. Vol. 153. P. 497—503.

Glimelius K., Bonnett H.T. Nicotiana cybrids with *Petunia* chloroplasts // Theor. Appl. Gen. 1986. Vol. 72, No. 6. P. 794—798.

Goloenko I.M., Lukhanina N.V., Shimkevich A.M. et al. The productivity characteristics of substituted barley lines with marked chloroplast and mitochondrial genomes // Cell. Mol. Biol. Letters. 2002. Vol. 7. P. 483—491.

Goloenko I., Teljatnikova A., Lukhanina N., Davydenko O. Some nuclei-cytoplasmic combinations of barley substituted lines collection change the productivity characteristics // Proc. Int. Conf. "Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines" July 30—Aug. 3, 2001. Novosibirsk: Inst. Genet. Cytol., 2001. P. 70—74.

Gressel J., Cohen N., Binding H. Somatic hybridization of an atrazine-resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*. 2. Segregation of plastomes // Theor. Appl. Gen. 1984. Vol. 67. P. 131—134.

Horak I., Coon H.G., Dawid I.B. Interspecific recombination of mitochondrial DNA molecules in hybrid somatic cells // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1974. Vol. 71. P. 1828—1832.

Irwin M.H., Johnson L.W., Pinkert C.A. Isolation and microinjection of somatic cell-derived mitochondria and germ-line heteroplasmy in transmitochondrial mice // Transgenic Res. 1999. Vol. 8. P. 119—124.

Iwanaga M., Mukai Y., Ponajotov I., Tsunewaki K. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. 7. Cytoplasmic effects on respiratory and photosynthetic rates // Jap. J. Genet. 1978. Vol. 53. P. 387—396.

Izhar S., Schlicter M., Swartzberg D. Sorting out of cytoplasmic elements in somatic hybrids of *Petunia* and the prevalence of the heteroplasmon through several meiotic cycles // Mol. Gen. Gen. 1983. Vol. 190. P. 468—474.

Jones P., Keane E.M., Osborne B. Effects of alien cytoplasmic variation on carbon assimilation and productivity in wheat // J. Exp. Bot. 1998. Vol. 49. P. 1519—1528.

Keane E.M., Jones P. Effects of alien cytoplasm substitution on the response of wheat cultivars to *Septoria nodorum* // Ann. Appl. Biol. 1990. Vol. 117. P. 299—312.

Kemble R.J., Barsby T.L., Wong R.S., Shepard J.F. Mitochondrial DNA rearrangements in somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens* // Theor. Appl. Gen. 1986. Vol. 72. P. 787—793.

Kemble R.J., Yarrow S.A., Wu S.-C., Barsby T.L. Absence of mitochondrial and chloroplast DNA recombinations in *Brassica napus* plants regenerated from protoplasts, protoplast fusions and anther culture // Theor. Appl. Gen. 1988. Vol. 75. P. 875—881.

Kenyon L., Moraes C.T. Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial hybrids // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 9131—9135.

Kihara H. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations // Cytologia. 1951. Vol. 16. P. 177—193.

Kinoshita T., Ohtsuka I., Kihara H. Alteration of growth habit and variation of heading time induced by the alien cytoplasm // Wheat Inf. Serv. 1979. Vol. 50. P. 65—70.

Kothari S.L., Monte D.C., Widholm J.M. Selection of *Daucus carota* somatic hybrids using drug resistance markers and characterization of their mitochondrial genomes // Theor. Appl. Gen. 1986. Vol. 72. P. 494—502.

Lemieux C., Turmel M., Seligy V.L., Lee R.W. Chloroplast DNA recombination in interspecific hybrids of *Chlamydomonas*: linkage between a nonmendelian locus for streptomycin resistance and restriction fragments coding for 16S rRNA // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1984. Vol. 81. P. 1164—1168.

Lemieux B., Turmel M., Lemieux C. Recombination of *Chlamydomonas* chloroplast DNA occurs more frequently in the large inverted repeat sequence than in the single-copy regions // Theor. Appl. Gen. 1990. Vol. 792. P. 17—27.

Loftus R.T., MacHugh D.E., Bradley D.G. et al. Evidence for two independent domestication of cattle // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 2757—2761.

Maan S.S. Cytoplasmic variability in *Triticinae* // Proc. IV Int. Wheat Genet. Symp. Univ. Mo., Columbia, USA, 1973. P. 367—373.

Maan S.S. Specificity of nucleo-cytoplasmic interactions in *Triticum* and *Aegilops* species // Wheat Inform. Service. 1979. Vol. 50. P. 71—79.

Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1985. Vol. 82. P. 6960—6964.

Meirelles F.V., Bordignon V., Watanabe Y. et al. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte // Genetics. 2001. Vol. 158. P. 351—356.

Meirelles F.V., Rosa A.J., Lôbo R.B. et al. Is the American Zebu really a *Bos taurus indicus*? //Genet. Mol. Biol. 1999. Vol. 22. P. 543—546.

Meirelles F.V., Smith L.C. Mitochondrial genotype segregation during preimplantation development in mouse heteroplasmic embryos // Genetics. 1998. Vol. 148. P. 877—883.

Menczel L., Nagy F., Lazar G., Maliga P. Transfer of cytoplasmic male sterility by selection of streptomycin resistance after protoplast fusion in *Nicotiana* // Mol. Gen. Gen. 1983. Vol. 189. P. 365—369.

Millam S., Paine L.A., Mackay G.R. The integration of protoplast fusion-derived material into a potato breeding programme — a review of progress and problems // Euphytica. 1995. Vol. 85. P. 451—455.

Morgan A., Maliga P. Rapid chloroplast segregation and recombination of mitochondrial DNA in *Brassica* cybrids // Mol. Gen. Gen. 1987. Vol. 209. P. 240—246.

Nakamura C., Kasai K., Kubota Y., et al. Cytoplasmic diversity in alloplasmic common wheats with cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops* revealed by photosynthetic and respiratory characteristics // Jpn. J. Genet. 1991. Vol. 66. P. 471—483.

Nakata N., Yasumuro Y., Himeno Y., Sasaki M. Effect of *T. timopheevi* and *Ae. umbellulata* cytoplasms on homoelogous chromosome pairing in wheat × rye hybrids // J. Fac. Agron. Tottori Univ. 1985. Vol. 21. P. 1—9.

Ohtsuka I., Kihara H. The effect of 1D chromosome in *Aegilops squarrosa* cytoplasm, that manifest in gametes and zygotes// Jpn. J. Genet. 1976. Vol. 51. P. 433—434.

Panayotov I., Gotsov K. Results of nucleus substitution in *Aegilops* and *Triticum* species by means of successive backcrosses with common wheat // Wheat Inf. Serv. 1975. Vol. 40. P.20—22.

Panayotov I. New cytoplasmic male sterility sources in common wheat: their genetical and breeding considerations // Theor. Appl. Gen. 1980. Vol. 56. P. 153—160.

Pehu E., Karp A., Moore K. et al. Molecular, cytogenetic and morphological characterization of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens* // Theor. Appl. Gen. 1989. Vol. 78. P. 696—704.

Perl A., Aviv D., Galun E. Nuclear-organelle interaction in *Solanum:* interspecific cybridizations and their correlation with a plastome dendrogram // Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 228. P. 193—200.

Rothenberg M., Boeshore M.L., Hanson M.R., Izhar S. Intergenomic recombination of mitochondrial genomes in a somatic hybrid plant //Curr. Genet. 1985. Vol. 9. P. 615—618.

Sidorov V.A., Menczel L., Nagy F., Maliga P. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on the metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts // Planta. 1981. Vol. 152. P. 341—345.

Sidorov V.A., Yevtushenko D.P., Shakhovsky A.M., Gleba Y.Y. Cybrid production based on mutagenic inactivation of protoplasts and rescuing of mutant plastids in fusion products: potato with a plastome from *S. bulbocastanum* and *S. pinnatisectum* // Theor. Appl. Gen. 1994. Vol. 88. P. 525—529.

Sinyavskaja M., Aksyonova E., Dubovets N. Alloplasmic wheat with rye cytoplasm: peculiarities of organelle genomes integration and inheritance // Proc. Int. Conf. "Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines", July 30—Aug. 3, 2001. Novosibirsk: Inst. Genet. Cytol., 2001. P. 104—107.

Suzuki T., Mori N., Nakamura C. et al. Chloroplast and mitochondrial DNAs of alloplasmic common wheat with cytoplasms of *Agropyron glaucum, Ag. trichophorum* and *Haynaldia villosa* // Jpn. J. Genet. 1992. Vol. 67. P. 405—414.

Suzuki T., Nakamura C., Mori N. et al. Homeologous group 1 chromosomes of *Agropyron* restore nucleus-cytoplasm compatibility in alloplasmic common wheat with *Agropyron* cytoplasms // Jpn. J. Genet. 1994. Vol. 69. P. 41—51.

Sychjova I.M., Aksjonova H.A., Davydenko O.G. The effect of intraspecific cytoplasmic substitution on the frequency of chiasmata and sister chromatid exchanges and on marker gene segregation // Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement. Wien: WUV-Universitatsverlag, 1998. P. 168—174.

Sychjova I.M., Triboush S.O., Danilenko N.G., Davydenko O.G. The collection of allo- and isoplasmic barley lines with PDRF-studied mitochondrial DNA // Barley Genetic Newsletters. 1998. Vol. 28. P. 9—11.

Takamizo T., Spangenberg G., Suginobu K., Potrykus I. Intergeneric somatic hybridization in Graminae: somatic hybrid plants between tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) // Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 231. P. 1—6.

Takeda K., Takahashi S., Onishi A. et al. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer // J. Reprod. Fertil. 2000. Vol. 116. P. 253—259.

Thanh D.A., Pay A., Smith M.A. et al. Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *N. tabacum* и *Salpiglossis sinuata* // Mol. Gen. Gen. 1988. Vol. 213. P. 186—190.

Tsuji S., Maan S.S. Differential fertility and transmission of male and female gametes in alloplasmic wheat hybrids //Can. J. Genet. Cytol. 1981. Vol. 23. P. 337—348.

Tsunewaki K., Mukai Y., Endo T.R. et al. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. V. Classification of 23 cytoplasms into eight plasma types // Jpn. J. Genet. 1976. Vol. 51. P. 175—191.

Tsunewaki K. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. Tokyo: Japan. Soc. Prom. Sci, 1980. 190 p.

Tsunewaki K. Cytoplasmic variation in *Triticum* and *Aegilops* // Proc. of the VII th Int. Wheat Genet. Symp. Cambridge: UK, 1988. P. 53—62.

Tsunewaki K., Maekawa M., Tsujimoto H. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. XX. The hexaploid triticale as an effective tester for plasma type distinction // Jpn. J. Genet. 1984. Vol. 59. P. 215—224.

Tsunewaki K., Noda H., Fujisawa T. Haploid and twin formation in wheat strain Salmon with alien cytoplasms // Cytologia. 1968. Vol. 33. P. 526—538.

Tsunewaki K., Wang G.S., Matsuoka Y. Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and Aegilops. I. Production of alloplasmic common wheats and their fertilities // Genes Genet. Syst. 1996. Vol. 71, No. 5. P. 293—311.

Tsunewaki K., Yoshida T., Tsuji S. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. IX. The effect of alien cytoplasm on seed germination of common wheat // Jpn. J. Genet. 1983. Vol. 58. P. 33—41.

Washington W.J., Maan S.S. Disease reaction of wheat with alien cytoplasm // Crop Sci. 1974. Vol. 14. P. 203—204.

Wilmut I., Schnleke A. E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nature. 1997. Vol. 385. P. 810—813.

Wilson J.A., Ross W.M. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevi* cytoplasm // Wheat Inf. Serv. 1962. Vol. 14. P. 29—30.

Yonesawa K., Tatsemat N., Spetsov P., Tsunewaki K. Increasing genetic variability in common wheat by utilizing alien cytoplasms: effects of four *Aegilops* cytoplasms on the genetic variability of the F_3 generation of the cross Norin 26 · Norin 61 // Jpn. J. Breed. 1986. Vol. 36. P. 262—273.

Глава 13

Направленная трансформация — моделирование органельных геномов. Инвертированная генетика (“генетика наоборот”)

ИЗМЕНЕНИЕ генома органелл методом трансформации — тема данной главы. Немногие научные направления могут сравниться с трансгенозом по количеству ожесточенных споров, вышедших за стены генетических лабораторий и далеко за пределы научных сообществ [Daniell, 1999]. Термин "трансгенный" знают даже домохозяйки, твердо усвоив, что это сродни чему-то весьма опасному, хотя и непонятному. Никоим образом не вовлекая читателя в малопродуктивную дискуссию, поддерживаемую дилетантами, авторы преследуют здесь две основные цели: обсудить третий способ изменения ядерно-плазменных комбинаций — направленную трансформацию органелл (в основном хлоропластов), а также возникшее на ее основе новейшее направление генетики — так называемую обратную, или инвертированную, генетику ("reverse genetics").

Генетическая трансформация органелл

Метод искусственной генетической трансформации ядра известен уже почти четыре десятилетия, на его счету ряд значительных достижений, в том числе и практических. Генетическую трансформацию пластид осуществили гораздо позднее.

Первоначально хлоропластный ген большой субъединицы рибулозодифосфаткарбоксилазы табака и хламидомонады удалось перенести в бактериальные клетки *E. coli* и *B. subtilis* и добиться его экспрессии [Zhu et al., 1984].

Вскоре после этого была осуществлена генетическая трансформация органелл. Разработка метода "биолистической" трансформации, включающего **био**логические и бал**лист**ические приемы [Klein et al., 1987], практически одновременно привела к успешной трансформации обоих типов органелл: митохондрий дрожжей [Johnston et al., 1988] и хлоропластов *Chlamydomonas* [Boynton et al., 1988]. Устройство "генной пушки" схематически изображено на рис.13.1: пластиковый "разрывающий" диск закрывает трубу-ускоритель с гелием. Частицы золота или вольфрама диаметром от 0,4 до 1,7 мк, покрытые ДНК трансформирующих плазмид, находятся на поверхности второго пластикового диска ("летящий диск"). Металлическая сетка ("останавливающий экран") определяет расстояние, на которое переместится "летящий диск" (рис.13.1, *а*). Как только давление гелия достигает определенного уровня, "разрывающий диск" разламывается, и под давлением

газа "летящий диск" вместе с частицами, покрытыми ДНК, ускоряется, пока не ударяется в сетку. Диск останавливается, частицы летят дальше сквозь сетку и проникают в клетки и клеточные органеллы (рис.13.1, *б*).

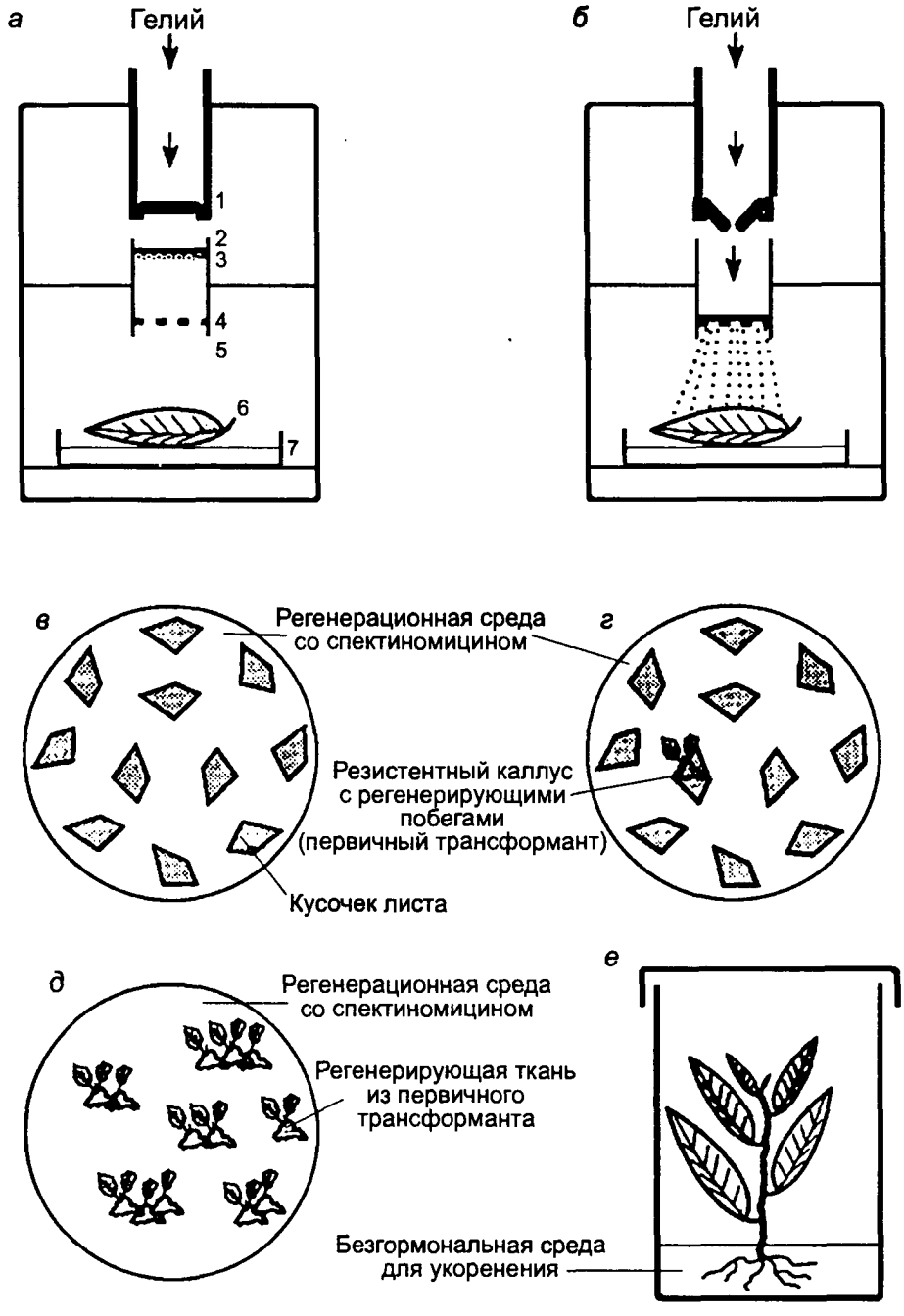


Рис. 13.1. Получение растений табака с трансгенными пластидами. *а* — схема устройства генной пушки: 1 — пластиковый разрывающийся диск, 2 — летящий диск, 3 — частицы золота или вольфрама, покрытые ДНК, 4 — останавливающий экран, 5 — камера, 6 — стерильный лист, 7 — регенерационная среда; *б* — летящий диск, ускоренный давлением гелия, ударяется в экран и частицы металла, покрытые ДНК, пролетают сквозь сетку и бомбардируют клетки листа; *в* — обстрелянный лист, разрезанный на кусочки, помещается на селективную регенерационную среду; *г* — через 6—8 недель клетки с трансформированными пластидами дают начало каллусам, а затем и растениям-регенерантам; *д* — повторные циклы выращивания на селективной среде и регенерации для получения гомопластомных растений; *е* — укоренение гомопластомных трансформированных растений [по Bock, Hagemann, 2000]

Направленная трансформация хлоропластов

Первая трансформация пластид была произведена на трех мутантах *Chlamydomonas* по гену *atpB*: обстрел частицами, несущими немутантный аналог данного гена, привел к восстановлению нарушенного фотосинтеза. У большинства трансформантов в результате гомологичной рекомбинации с плазмидной ДНК полностью восстанавливался участок, который отсутствовал у исходных организмов из-за делеции. У некоторых форм плазмидная ДНК не интегрировалась в пластом, а продолжала существовать и реплицироваться самостоятельно на протяжении 65 клеточных генераций, но быстро терялась на селективной среде [Boynton et al., 1988].

Через два года появилось первое сообщение о применении данного метода для получения трансформированных хлоропластов у высшего растения — *Nicotiana tabacum* [Svab et al., 1990]. Растения, несущие генетически трансформированный геном пластид, было предложено называть транспластомными [Svab et al., 1990]. Позднее был разработан альтернативный метод химической трансформации с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ-трансформация) [Golds et al., 1993; O'Neill et al., 1993].

В основе обеих методик лежат особенности структуры и экспрессии геномов органелл, роднящие их с прокариотами, а также характерная для пластид чувствительность к антибиотикам. Включение в трансформационный вектор вместе с желаемым геном гена устойчивости к антибиотику дало возможность отбирать на селективной среде клетки с трансформированными пластидами [Svab et al., 1990; Bock et al., 1998]. Для отбора транспластомных растений была использована линия табака SPC2, несущая две точечные замены в гене *16S* рДНК (C → A в 860-м нуклеотиде и C → U в 1139-м), за счет которых она приобрела устойчивость к антибиотикам стрептомицину и спектиномицину [Svab et al., 1990]. Во всех экспериментах по трансформации пластид используют обычно двойные мутанты устойчивости к антибиотикам, так как частота спонтанного мутирования пластома достаточно велика [Svab, Maliga, 1991].

Именно признак устойчивости к антибиотику был первым, перенесенным в пластиды при бомбардировке растений табака плазмидами pZS148 (рис. 13.2). Из 148 листьев табака, обстрелянных по методу [Klein et al., 1987], было отобрано три транспластомных устойчивых клона [Svab et al., 1990].

Попав в органеллу, плазмида встраивается в пластидный геном в строго определенном месте, а именно туда, где находятся последовательности, гомологичные имеющимся в плазмиде. Происходит рекомбинация гомологичных последовательностей, и желаемая конструкция оказывается стабильно

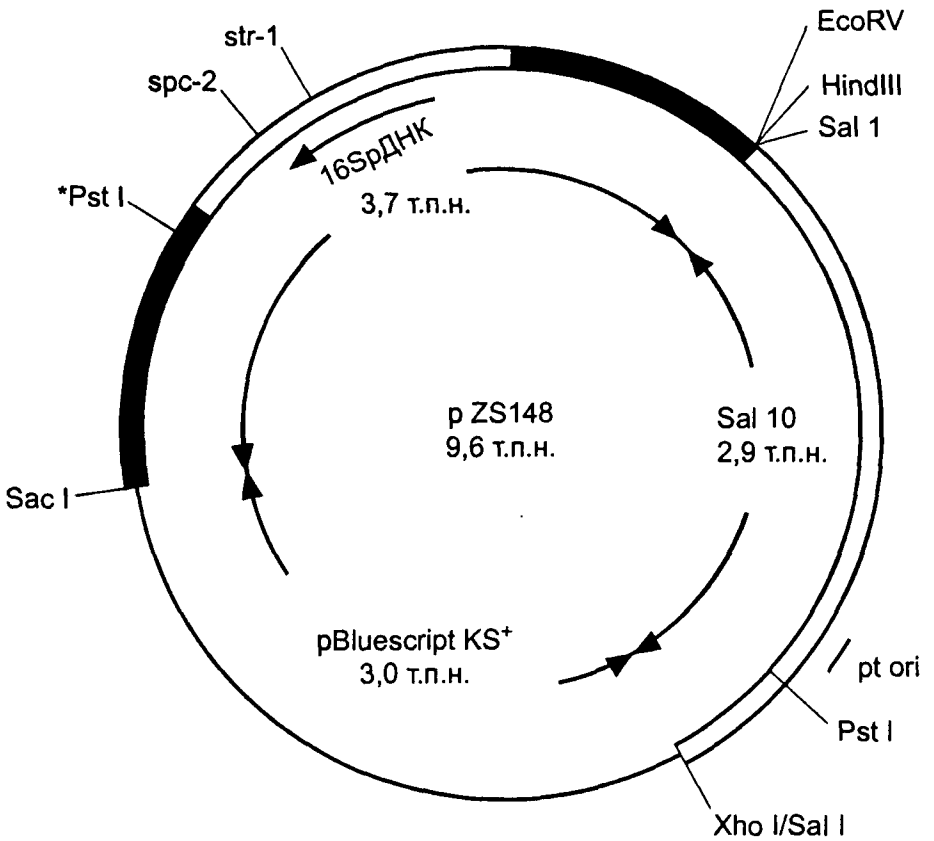


Рис. 13.2. Трансформационный вектор пластид pZS148 состоит из pBluescript KS^+ вектора, в который встроен Sac I–EcoRV-фрагмент пластидной РНК. Выделена светлым 16S рДНК. Указаны относительные позиции мутаций резистентности к антибиотикам стрептомицину (str-1) и спектиномицину (spc-2) и Pst1-линкера (*). 2,9 т.п.н. Sal 1-фрагмент включает область, связанную с репликацией (pt ori) [по Svab et al., 1990]

включенной в пластом (рис. 13.3). Затем на селективной среде с антибиотиком происходит постепенная сегрегация пластид с трансформированными ДНК и клеток, несущих эти пластиды [Svab et al., 1990; Bock, Hagemann, 1999].

В последующие годы в пластиды были успешно встроены и другие селективные маркеры — гены *aadA* и *nptII*. Первый обеспечивает синтез фермента, который катализирует модификацию антибиотиков аминогликозидного типа (стрепто- и спектиномицин), т.е. детоксифицирует их и тем самым придает растению устойчивость к антибиотикам (рис. 13.4) [Svab, Maliga, 1993]. Именно *aadA* является в настоящее время наиболее часто используемым селективным маркером [Bock, Hagemann, 2000]. Ген *nptII* обеспечивает растению устойчивость к канамицину [Carrer et al., 1993] (табл. 13.1).

Стабильность трансформированных хлоропластов

Как обсуждалось ранее (глава 2), количество копий молекул пластидных ДНК в клетке иногда достигает десяти тысяч: одна мезофильная клетка может содержать до 100 хлоропластов, в каждом из которых имеется до 100

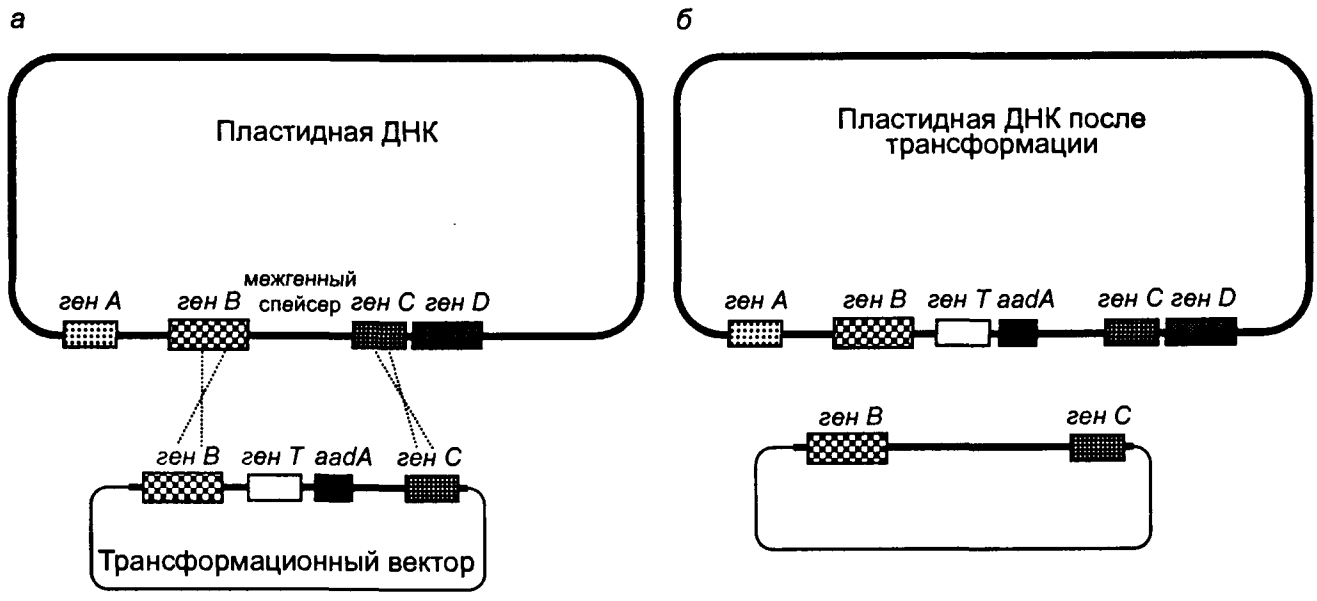


Рис. 13.3. Включение чужеродного гена (ген *T*) в пластом путем генетической трансформации. Последовательности хлоропластной ДНК выделены жирными линиями, плазмидные последовательности трансформирующего вектора — тонкими линиями. *а* — внедрение чужеродных последовательностей в межгенную область пластома путем гомологичной рекомбинации. Ген *T* тесно связан с селективным маркерным геном *aadA,* оба они встраиваются в пластом по механизму гомологичной рекомбинации (пунктирные линии) между двумя фланкирующими районами. *б* — окончательный продукт рекомбинации — трансформированная молекула хпДНК. Молекула плазмидной ДНК после рекомбинации обычно неспособна реплицироваться в хлоропласте и вскоре теряется [по Bock, Hagemann, 2000]

молекул ДНК [Bendich et al., 1987]. Непременным условием стабильности транспластомных растений-регенерантов является гомоплазмия, т.е. полное отсутствие нетрансформированных (исходных) пластидных ДНК. Первичные пластидные трансформанты являются, естественно, гетероплазменными, т.е. содержат в основном исходные и единичные трансформированные молекулы ДНК. Для достижения гомоплазмии листовые пластинки или их кусочки после обстрела трансформирующими плазмидами выдерживаются на среде с антибиотиком (спектиномицином, канамицином или другим — в зависимости от селективного маркера, табл. 13.1). Клетки, содержащие трансформированные пластомы, способны делиться. Через 4—6 недель инкубации они дают начало небольшим зеленым каллусам, которые могут в свою очередь дать начало транспластомным побегам (рис. 13.1). Нетрансформированные клетки чувствительны к ингибитору органельной трансляции спектиномицину, они постепенно теряют хлорофилл и не способны поддерживать клеточные деления [Maliga et al., 1993]. Для полного избавления от пластомов дикого типа проводятся повторные циклы регенерации на синтетической среде с высокими концентрациями антибиотика (рис.13.1,*г*—*е*).

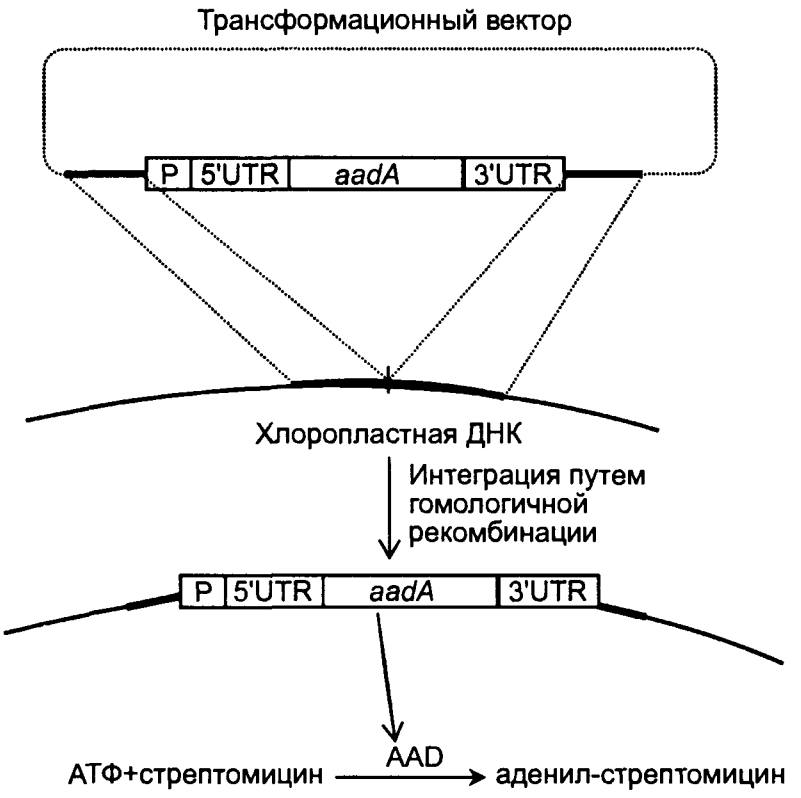


Рис. 13.4. Трансформация хлоропластной ДНК: плазмидный вектор с *aadA* кассетой (expression cassette) встраивается в специфический сайт пластома. Кассета фланкирована участками хлоропластной ДНК, соответствующими сайту трансформации (отмечены жирными линиями). Встраивание происходит путем гомологичной рекомбинации. В трансформированных пластидах фермент AAD (аминогликозид аденилтрансфераза) катализирует аденилирование стрептомицина / спектиномицина и таким образом инактивирует антибиотик. P — протомор; UTR — нетранслируемые области [по Rochaix, 1997]

Метод трансформации пластидных ДНК у высших растений долгое время был применим лишь для табака. Это объясняется рядом факторов: легкостью поддержания данного вида в культуре *in vitro* и успешной регенерацией растений из каллусов, наличием генетических маркеров пластома и хорошо исследованной пластидной ДНК табака [Maliga et al., 1993]. Однако в последние годы произошел определенный "прорыв" — были получены транспластомные растения *Arabidopsis*, картофеля и томатов (табл. 13.1).

Метод трансформации пластома — подход к проблемам цитоплазматической генетики

Трансформация и замещение генов. Первоначальные эксперименты по трансформации пластома состояли в замене гена дикого типа на его мутантный аллель. Одним из первых трансформированных генов был *16S* рДНК, который находится в инвертированном повторе (глава 2). Трансформация в силу малой частоты этого события происходит в одной из копий, однако в

Таблица 13.1

Чужеродные гены, успешно интегрированные в пластом высших растений [по Bock, Hagemann, в печати, с дополнениями]

Ген	Белок — продукт гена	Функция белка	Трансформированный объект	Источник
aadA	Аминогликозид 3′-аденилилтрансфераза	Положительный селективный маркер — устойчивость к стрепто- и спектиномицину	*Nicotiana tabacum*	Svab, Maliga 1993; Zoubenko et al., 1994
nptII	Неомицинфосфотрансфераза	Положительный селективный маркер — устойчивость к канамицину	« «	Carrer et al., 1993; Carrer, Maliga, 1995
uidA	β-глюкуронидаза	Белок — репортер генной экспрессии	« «	Staub, Maliga, 1993; Bock, Maliga, 1995
cry1A *cry2Aa2*	Кристаллический токсин из *Bacillus thuringiensis*	Инсектицидный белок	« «	McBride et al., 1995; De Cosa et al., 2001
codA	Цитозиндезаминаза	Негативный селективный маркер (чувствительность к 5′-флуороцитозину)	« «	Serino, Maliga, 1997
EPSPS	5-енолпируватшикимат-3-фосфатсинтаза	Устойчивость к гербициду глифосату	« «	Daniell et al., 1998
aadA	Аминогликозид 3′-аденилилтрансфераза	Положительный селективный маркер — устойчивость к стрепто- и спектиномицину	*Arabidopsis thaliana* *Solanum Lycopersicon esculentum*	Sikdar et al., 1998; Sidorov et al., 1999; Ruf et al., 2001

течение короткого периода измененный ген обнаруживается уже в двух копиях (рис.13.5). Происходит так называемая коррекция копий: репарационные процессы в пластидах обеспечивают идентичность нуклеотидной по-

следовательности в обоих повторах; при этом трансформированный ген удваивается [Maliga et al., 1993].

Инсерция гетерологичных последовательностей. Успешной трансформации можно добиться при встраивании не только гомологичных генов, но и гетерологичных последовательностей при фланкировании их гомологичными ДНК-фрагментами. Сайт инсерции при этом определяется той последовательностью, в которую он был клонирован *in vitro*. Размер фланкирующих гомологичных хпДНК-последовательностей с каждой стороны должен составлять не менее 1 т.п.н., размер гетерологичной последовательности при этом может изменяться от 1,3 до 3,7 т.п.н. [Maliga et al., 1993]. Было сконструировано семейство PRV (**p**lastid **r**epeat **v**ector), в основе которого — плазмида *E. coli* pUC119 со встроенными селективным маркерным геном *aadA* и множественным сайтом клонирования MCS (**m**ultiple **c**loning **s**ite) для инкорпорации требуемых генов [Zoubenko et al., 1994].

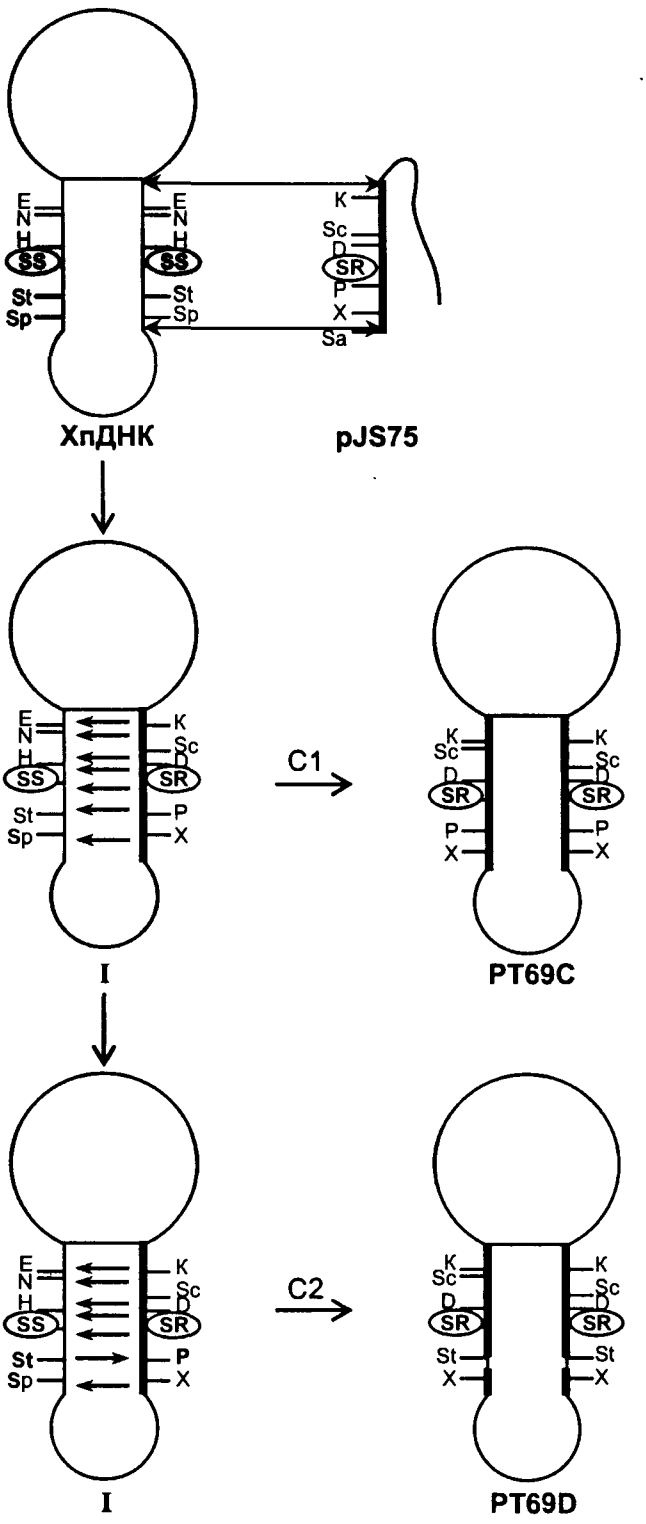


Рис.13.5. Замещение генов в инвертированном повторе хпДНК табака [по Maliga et al., 1993]. Трансгенный клон отбирался по признаку SR (устойчивость к спектиномицину), кодируемому геном 16S рДНК на плазмиде pJS75, которая несет фрагмент пластидной ДНК размером 6,2 т.п.н. Инвертированные повторы образуют двунитчатый участок. Первоначально участок пластома с аллелем SS заменяется на трансформирующую ДНК (жирная линия) в одной из двух копий. Эта промежуточная форма I реплицируется. Коррекция копии C1 в одном случае стабилизирует все маркеры, образуя пластом PT69C, тогда как в другом случае сохраняется не трансгенный P (PstI) сайт, а исходный St (StyI) и образуется пластом PT69D. Буквы — RFLP маркеры (сайты узнавания рестриктазами)

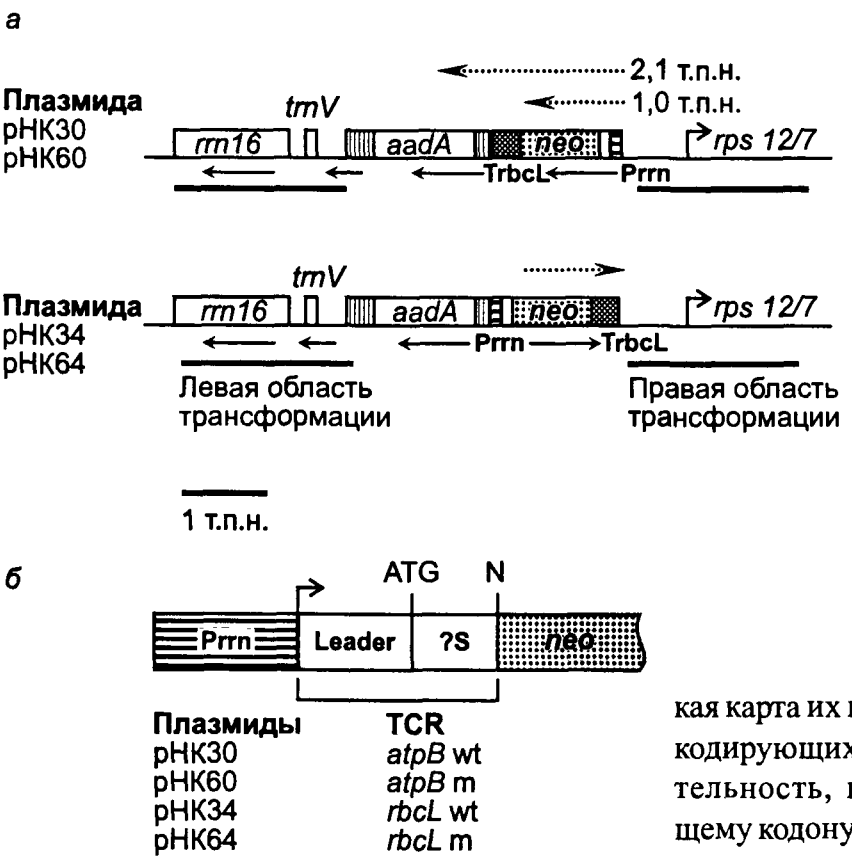


Рис. 13.6. Векторы для встраивания химерных *neo* генов в хлоропластный геном табака [модифицировано из Kuroda, Maliga, 2001]. *а* — селективный ген спектиномицин-устойчивости и репортерный ген *neo* фланкированы пластидной ДНК, несущей гены *rrn16, trnv* и *rps12/7. Neo* ген экспрессируется с Prrn промотора, *rbcL*3'-UTR(TrbcL) стабилизирует мРНК. Верхний и нижний векторы различаются противоположной ориентацией *neo* гена. Пунктирной стрелкой представлены *Neo* транскрипты; *б* — перечень плазмид и схематическая карта их промоторных и N-терминальных кодирующих областей. Leader — последовательность, предшествующая инициирующему кодону ATG, ?S — исследуемая область

Трансформация и механизмы редактирования пластидных мРНК В главе 10 обсуждался эксперимент по трансформации в пластоме табака гена *psbF* в шпинатный, на один нуклеотид отличающийся от табачного. "Шпинатный" ген *psbF* не редактировался в пластидах табака, что приводило к изменению фенотипа трансформированного табака. Трансформация гена *psbF* пластид привела к более точному представлению о механизмах эдитинга хлоропластных мРНК [Bock et al., 1994].

Трансформация и механизмы регуляции трансляции в хлоропластах. Участие в регуляции трансляции последовательностей, следующих сразу за инициирующим кодоном, долгое время оставалось гипотетичным. Для выяснения реальной ситуации была использована специальная конструкция (рис. 13.6). Химерный ген, встроенный в плазмиду перед последовательностью репортерного гена *neo,* содержал кодоны четырнадцати N-терминальных аминокислот соответственно *rbcL* либо *atpB* пластидных генов. Накопление фермента неомицинфосфотрансферазы — продукта гена *neo* — являлось показателем интенсивности трансляции. Если мутация индуцировалась в *rbcL*-сегменте, трансляция снижалась в 35 раз. Мутация же в *atpB*-области незначительно снижала трансляцию — менее чем вдвое [Kuroda, Maliga, 2001]. Таким образом, разные гены пластидного генома не только

различаются наличием либо отсутствием SD-последовательностей, предшествующих инициирующему кодону и определяющих связывание с рибосомой (глава 3), но и, очевидно, по-разному задействуют в трансляции участок, находящийся за ATG-кодоном. При конструировании трансформационных векторов следует использовать полученные сведения для достижения более полной экспрессии трансгенов [Kuroda, Maliga, 2001].

"Трансформационные" плазмиды. Плазмиды — экстрахромосомные генетические элементы, реплицирующиеся независимо от основного генома, были обнаружены в митохондриальном геноме грибов и ряда видов растений (см. главы 4, 5). Никаких сведений о наличии плазмид в хлоропластах высших растений в литературе нет. Однако при трансформации пластид табака вектором pJS75, несущим *aadA* ген в EcoR1-сайте, неожиданно были обнаружены мини-кольцевые молекулы ДНК размером 868 п.н. [Maliga et al., 1993]. Секвенирование показало, что они состоят из последовательности, идентичной участку рРНК оперона и ограниченной в векторе pJS75 двумя несовершенными повторами по 16 п.н. (рис. 13.7). Хотя в пластидном геноме табака имеются те же повторы в этом районе, мини-кольцевые молекулы никогда не обнаруживаются. Данная молекула образовалась в результате эксцизии из трансформирующей плазмиды pJS75. Гомологичная рекомбинация с участием 16-нуклеотидных повторов привела к образованию в хлоропластах новой автономной мини-кольцевой молекулы, названной NICE1. Дополнительным доказательством в пользу такого происхождения является наличие у NICE1 трансгенного RFLP-маркера (Xba1), которым была маркирована трансформирующая плазмида pJS75 и который отсутствует в этом месте в пластидной ДНК табака [Staub, Maliga, 1994].

По данным блот-гибридизации, мини-кольцевые молекулы NICE1 присутствуют в пластидах в виде мультимерных комплексов — до 8 молекул. Они способны к самостоятельной репликации и в некоторых транспластомных растениях-регенерантах обнаруживались даже спустя несколько месяцев [Staub, Maliga, 1994]. Однако, поскольку они не содержат необходимых для растения уникальных последовательностей, в отсутствие селекционного давления постепенно происходит их утрата [Maliga et al., 1993]. На основе NICE1-плазмид были сконструированы так называемые "челночные" (shuttle) плазмиды, способные курсировать между пластидами и *E. coli* (рис.13.6). С помощью такого механизма можно переносить в *E. coli* мутантные пластидные гены [Staub, Maliga, 1994].

Таким образом, результатом генетической трансформации пластома табака явилось возникновение новой плазмиды NICE1, способной к рекомбинации с пластидной ДНК, автономной репликации и длительному существованию в трансформированных хлоропластах.

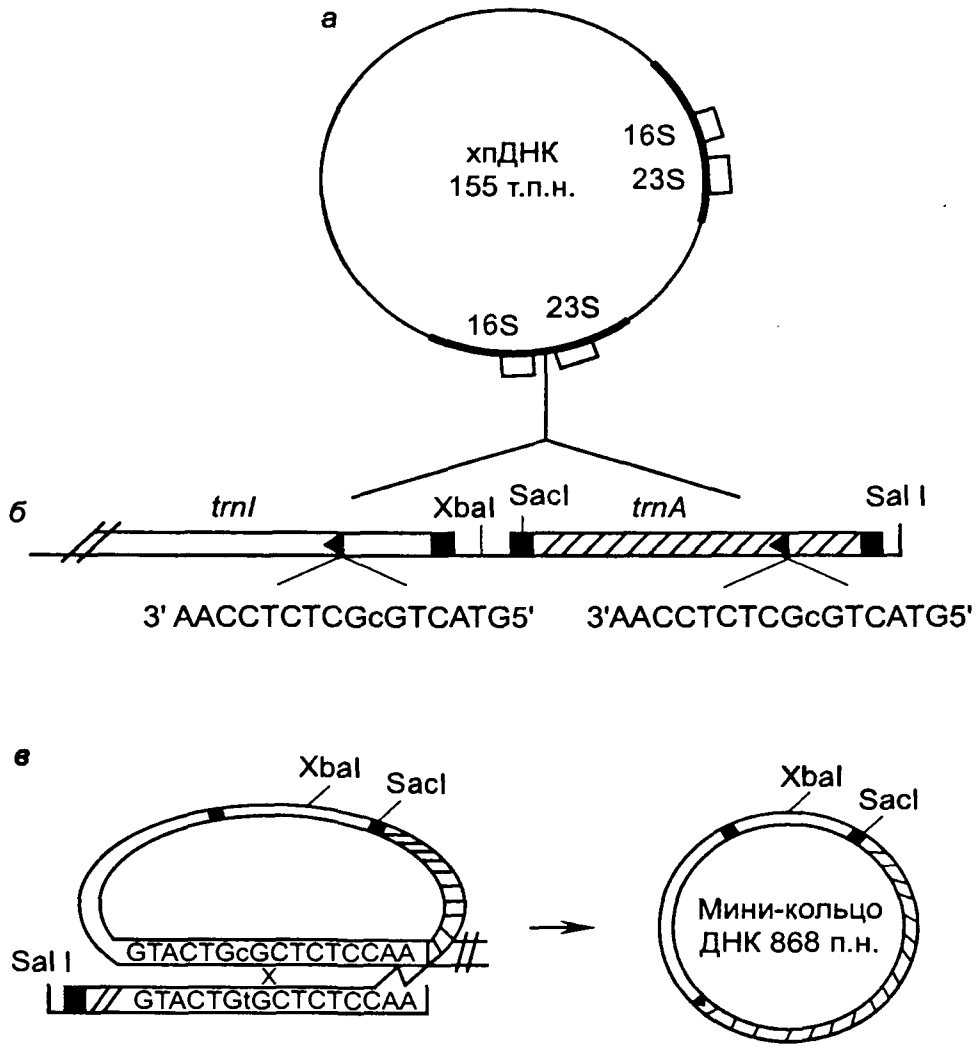


Рис. 13.7. Образование внехромосомного мини-кольца в пластидах табака при трансформации плазмидой pJS75 [по Maliga et al., 1993]. *а* — размещение последовательностей, входящих в мини-кольцо, в пластидной ДНК; *б* — 16-членный несовершенный повтор в плазмиде pJS75 (черные треугольники); *в* — образование мини-кольцевой молекулы путем внутримолекулярной рекомбинации через несовершенный повтор плазмидной ДНК. *trnI* и *trnA* — гены транспортных РНК, *16S* и *23S* — гены рибосомальных РНК; XbaI SacI, SalI — сайты узнавания соответствующими рестриктазами

Транспластомные растения перспективнее трансгенных

За полтора десятилетия, прошедших с момента первых успехов по трансформации хлоропластов, обнаружен ряд особенностей транспластомных растений, который показывает их преимущество перед "классическими" трансгенными. Основные из них следующие:

• *Высокий уровень экспрессии трансгена и накопления чужеродного белка.* При экспрессии чужеродного гена в пластидах удается добиться уровня трансгенного белка по отношению ко всему клеточному белку до 1—5%

[Staub, Maliga, 1993; McBride et al., 1995], а иногда до 40% [Staub et al., 2000; De Cosa et al., 2001; Ruf et al., 2001]. Это значительно превышает величины, которых удается достичь при пересадке ядерных генов. Причиной такой высокой экспрессии могут быть как полиплоидность пластидных генетических систем (до 10000 копий на клетку), так и высокая стабильность чужеродных белков в пластидах [Staub, Maliga, 1993; McBride et al., 1995; Bock, Hagemann, в печати].

• *Возможность экспрессировать несколько трансгенов в одном опероне* ("пакетирование" — "transgene stacking"), поскольку пластидная генетическая система эффективно транслирует полицистронные мРНК. Таким образом, удается достичь одновременной экспрессии нескольких трансгенов, находящихся под одним промотором и стабилизируемых одной и той же 3′UTR (нетранслируемым концом) [Staub, Maliga, 1995; Ruf et al., 2001]. Это, а также прокариотическая система экспрессии генов в пластидах создает предпосылки для попыток экспрессировать в пластидах целые бактериальные опероны, отвечающие за какой-либо биосинтетический путь, без дополнительных усилий по встраиванию сигналов экспрессии или других кодирующих участков [Bock, Hagemann, в печати].

• *Отсутствие эффектов положения в пластидах* благодаря отсутствию компактной хроматиновой структуры, а также вследствие эффективной интеграции трансгена путем гомологичной рекомбинации [Ruf et al., 2001]. В случае трансформирования в ядро чужеродная ДНК интегрируется преимущественно путем негомологичной рекомбинации, в результате чего возникает популяция трансгенных линий с различным количеством копий трансгена и различным уровнем его экспрессии в зависимости от того геномного окружения, в которое трансген попадает случайно. При транспластомной интеграции все эти факторы исключаются, поскольку благодаря гомологичной рекомбинации чужеродные гены направляются в строго определенный участок пластидной ДНК. Уровень накопления чужеродного белка в пластидах зависит от сигналов, направляющих транскрипцию трансгена, от стабильности мРНК и от трансляции (т.е. от комбинации промотора, последовательности SD и стабилизирующей транскрипт 3′UTR) (см. главу 3). Следовательно, все трансформанты, возникающие из одной и той же конструкции, находятся в совершенно равноценном положении и, значит, не отличаются уровнем экспрессии трансгена. Все это делает ненужной и бессмысленной кропотливую работу по поиску трансформированных линий с более высокой экспрессией трансгена, к чему обычно прибегают в случае ядерной трансформации [Bock, Hagemann, в печати].

• *Отсутствие эпигенетических эффектов в пластидах (gene silencing).* При трансформации ядерных генов у растений нередко низкий уровень экс-

прессии трансгенов связан с массой эпигенетических эффектов или механизмом «генного безмолвия» (gene silencing) [Depicker, Montagu, 1997]. Эпигенетические эффекты отсутствуют в органеллах растений, делая, таким образом, результаты трансформационных экспериментов более предсказуемыми, чем при трансформации генов в ядро [Bock, Hagemann, в печати; Ruf et al., 2001].

• *Сдерживание неконтролируемого распространения трансгенов в биосистемах.* Хлоропласты большинства растений наследуются по материнской линии, следовательно, пластидная ДНК обычно не переносится пыльцой. Таким образом, в отличие от ядерных пластидные трансгены не способны распространяться с пыльцой. Это свойство транспластомных культурных растений снимает вероятность предполагаемого экологического риска, который возможен у трансгенных по ядерным генам растений и связан, например, с передачей введенных генов устойчивости диким родственникам культурных растений — сорнякам [Bergelson et al., 1998; Bock, Hagemann, в печати].

Перечисленные особенности транспластомных растений делают технологию трансформации пластид весьма многообещающим инструментом, который позволит избежать многих проблем и риска, связанного с классическими трансгенными методами. Достигнуты первые успехи в решении важных биотехнологических проблем, которые подтвердили большие возможности метода трансформации пластид.

Метод трансформации пластома и задачи биотехнологии

Один из наиболее ярких примеров успешного применения трансформации — создание транспластомных растений с чрезвычайно высоким уровнем экспрессии чужеродного гена кристаллического токсина (*cry1A*), перенесенного от *Bacillus thuringiensis*. Предпринимавшиеся ранее попытки пересадить данный ген в ядро не имели успеха из-за прокариотической природы *cry1A* и особенностей экспрессии генов в ядре (см. пп. 1, 3, 4 предыдущего раздела). Экспрессия данного гена в пластидах составила 3—5% от количества тотального растворимого белка в клетке. Растения с геном *cry1A*, пересаженным в их хлоропластную ДНК, оказались надежно защищенными от личинок нескольких травоядных насекомых [McBride et al., 1995]. В дальнейшем усовершенствование экспериментальных подходов позволило трансформировать опероном *cry2Aa2* геном хромопластов и вызвать накопление необходимого токсина — до 45,3% общего растворимого белка клетки. Поскольку были трансформированы хромопласты, данный ток-

син сохранялся в высоком титре и в старых листьях, обеспечивая защиту растения во все этапы онтогенетического развития. Наблюдалась 100%-ная гибель насекомых после дегустации трансгенных листьев [deCosa et al., 2001].

Еще один пример удачного решения проблем сельскохозяйственной биотехнологии с помощью транспластомных растений — встраивание гена устойчивости к гербициду для успешной химической борьбы с сорняками. Гербицид глифосат — сильный ингибитор биосинтеза ароматических аминокислот в растениях. Он действует как конкурентный ингибитор фермента 5-енолпируват-шикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS). Резистентность к глифосату может достигаться либо гиперэкспрессией фермента EPSPS, либо экспрессией мутантных аллелей, кодирующих глифосат-нечувствительные молекулы EPSPS. Был пересажен ген EPSPS от *Petunia* в пластиды табака и достигнуто накопление значительного количества фермента за счет гиперэкспрессии. Транспластомные растения табака проявили толерантность к чрезвычайно высоким концентрациям глифосата. Как и ожидалось, признак передавался строго по материнской линии [Daniell et al., 1998].

Одно из недавних достижений "хлоропластной генетической инженерии" — трансформация пластид томатов. Особенностью этого успешного проекта явилось не только расширение дотоле крайне узкого круга трансформированных растений еще на один вид, но и достижение высоких уровней экспрессии трансгена не в зеленых пластидах, а в хромопластах плодов томатов. Выбрав более эффективный промотор, удалось получить уровень экспрессии трансгена в хромопластах, составляющий 50% от такового в хлоропластах [Ruf et al., 2001]. Отметим, что в трансформированных ранее растениях картофеля чужеродный белок в нефотосинтезирующих микроклубнях накапливался в количествах в 100 раз меньших, чем в зеленых листьях [Sidorov et al., 1999]. Хотя получение фертильных пластидных трансформантов у томатов еще гораздо более трудоемкий и долгий процесс, чем у табака, данное направление открывает ряд новых сфер применения. Растения, имеющие съедобные плоды, могут быть использованы как "биофармацевтические фабрики". Такое направление позволит создать съедобные вакцины, "растительные" антитела ("plantibodies") и терапевтические препараты [Giddings et al., 2000; Daniell et al., 2001]. Иллюстрацией этого является успешный синтез человеческого соматотропина в пластидах табака. Важно, что при этом соматотропин синтезировался в растворимой, биологически активной форме, а концентрация рекомбинантного белка в клетке более чем в 300 раз превышала таковую при трансформации данным геном ядерного генома [Staub et al., 2000].

Направленная трансформация органелл и внутриклеточное перераспределение генов

Изменение локализации генов органелл в процессе эволюции мы детально обсуждали в главе 8, посвященной взаимодействию геномов клеточных компартментов. Разработка метода направленной трансформации органельных ДНК позволила поставить ряд изящных экспериментов по искусственному перемещению генов и их функционированию в новых условиях.

Первая из известных нам работ по искусственной замене митохондриальной копии гена на ядерную была выполнена на мутантных клетках дрожжей, у которых отсутствовала одна из субъединиц АТФазного комплекса — atp8 [Nagley et al., 1988]. Данная субъединица состоит из 48-членного полипептида, она необходима для включения в комплекс другого белка — atp6, ее же синтез зависит от правильного встраивания в мембрану митохондрий белка atp9. Гены, контролирующие эти три субъединицы комплекса, находятся в митохондриях (см. табл. 5.2). Была химически синтезирована последовательность *atp8*, к ней присоединили транзитный пептид гена *atp9 Neurospora*. В отличие от *Saccharomyces* ген *atp9* у *Neurospora* переместился в ядро в процессе эволюции (см. табл. 5.3), и попадание белка atp9 в митохондрии стало происходить с помощью транзитного пептида, который и использовали в эксперименте для той же цели, но уже с искусственной копией гена *atp8*. В мультикопийный экспрессионный вектор pLF1, реплицирующийся в ядре, была встроена конструкция N9/Y8 (рис.13.8). Ядерный аналог мутировавшего митохондриального гена функционально заместил его, восстановив нарушенную у мутанта функцию АТФазного комплекса [Nagley et al., 1988].

Искусственный перенос хлоропластного гена в ядро выполнен у табака [Kanevski, Maliga, 1994]. Путем направленной трансформации в пластоме был разрушен ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу рибулозодифосфаткарбоксилазы. Кодирующую область данного гена объединили с участком ядерного гена малой субъединицы *rbcS*, кодирующего транзитный пептид Tp. Образованный химерный ген *Tp-rbcL* в составе экспрессионной кассеты был введен в ядро. Трансформация ядерного генома табака осуществлялась с помощью *Agrobacterium*. Как и в предыдущем случае, органельный ген экспрессировался в ядре, а продукт его экспрессии возвращался в хлоропласты, где происходило отщепление транзитного пептида и восстановление функционирующего белка [Kanevski, Maliga, 1994].

Обратный перенос — из ядра в пластом — был выполнен для ядерно-

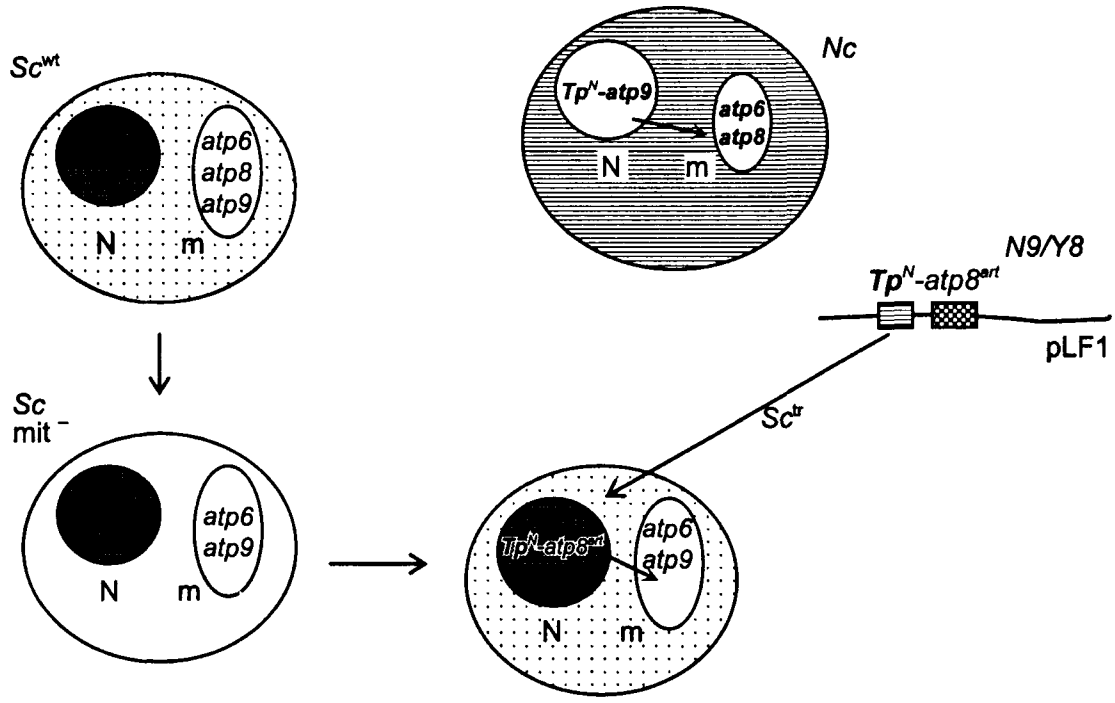


Рис. 13.8. Функциональная замена митохондриального гена *atp8* на искусственный ядерный у *Saccharomyces cerevisiae*. *Sc* ^{wt} — клетки дикого типа, митохондрии несут гены трех единиц АТФазы; *Sc* mit $^-$ — мутант с нарушенным синтезом atp8; *Nc* — клетки *Neurospora crassa,* у которых ген *atp9* перенесен в ядро в процессе эволюции; *N9/Y8* — гибридная конструкция ДНК-транзитного пептида (Tp^N), взятого из гена *atp9 Neurospora* и химически синтезированного гена *atp8 S. cerevisiae* (Y8), встроенная в реплицирующийся в ядре мультикопийный экспрессионный вектор pLF1; Sc^{tr} — трансформация мутантного штамма с помощью конструкции N9/Y8, реплицирующейся в ядре в составе вектора pLF1. В митохондриях трансформированных клеток транзитный пептид отщепляется, нарушенная функция АТФазного комплекса восстанавливается [по данным Nagley et al., 1988]

го гена α-субъединицы антранилат-синтазы табака (*ASA2*). Данный фермент — ключевой в синтезе триптофана; в результате трансформации в пластидный геном экспрессия гена *ASA2* усилилась, что привело к увеличению биосинтеза триптофана. Этот эксперимент показал возможность контроля над биосинтезом важных метаболитов с помощью пластомной трансформации ядерных генов. Интересно, что в данном случае в пластиды был возвращен ген, изначально входивший в геном далекого эндосимбиотического предка пластид [Zhang et al., 2001].

Рассмотренные в этом разделе примеры трансформации являются еще одним доказательством эндосимбиотической природы эукариотической клетки. В некоторой степени они моделируют прошлые и, возможно, будущие события естественного переноса генов между клеточными компартментами в процессе эволюционного развития.

Инвертированная генетика — новое направление науки о генах

Развитие технических возможностей манипуляции с клеточными геномами привело к несколько неожиданным последствиям. Метод направленной трансформации пластид позволил не только встраивать новые гены в хлоропластную ДНК, но и адресно "выключать" определенные гены. Это привело к рождению новой ветви науки — так называемой "инвертированной", или обратной, генетики ("reverse genetics").

Направленное разрушение определенных генов пластид, функция которых не обеспечивает выживаемости клетки, может при селективном отборе заканчиваться гомопластомным состоянием. Таким образом, мы получаем клетку или даже многоклеточный организм, у которого изменен соответствующий ген. По нарушению той или иной функции в таком мутантном организме можно установить, какую функцию выполнял разрушенный ген [Rochaix, 1997; Bock et al., 1999]. Если же ген определяет жизненно важную функцию, он может сохраняться лишь в гетеропластомном состоянии, несмотря на длительный селективный отбор, так как гомопластомные растения или клетки окажутся нежизнеспособными.

Сайт-направленный мутагенез хлоропластных генов выполняется следующим образом. Трансформационная кассета *aadA* встраивается в сайт, который не важен для функционирования хлоропластов и находится рядом с геном-мишенью, после чего конструкция вводится в пластом путем биолистной трансформации (рис 13.9). Такой подход оказался чрезвычайно продуктивным для анализа функций хлоропластно кодируемых субъединиц фотосинтетических комплексов и для идентификации новых субъединиц этих комплексов [Rochaix, 1997].

Инвертированная генетика и функция неизвестных пластидных генов

Секвенированные геномы пластид как высших растений, так и водорослей наряду с теми генами, функция которых уже была установлена, содержали открытые рамки считывания с неизвестной функциональной нагрузкой. Перечень таких рамок считывания и предполагаемые для некоторых из них гены приведены в табл. 13.2. С помощью делеционного мутагенеза создаются "нуль-аллели" таких генов, которые затем методом трансформирования пластома встраиваются, заменяя соответствующие эндогенные интактные аллели (рис. 13.9). Проводится физиологический, биохимический, молекулярно-биологический анализ таких трансформационных мутантов, в результа-

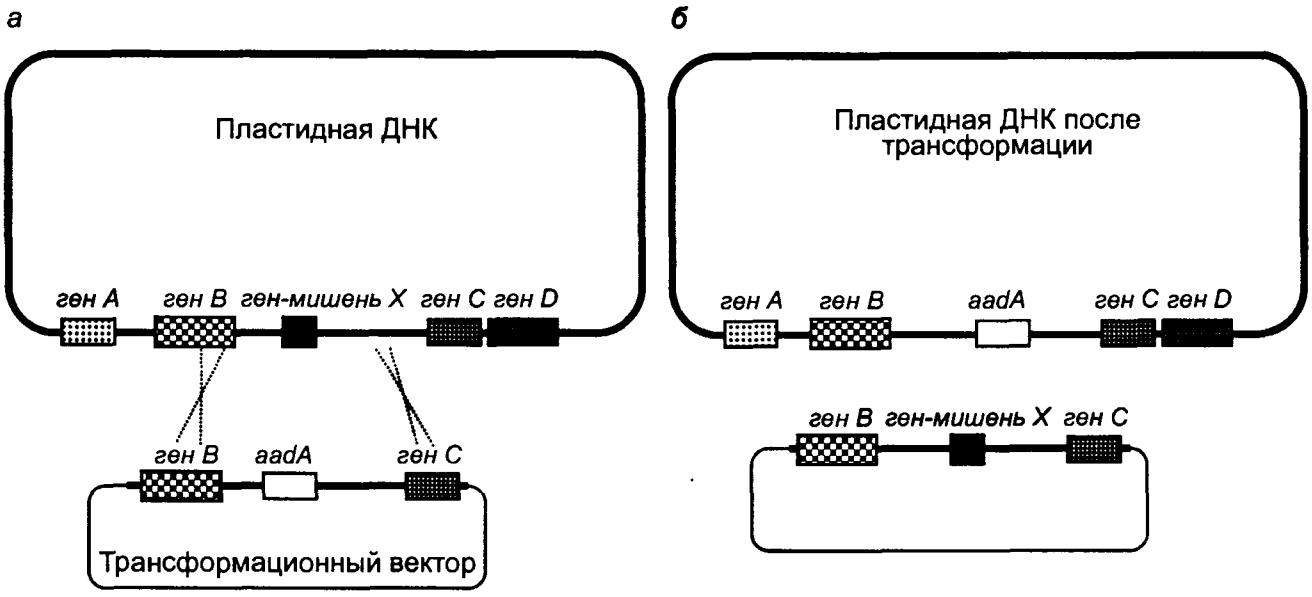


Рис. 13.9. Прием "инвертированной генетики": удаление пластидного гена неизвестной функции (*ген-мишень X*) путем хлоропластной трансформации. Последовательности хлоропластной ДНК показаны толстыми линиями, плазмидные последовательности вектора — тонкими линиями. *а* — интегрирование чужеродных последовательностей в пластом путем гомологической рекомбинации. Ген *X* на пластидной ДНК замещается геном селективного маркера *aadA*-вектора путем гомологической рекомбинации по фланкирующим областям (пунктирные линии); *б* — продукты гомологичной рекомбинации. При наличии селективного давления рекомбинантные молекулы имеют преимущество над нерекомбинантными молекулами хлоропластной ДНК дикого типа и быстро размножаются. Трансформационный вектор обычно неспособен к репликации и быстро теряется [по Bock et al., 1998]

те чего часто удается установить функцию анализируемых рамок считывания [Bock et al., 1999].

Так, например, "выключение" открытой рамки считывания *ycf3* хлоропластного генома табака привело к образованию фотосинтетически некомпетентных растений, в мутантных растениях отсутствовали все субъединицы белка фотосистемы I. По мнению исследователей, *ycf3* участвует либо в сборке фотосистемы I, либо является фактором, обеспечивающим ее стабильность [Ruf et al., 1997; Boudreau et al., 1997]. К аналогичным выводам пришли исследователи при анализе роли *ycf3* и *ycf4* у *Chlamydomonas*: разрушение любого из них приводило к полной утрате фотосистемы I. Важно отметить, что хотя продукты генов *ycf3* и *ycf4* обнаруживаются в тилакоидных мембранах, они не входят непосредственно в состав ФСI. Вероятно, у *Chlamydomonas*, так же как и у табака, данные гены либо участвуют в сборке, либо контролируют стабильность фотосистемы I [Rochaix, 1997].

Еще одна неидентифицированная открытая рамка считывания — *ycf8* — котранскрибируется в пластидах как водорослей, так и наземных растений вместе с геном *psbB*, который кодирует одну из субъединиц фотосистемы II

Таблица 13.2

Консервативные открытые рамки считывания секвенированных пластидных геномов [по Bock et al., 1999, с дополнениями]*

Рамка считывания	*Zea*	*Oryza*	*Triticum*	*Nicotiana*	*Pinus*	*Marchantia*	*Chlorella*	*Epifagus*	*Euglena*	*Cyanophora*	*Porphyra*	*Odontella*
Ycf1	-	-	-	ORF1901	ORF1756	ORF464/1068	ORF819	ORF1738	-	-	-	-
Ycf2	-	-	-	ORF2280	ORF2054	ORF2136	ORF1720	ORF2216	-	-	-	-
Ycf3/ (PSI)	IRF170	IRF170	IRF170	IRF168	IRF169	IRF168	ORF167	-	-	ORF170	ORF173	ORF179
Ycf4/ (PSI)	ORF185	ORF184	ORF184	ORF184	ORF184	ORF184	ORF183	-	ORF206	ORF187	ORF186	ORF181
Ycf5/ *ccsA*	ORF321	ORF321	ORF320	ORF313	ORF320	ORF320	ORF315	-	-	ORF322	ORF319	ORF312
Ycf6	ORF29	ORF29	ORF29	ORF29	ORF29	ORF29	-	-	-	ORF29	ORF29	ORF29
Ycf7/ *petL*	ORF31	ORF31		ORF31	ORF33	ORF31	-	-	-	ORF28	ORF31	ORF31
Ycf8 / *psb/T*	ORF33	ORF35	ORF35	ORF34	ORF35	ORF35	-	-	ORF31	ORF31	ORF31	ORF32
Ycf9	ORF62	ORF62	ORF62	ORF62	ORF62	ORF62	ORF62	-	ORF65	ORF65	ORF62	ORF61
Ycf10/ *cem A*	ORF230	ORF230	ORF230	ORF229	ORF261	ORF434	ORF266	-	-	-	-	-
Ycf11/ *accD*	-	-	-	ORF512	ORF321	ORF316	-	ORF493	-	-	ORF288	-
Ycf12	-	-	-	-	-	ORF33	ORF37	-	ORF33	ORF36	ORF34	ORF34
Ycf14/ *matK*	ORF544	ORF542	ORF542	ORF509	ORF515	ORF370	-	ORF439	-	-	-	-

[Monod et al., 1994]. Данный ген контролирует небольшой полипептид (31 аминокислота), который предположительно является одной из субъединиц фотосистемы II. Мутанты по *ycf8* способны нормально расти фотоавтотрофно, однако при интенсивном солнечном свете или при подавлении пластидного белкового синтеза под действием спектиномицина у данных мутантов повреждается функция фотосистемы II и нарушается рост клеток. Таким образом, продукт гена *ycf8* — малая субъединица фотосистемы II (*psbT*) — обеспечивает высокую фотосинтетическую активность при неблагоприятных внешних условиях [Rochaix, 1997].

Продукт гена *ycf7 Chlamydomonas* — также небольшой белок (43 аминокислоты), при очистке попадает в одну фракцию с комплексом цитохром b_6/f. У мутантов, не имеющих b_6/f комплекса, продукт гена *ycf7* также не обнаруживается. Таким образом, исследования методом инвертированной генетики совместно с другими экспериментальными подходами позволили определить функцию этого гена как одной из малых субъединиц b_6/f комплекса; ген получил название *petL* [Takahashi, 1996; Rochaix, 1997].

Мутант по *ycf5 Chlamydomonas* неспособен присоединять гем как к мембранно-связанному апоцитохрому *f*, так и к растворимому цитохрому *c6*, который в условиях дефицита меди функционирует как донор электронов для фотосистемы I. Точечная инактивация гена *ycf5* приводит к утрате обоих хлоропластных цитохромов *c*-типа. Ген *ycf5* в результате был переименован в *ccsA* (синтез *c*-типа цитохромов) [Rochaix, 1997].

Многие из рассмотренных здесь генов весьма консервативны: *ycf4* обнаруживается во всех секвенированных пластомах, кроме *Epifagus, ycf3* и *ycf5* — везде, кроме *Euglena* и *Epifagus*, *ycf8* — во всех пластидных геномах, кроме *Epifagus* и *Chlorella*. Функция *ycf9*, отсутствующего только у *Epifagus* (табл. 13.2), была исследована у трансластомных растений табака. При нормальной освещенности у растений с отсутствующим геном *ycf9* не обнаружено никаких фенотипических особенностей. Однако в условиях пониженной ос-

Примечание. ORF — открытая рамка считывания; IRF — интронсодержащая открытая рамка считывания; PSI — ген, относящийся к фотосистеме I; *ccsA* — ген, кодирующий фактор биогенеза цитохрома *c*; *petL* — ген субъединицы комплекса цитохромов b_6/f; *psbT* — ген субъединицы фотосистемы II; *cem A* — ген белка внутренней мембраны; *accD* — ген субъединицы ацетил-CoA-карбоксилазы; *matK* — ген, кодирующий предполагаемую интрон-матуразу.

* В таблице указаны предполагаемые функции некоторых ORF — названы гены или комплексы, с которыми они скорее всего связаны. Даны потенциальные размеры генных продуктов (число кодонов), определяемые по ДНК-последовательностям в рамках считывания. Прочерки — отсутствие гомологичных рамок считывания в пластомах соответствующих видов [по данным Wakasugi et al., 1997; Reardon, Price, 1995; Ogihara et al., 2000].

вещенности скорость роста у мутантных растений намного ниже, чем у нормальных. Причиной этого являлось, как было показано, нарушение пигмент-белкового светособирающего комплекса фотосистемы II и вследствие этого снижение эффективности захвата протонов при слабой освещенности. Показано, что продукт гена *ycf9* — полипептид размером 62 аминокислоты — входит в состав светособирающего комплекса наряду с классическими пигмент-связывающими белками и играет важную роль в его сборке или стабилизации [Ruf et al., 2000].

Весьма интересна функция гена *ycf10*: разрушение его у *Chlamydomonas* приводит к повышенной чувствительности к свету и снижению поглощения неорганического углерода. Продукт гена *ycf10* был локализован в пластидной оболочке, мутация аналогичного гена у цианобактерии *Synechocystis* приводит к дефекту поглощения углекислоты. Первичным повреждением при этом является потеря способности вытеснять протоны под действием света [Rochaix, 1997].

Самой маленькой из всех консервативных рамок считывания является *ycf6* — она контролирует полипептид длиной всего 29 аминокислот. Гомоплазматический транспластомный мутант, не имеющий *ycf6* генов, фотосинтетически некомпетентен. При этом обе фотосистемы остаются интактными и физиологически активными, однако прекращается перенос электронов с фотосистемы II на фотосистему I. Молекулярный анализ показал, что у мутантов полностью отсутствует связующее звено между фотосистемами — комплекс b_6/f. Масс-спектроскопический анализ комплекса b_6/f позволил обнаружить присутствие белка с точно такой же молекулярной массой, что и продукт гена *ycf6*, таким образом, было показано, что ген кодирует одну из малых субъединиц комплекса b_6/f, контролирующую его сборку либо стабильность. Аналогичные функции уже были ранее установлены для полипептидов — продуктов генов *ycf3, ycf4, ycf7* и *ycf9* [Hager et al., 1999].

Покрытосеменные растения синтезируют хлорофилл только на свету, тогда как многие низшие и даже голосеменные сохранили способность к темновому синтезу хлорофилла. Направленное разрушение трех генов — *chlB*, *chlL* и *chlN* — приводит к постепенной потере хлорофилла в темноте и накоплению протохлорофиллида. Таким образом, установлено участие данных генов в темновом синтезе хлорофилла [Rochaix, 1997].

Две самые большие открытые рамки считывания в хлоропластных геномах большинства высших растений (за исключением злаков) — *ycf1* и *ycf2*: у табака они кодируют белки размером соответственно 1901 и 2280 аминокислот (табл. 13.2). Несмотря на упорные попытки получить гомопластомные мутанты табака по этим генам, все растения оставались гетеропластомными даже после повторных циклов регенерации при высоком селективном

прессинге. Очевидно, данные гены кодируют белки, необходимые для выживания растений, — это первые гены пластид высших растений, незаменимость которых прямо доказана [Drescher et al., 2000]. Можно предполагать, что гены *ycf1* и *ycf2* связаны с какими-то важными метаболическими процессами клетки или же выполняют какие-то структурные функции, связанные, например, с сохранением пластидной ДНК. Эти гены не участвуют в фотосинтетических процессах; отметим, что они присутствуют в пластоме нефотосинтезирующего паразита *Epifagus*, утратившего значительную часть пластидных генов. Интересно, что *ycf1* и *ycf2* отсутствуют в пластоме однодольных (табл. 13.2). Этот факт, а также жизнеспособность мутантных растений ячменя *albostrians,* не синтезирующих ни одного пластомного белка, свидетельствуют о коренных различиях между однодольными и двудольными растениями в функционировании белоксинтезирующей системы пластид [Drescher et al., 2000].

Отметим, что существование второй, ядерно кодируемой транскрипционной системы в пластидах (глава 3) было обнаружено при получении транспластомных растений с делецией *rpoB* гена, кодирующего β-субъединицу хлоропластной РНК-полимеразы [Allison et al., 1996].

Интересно, что мутанты по хлоропластно кодируемой РНК-полимеразе у высших растений могут находиться в гомопластомном состоянии, тогда как у *Chlamydomonas* — только в гетеропластомном [Rochaix, 1997; Drescher et al., 2000].

Направленный мутагенез и трансформация с помощью полиэтиленгликоля были применены для прямого исследования функции генов *NDH*-комплекса хлоропластов табака. В отличие от митохондрий функция состоящего из 11 генов *NDH*-комплекса пластид в метаболизме неясна [Kofer et al., 1998]. Были получены трансформанты по генам, кодирующим субъединицы A, C, H, I, J и K *NDH*-комплекса, и показано, что даже при повторных циклах регенерации во всех трансформантах сохранялись 1—5% копий генов дикого типа. Это указывает на жизненную важность интактных генов *NDH*-комплекса пластид для растения. У трансформированных мутантных форм имелись характерные особенности: а) отсутствие быстрого восстановления флуоресценции хлорофилла после 5-минутного облучения актиническими лучами, что указывает на нарушение быстрого восстановления пула пластохинонов; б) мутанты с дефектами оперона *ndhC-K-J* накапливали крахмал, что указывало на неэффективное окисление глюкозы в процессах гликолиза и пентозофосфатного пути. Все это свидетельствует об участии пластидного *NDH*-комплекса в "хлорореспирации" в качестве клапана, окисляющего избытки восстановленных эквивалентов [Kofer et al., 1998].

* * *

Таким образом, третий способ моделирования органельных геномов — направленная трансформация хлоропластной ДНК — оказался чрезвычайно информативным для устранения многочисленных "белых пятен" на карте пластидного генома. Кроме того, с помощью данного метода удалось решить ряд практически важных задач биотехнологии, безуспешно штурмуемых на протяжении десятилетий другими генетическими методами. И наконец, с помощью направленной трансформации была фактически создана новая область генетики — так называемая "инвертированная генетика", позволяющая использовать стратегию направленного разрушения того или иного гена органелл для:

— выяснения его функциональной роли в организме;
— анализа различных этапов экспрессии пластидных генов;
— релокации генов в другие клеточные компартменты;
— уточнения неясных моментов эволюции геномов органелл.

Литература

Allison L.A., Simon L.D., Maliga P. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 2802—2809.

Bendich A.J. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? // BioEssays. 1987. Vol. 6. P. 279—282.

Bergelson J., Purrington C.B., Wichmann G. Promiscuity in transgenic plants // Nature. 1998. Vol. 395. P. 25.

Bock R., Drescher A., Ruf S. Reverse genetics in higher plant plastids // From Symbiosis to Eukaryotism. Endocytobiology VII. Geneva: Geneva University Press, 1999. P. 427—437.

Bock R., Hagemann R. Plastid Genetics: Manipulation of Chloroplast Genomes and Biotechnological Applications // Progress in Botany. 2000. Vol. 61. P. 76—90.

Bock R., Kössel H., Maliga P. Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype // EMBO J. 1994. Vol. 13, No. 19. P. 4623—4628.

Bock R., Maliga P. Correct splicing of a group II intron from a chimeric reporter gene transcript in tobacco plastids // Nucl. Acids Res. 1995. Vol. 23. P. 2544—2547.

Boudreau E., Takahashi Y., Lemieux C. et al. The chloroplast *ycf3* and *ycf4* reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex // EMBO J. 1997. Vol. 16. P. 6095—6104.

Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H. et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles // Science. 1988. Vol. 240. P. 1534—1538.

Carrer H., Hockenberry T.N., Svab Z., Maliga P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco // Mol. Gen. Gen. 1993. Vol. 241. P. 49—56.

Carrer H., Maliga P. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene // Bio/Technology. 1995. Vol. 13. P. 791—794.

Daniell H., Datta R., Varma S. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome // Nature Biotechnol. 1998. Vol. 16. P. 345—348.

Daniell H. GM crops: public perception and scientific solutions // Trends Plant Sci. 1999. Vol. 4. P. 467—469.

Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // Trends Plant Sci. 2001. Vol. 4. P. 467—469.

De Cosa B., Moar W., Lee S.-B. et al. Overexpression of the *Bt* cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals // Nature Biotechnol. 2001. Vol. 19. P. 71—74.

Depicker A., van Montagu M. Post-transcriptional gene silencing in plants // Curr. Opin. Cell Biol. 1997. Vol. 9. P. 373—382.

Drescher A., Ruf S., Calsa Jr. T. et al. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes // Plant J. 2000. Vol. 22. P. 97—104.

Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals // Nature Biotechnol. 2000. Vol. 18. P. 1151—1155.

Golds T., Maliga P., Koop H.-U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* // Bio/Technology. 1993.Vol. 11. P. 95—97.

Hager M., Biehler K., Illerhaus J. et al. Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b_6f complex // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 5834—5842.

Johnston S.A., Anziano P.Q., Shark K. et al. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles // Science. 1988. Vol. 240. P. 1538—1541.

Kanevski I., Maliga P. Relocation of the plastid *rbcL* gene to the nucleus yields functional ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in tobacco chloroplasts // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1994. Vol. 91. P. 1969—1973.

Klein T.M., Wolf E.D., Sanford J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // Nature. 1987. Vol. 327. P. 70—73.

Kofer W., Koop H.-U., Wanner G., Steinmüller K. Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation // Mol. Gen. Gen. 1998. Vol. 258. P. 166—173.

Kuroda H., Maliga P. Sequences downstream of the translational initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts // Plant Physiology. 2001. Vol. 125. P. 430—436.

Maliga P., Carrer H., Kanevski I. et al. Plastid engineering in land plants: a conservative genome is open to change // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1993. Vol. 342. P. 203—208.

McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J. et al. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of insecticidal protein in tobacco // Bio/Technology. 1995. Vol. 13. P. 362—365.

Monod C., Takahashi Y., Goldschmidt-Clermont M., Rochaix J.D. The chloroplast ycf8 open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 2747—2754.

Nagley P., Farrell L.B., Gearing D.P. et al. Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 2091—2095.

O'Neill C., Horvath G.V., Horvath E. et al. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems // Plant J. 1993. Vol. 3. P. 729—738.

Ogihara Y., Isono K., Kojima T. et al. Chinese spring wheat *(Triticum aestivm)* chloroplast genome: complete sequence and contig clones. Yokohama: Kihara Memorial Yokohama Foundation, 2000. 66p.

Reardon E.M., Price C.A. Plastid genomes of three non-green algae are sequenced //Plant Mol. Biol. Rep. 1995. Vol. 13. P. 320—342.

Rochaix J.D. Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes // Trends in Plant Sci. 1997. Vol. 2. P. 419—425.

Ruf S., Biehler K., Bock R. A small chloroplast-encoded protein as a novel architectural component of the light-harvesting antenna// J. Cell Biol. 2000. Vol. 149. P. 369—377.

Ruf S., Hermann M., Berger I.J. et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nature Biotechnol. 2001. Vol. 19. P. 870—875.

Ruf S., Kössel H., Bock R. Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded Photosystem I — related gene// J. Cell Biol. 1997. Vol. 139. P. 95—102.

Serino G., Maliga P. A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids // Plant J. 1997. Vol.12. P. 697—701.

Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.-Z. et al. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. 1999. Vol. 19. P. 209—216.

Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Rep. 1998. Vol. 18. P. 20—24.

Staub J.M., Garcia B., Graves J. et al. High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // Nat. Biotechnol. 2000. Vol. 18. P. 333—338.

Staub J.M., Maliga P. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the 5'-untranslated region of the psbA mRNA // EMBO J. 1993. Vol. 12. P. 601—606.

Staub J.M., Maliga P. Translation of the psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids // Plant J. 1994. Vol. 6. P. 547—553.

Staub J.M., Maliga P. Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids // Plant J. 1995. Vol. 7. P. 845—848.

Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1990. Vol. 87. P. 8526—8530.

Svab Z., Maliga P. Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin // Mol. Gen. Gen. 1991. Vol. 228. P. 316—319.

Svab Z., Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1993. Vol. 90. P. 913—917.

Takahashi Y., Rahire M., Breyton C. et al. The chloroplast ycf7 (petL) open reading frame of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a small functionally important subunit of the cytochrome b_6/f complex // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 3498—3506.

Wakasugi T., Nagai T., Kapoor M. et al. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from green alga *Chlorella vulgaris:* the existence of genes possibly involved in chloroplast division // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 5967—5972.

Zhang X.-H., Brotherton J.E., Widholm J.M., Portis A.R. Targeting a nuclear anthranilate synthase α-subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan biosynthesis. Return of a gene to its pre-endosymbiotic origin // Plant Physiol. 2001. Vol. 127. P. 131—141.

Zhu Y.S., Lovett P.S., Williams D.M., Kung S.D. Nicotiana chloroplast genome. 7. Expression in *E. coli* and *B. subtilis* of tobacco and *Chlamydomonas* chloroplast DNA sequences coding for large subunit of RuBP carboxylase // Theor. Appl. Gen. 1984. Vol. 67. P. 333—336.

Zoubenko O.V., Allison L.A., Svab Z., Maliga P. Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome //Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 3819—3824.

Глава 14

Митохондриальный геном человека и проблемы медицинской генетики

В 1988 г. опубликованы первые работы, в которых показана связь определенных митохондриальных ДНК-мутаций с рядом заболеваний у человека [Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988]. К моменту написания этой главы известно уже более 110 патогенных точечных мутаций и около 200 делеций, инсерций и других структурных реорганизаций мтДНК человека, для которых показаны корреляции с различными клиническими фенотипами [Larsson, Clayton, 1995; Cottrell et al., 2000; Naviaux, 2000; Schon, 2000]. Реорганизации митохондриального генома обнаружены также при старении организма [Michikawa et al., 1999; Cottrell et al., 2000; Lee, Wei, 2001; Wallace, 2001] и при злокачественном перерождении тканей [Fliss et al., 2000; Penta et al., 2001; Jones et al., 2001; Tan et al., 2002]. Все эти проблемы, а также возможности прогнозирования и лечения заболеваний, связанных с аномалиями митохондриального генома, — предмет изучения "митохондриальной медицины". Сформировавшись как самостоятельное направление в конце XX столетия, сегодня она представляет наиболее интенсивно развивающуюся область исследования генетики клеточных органелл.

Особенности митохондриальной генетики и проявление патологий

Митохондрии в клетках и в организме подчиняются законам популяционной генетики. При анализе этиологии и патогенеза митохондриальных заболеваний [Schon, 2000] необходимо учитывать следующее:

- материнское наследование;
- множественность органелл в клетке (сотни) и мультикопийность митохондриальных геномов (тысячи);
- новые мутации могут возникать в отдельных молекулах мтДНК, что приведет к гетероплазмии, т.е. к сосуществованию в организме и даже в клетке двух или более митохондриальных генотипов;
- если мутация патогенная, доля мутантных молекул в гетероплазматической популяции влияет на тяжесть биохимического нарушения, но наблюдаемая зависимость не всегда является линейной;
- митохондриальная ДНК реплицируется и наследуется в ряду клеточных поколений по стохастическим законам, поэтому возможна митотическая сегрегация как в пользу мутантных, так и нормальных мтДНК;
- поскольку клетки разных тканей характеризуются различным минимальным уровнем энергозатрат (порог), локализация клеток с мутантными

мтДНК, уровень гетероплазмии и динамика митотической сегрегации определяют клиническое течение болезни и ее исход.

Напомним, что 13 белков, 2 рРНК и 22 тРНК, кодируемых митохондриальной ДНК, составляют лишь небольшую фракцию по сравнению с более чем 1000 белков ядерного кодирования, образующих различные компоненты митохондрий, а также участвующих в репликации, транскрипции, процессинге, трансляции мтДНК, импорте биомолекул через мембраны митохондрий и т.д. Мутации всех этих ядерных генов тоже могут вызывать разнообразные митохондриальные дисфункции. На рис. 14.1 приведен перечень заболеваний, вызванных мутациями как митохондриальных, так и ядерных генов, кодирующих белки системы дыхания-окислительного фосфорилирования [Schon, 2000]. Предметом обсуждения в данной главе являются дисфункции, связанные с мутациями митохондриального генома.

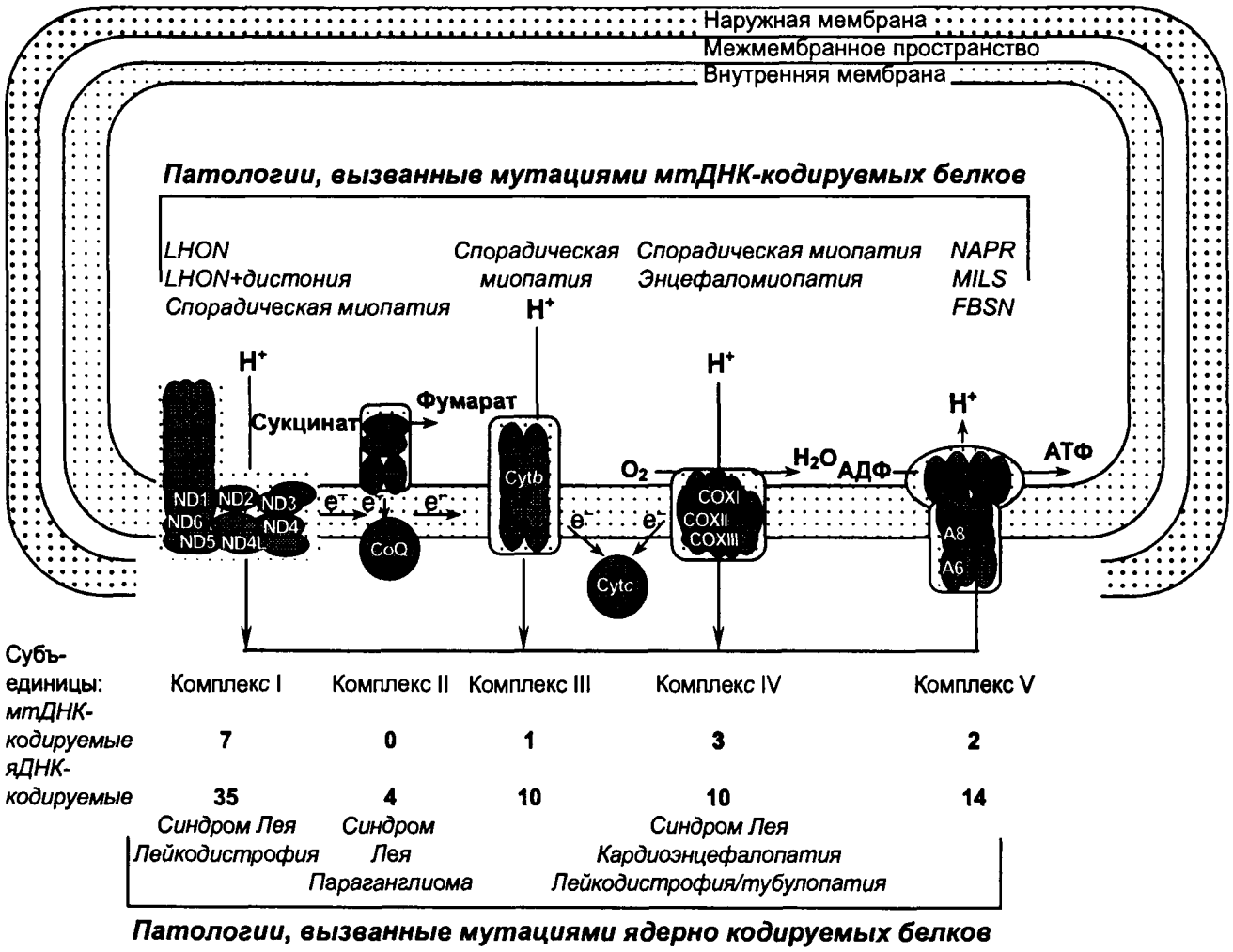


Рис.14.1. Заболевания, ассоциирующиеся со специфическими дефектами цепи дыхания — окислительного фосфорилирования. Комплексы состоят из ядерно- и митохондриально-кодируемых (отмечены) субъединиц. Отдельно указаны заболевания, связанные с соответствующими комплексами и вызванные мутациями разной локализации [по Schon, 2000]

Кардинальные изменения в регуляторных участках кольцевой молекулы мтДНК приводят к нарушению репликации мтДНК, транскрипции и процессинга митохондриальных транскриптов. Очевидно, что любые мутации, связанные с нарушением репликации либо экспрессии митохондриального генома, в мультикопийной генетической системе будут подвергаться негативному отбору и устраняться из популяции. Однако полная утрата какой-либо из митохондриальных тРНК или рРНК вызовет прекращение белкового синтеза в митохондриях; в гомозиготном состоянии такая мутация является летальной на ранних этапах эмбриогенеза [Larsson, Clayton, 1995]. Более "мягкие" мутации, вызывающие изменение стабильности тРНК или рРНК, частичное нарушение взаимодействия тРНК с рибосомами или с аминокислотами, приводят к аномалиям в синтезе белков с митохондриальных РНК-матриц и вызывают функциональную недостаточность дыхательной цепи [Larsson, Clayton, 1995].

Проявление мутаций мтДНК тканеспецифично: сердце, мышцы и мозг являются наиболее зависимыми от аномалий процесса окислительного фосфорилирования, с этим связаны особенности большинства "митохондриальных" синдромов [Cottrell et al., 2000; Schon, 2000].

Крупные делеции и дупликации митохондриальных ДНК человека

В митохондриальном геноме человека обнаружен ряд единичных делеций размером от 1 до 10 т.п.н. [Holt et al., 1988; Zeviani et al., 1988; Ballinger et al., 1992; Tang et al., 2000a]. Оказалось, что почти треть пациентов с делециями мтДНК утрачивают один и тот же участок митохондриального генома размером 4977 п.н., несут так называемую обычную ("common") делецию. Она фланкирована двумя прямыми повторами размером 13 п.н., что является одним из признаков "горячих точек" мтДНК (главы 6, 9), и расположена между генами *atp8* и *nad5*. Все макроделеции, найденные в мтДНК человека, разделяются на две группы: 1) имеющие короткие прямые повторы в точках разрыва ДНК молекулы; 2) не имеющие таких повторов [Mita et al., 1990; Larsson, Clayton, 1995; Schon, 2000].

У пациентов, несущих делеции митохондриальной ДНК, обнаруживаются часто также мтДНК с дупликациями. Описана реорганизация генома, в результате которой объединяются интактная молекула мтДНК — 16,6 т.п.н. с молекулой, несущей делецию — 11,6 т.п.н., при этом образуются кольцевые молекулы размером 28,2 т.п.н. (рис. 14.2) [Schon, 2000]. Аналогичные перестройки генома митохондрий, сочетающие делеции с дупликациями,

показаны и в других исследованиях [Poulton et al., 1993; Cormier-Daire et al., 1994]. Очевидно, в основе таких реорганизаций лежит процесс рекомбинации ДНК, хотя вероятность его в митохондриальном геноме млекопитающих остается дискуссионной [Holt et al., 1997; Awadalla et al., 1999; Tang et al., 2000a]. Патогенность дуплицированных мтДНК маловероятна, однако они могут участвовать в рекомбинациях с образованием делетированных молекул, вызывающих различные аномалии [Tang et al., 2000b]. Описан феномен частичной трипликации митохондриального генома [Tengan, Moraes, 1998].

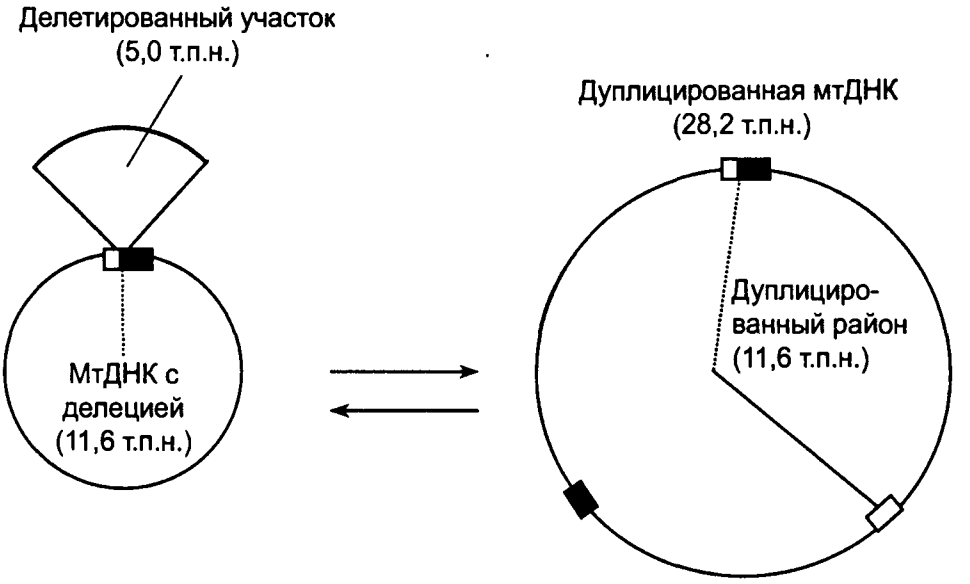


Рис. 14.2. Типичная крупномасштабная реорганизация ДНК ("common deletion"), при которой теряется 4977 п.н. между генами ATPase8 (черный прямоугольник) и ND5 (светлый прямоугольник); отражена связь между частично делетированными и частично дуплицированными молекулами [по Schon, 2000]

Патогенность крупных делеций связывают прежде всего с утратой генов сразу нескольких тРНК, что приводит к нарушению трансляции практически всего митохондриального генома. Так, при упомянутой выше делеции 4977 п.н. утрачиваются гены тРНК, расположенные между *atp8* и *nad5* (см. рис. 6.7). С данной делецией связаны сразу три синдрома [Schon, 2000] :

• синдром Кернс-Сейра (KSS) — фатальная мультисистемная патология, проявляющаяся в возрасте 4—18 лет пигментным ретинитом, атаксией, атриовентрикулярной блокадой сердца, повышением уровня белка в цереброспинальной жидкости, появлением "рваных" волокон в скелетных мышцах и др.;

• прогрессирующая наружная офтальмоплегия (PEO) — миопатия, характеризующаяся параличом наружных глазодвигательных мышц;

• синдром Пирсона (PS) — гипопластическая анемия, нарушение экзокринной функции поджелудочной железы.

Все три синдрома являются спорадическими, т.е. матери и другие дети тех же родителей остаются здоровыми. Митохондриальные ДНК больных характеризуются гетероплазмией: делетированные молекулы присутствуют в тканях наряду с нормальными. Как объяснить различные клинические проявления одной и той же мутации? В первом случае заболевание мультисистемное, во втором оно затрагивает преимущественно скелетную мускулатуру, в третьем в основном нарушен гемопоэз. У каждого пациента обнаруживаются мутантные молекулы одного определенного типа. Это свидетельствует о том, что причиной заболевания является единичная спонтанная делеция, происходящая рано в оогенезе или эмбриогенезе. Как показано, до начала дифференциации зародышевых слоев митохондриальная ДНК не реплицируется [Schon, 2000]. Если мутантная мтДНК по воле случая распределится равномерно между клетками всех зародышевых слоев, разовьется скорее всего мультисистемный синдром KSS; неравномерная сегрегация с накоплением мутантных мтДНК в клетках костного мозга может дать начало синдрому PS, сегрегация исключительно в мышцы приведет к формированию PEO [Schon, 1997, 2000].

Клинические фенотипы, связанные с реорганизацией митохондриальной ДНК, включают также почечную тубулопатию, мозжечковую атаксию, диабет, глухоту и др. [Rötig et al., 1992; Ballinger et al., 1994].

Возникнув первоначально в результате мутации, единичная молекула мтДНК с делецией амплифицируется, приводя к появлению триллионов аномальных ДНК у больных с клиническими синдромами. Как происходит эта избирательная амплификация? С одной стороны, было показано, что более короткие молекулы мтДНК быстрее реплицируются, получая за счет этого преимущество перед молекулами дикого типа [Tang et al., 2000b]. Другим фактором, по мнению некоторых исследователей, являются пока неизвестные специальные "ретроградные" сигналы, направляемые в ядро из мутантных митохондрий, что приводит к более быстрой репликации органелл вместе с мутантными мтДНК [Schon, 2000]. Именно пролиферация дефектных митохондрий (особенно в мышцах) в значительно большей степени, чем присутствие мутантной ДНК в них, приводит к гибели больного. Определение природы сигналов, ответственных за пролиферацию митохондрий, необходимо для выработки стратегии лечения [Walker, Schon, 1998].

Кроме перечисленных синдромов, накопление крупных делеций в мтДНК отмечено при старении [Soong et al., 1992; Haykawa et al., 1992], обнаружены также молекулы ДНК с протяженными дупликациями [Bodyak et al., 2001].

Множественные делеции. Истощение митохондриальной ДНК

Множественные митохондриальные делеции были обнаружены в ДНК пациентов с митохондриальной нейрогастроинтестинальной (*neurogastrointestinal*) энцефаломиопатией (MNGIE), прогрессивной наружной офтальмоплегией (PEO) и рядом других симптомов [Larsson, Clayton, 1995; Larsson, Luft, 1999]. В этих случаях дефект наследовался по менделевскому типу как аутосомный рецессивный ген, т.е. его первопричина находилась вне митохондриальной ДНК.

Во многих описанных случаях в семьях пациентов, происходящих из самых разных этнических групп, был обнаружен дефектный ядерный ген тимидинфосфорилазы (хромосома 22q13.32-qter). Тимидинфосфорилаза катализирует реакцию превращения тимидина в тимин. У 15 исследованных больных с синдромом MNGIE уровень тимидина в плазме был повышен в 20 и более раз по сравнению с контрольным. Вероятно, нарушенный метаболизм тимидина приводит к нестабильности мтДНК [Hirano et al., 1998; Nishino et al., 1999]. У других пациентов гены, ответственные за множественные мтДНК делеции, пока не выявлены [Larsson, Luft, 1999].

Интересны данные, полученные при анализе митохондриального белка ядерного кодирования Twinkle, структурно похожего на ген 4 праймазу/хеликазу фага T7. Белок Twinkle локализуется совместно с митохондриальной ДНК в нуклеоидах, участвуя в поддержании целостности митохондриального генома. Был проведен скрининг гена *Twinkle* у больных аутосомной доминантной прогрессирующей наружной офтальмоплегией (PEO) и представителей их 12 родословных различного этнического происхождения. В результате удалось выявить 11 различных мутаций в кодирующих областях гена, которые приводят к множественным делециям мтДНК [Spelbrink et al., 2001].

Тяжелые клинические последствия имеет процесс почти полной утраты клеткой митохондриальной ДНК — так называемый синдром мтДНК деплеции (MDS) [Moraes et al., 1991]. При этом в клетках остается 1 — 30% нормального количества молекул митохондриальной ДНК. Синдром деплеции также наследуется по аутосомно-рецессивному типу, мутирующий при этом ген (гены) пока окончательно не установлен [Larsson, Luft, 1999]; скорее всего им окажется ядерный ген, кодирующий ДНК-полимеразу гамма. При трансплантации *in vitro* ядер из нормальных клеток в клетки с деплецией митохондриального генома восстанавливается нормальный уровень молекул мтДНК, что доказывает ядерную локализацию данной мутации [Bodnar et al., 1993].

Синдром проявляется в первые недели после рождения; деплеция митохондриальной ДНК была даже обнаружена в клетках амниотической жидкости плода [Blake et al., 1999]. Новорожденные страдают множественными нарушениями: фатальная гепатопатия, врожденная или возникающая в первые два года жизни миопатия с генерализованной гипотонией, кардиомиопатией и судорогами (синдром Де Тони-Дебре-Фанкони), атрофией проксимальных групп мышц и утратой сухожильных рефлексов [ИМС Невронет. Школа невролога]. В тяжелых случаях смерть наступает в первый год жизни [Moraes et al., 1991]; даже при менее массированной деплеции течение болезни быстропрогрессирующее, с летальным исходом в первые три года жизни [ИМС Невронет. Школа невролога].

Косвенным доказательством участия в деплеции митохондриальной ДНК ДНК-полимеразы γ является индуцирование мтДНК-истощения под воздействием некоторых экологически токсических веществ. Так, азидотимидин ингибирует репликацию митохондриального генома ДНК-полимеразой γ [Schon, 2000].

Оказалось, что некоторые противовирусные препараты, применяемые, в частности, для лечения больных СПИДом, такие, как 2′3′-дидеоксицитидин (ddC), индуцируют периферическую невропатию у 30% больных. Причиной данного побочного эффекта препарата, вероятно, является 80%-ная деплеция мтДНК аксонов и шванновских клеток. Действительно, *in vitro* ddC избирательно ингибировал γ-ДНК полимеразу в нервных клетках. Токсичность ddC и других противовирусных препаратов, а также ряда экзогенных экологических токсинов была показана для митохондрий клеток периферической нервной системы и периферической крови [Dalakas et al., 2001; Cote et al., 2002].

Некоторые фармакологические препараты вызывают деплецию мтДНК иными путями: ингибируя топоизомеразу типа II, интеркалируя в ДНК-спираль либо еще каким-то образом нарушая метаболизм мтДНК [Rowe et al., 2001].

Недавно описан клинический случай деплеции, при котором в митохондриальной ДНК матери и других членов семьи обнаружены три точечные мутации в области D-петли. Две из этих мутаций (T119C и T408A) затрагивают консервативные участки, связанные с репликацией мтДНК. Данные мутации были неслучайно распределены в родословной матери. Возможно, в данном случае причина деплеции мтДНК заключена в самом митохондриальном геноме [Barthelemy et al., 2002].

Точечные мутации митохондриальных ДНК

13 белок-кодирующих митохондриальных генов занимают примерно 77% кодирующих последовательностей мтДНК; на долю двух генов рРНК приходится 14%, а 22 гена тРНК составляют 9% митохондриальной ДНК человека. Однако из 110 патогенных точечных мутаций, описанных к 2000 г., 2/3 расположены в генах, участвующих в процессах трансляции, причем подавляющее большинство — в молекулах тРНК [Schon, 2000]. При сканировании митохондриального генома 180 пациентов на наличие точечных мутаций также оказалось, что частота мутаций в тРНК генах в 2,4 раза выше, чем в белок-кодирующих генах [Wong et al., 2002]. Следует подчеркнуть, что подавляющее большинство исследованных до сих пор мутаций митохондриальных генов тРНК являются рецессивными: биохимическая дисфункция проявляется лишь тогда, когда уровень немутантных мтДНК падает ниже 30% [Cottrell et al., 2000].

Мутации генов рибосомальных РНК

Известно пять мутаций генов рибосомальной РНК митохондрий, все они вызывают тканеспецифические эффекты. Наиболее часто встречается мутация гена 12S рРНК A1555G. Она находится в высококонсервативной области гена РНК малой субъединицы рибосомы и вызывает врожденную несиндромную потерю слуха [Prezant et al., 1993; Fischel-Ghodsian, 1999]. В результате этой мутации изменяется аминогликозид-связывающий сайт 12S рРНК, вследствие чего пациенты становятся чувствительными к находящимся во внешней среде ототоксическим аминогликозидам [Chinnery et al., 1999]. Еще четыре мутации генов 12S и 16S рРНК вызывают кардиомиопатию [Schon, 2000].

Мутации генов транспортных РНК

Мутации лейциновой тРНК. Наиболее часто встречающаяся точечная мутация тРНК — транзиция в лейциновой тРНК (UUR) с заменой аденина на гуанин в 3243-м нуклеотиде (A3243G). Данная мутация была обнаружена у большинства больных с синдромом MELAS (митохондриальная миопатия, энцефалопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобные — "stroke-like" — случаи). Мутация встречается исключительно в гетероплазматическом состоянии; в зависимости от частоты мутантных мтДНК в разных тканях изменяется проявление синдромов [Goto et al., 1990; Moraes et al., 1992; Hirano et al., 2002].

Мутация A3243G изменяет высококонсервативный нуклеотид на ди-

гидроуридиновой петле молекулы тРНК, а также нарушает 30-членную последовательность, терминирующую транскрипцию и находящуюся в гене тРНК$^{Leu(UUR)}$. Эта последовательность участвует в связывании фактора терминации транскрипции, mtTERM; установлено, что мутация A3243G нарушает терминацию транскрипции *in vitro,* но не *in vivo* [Chomyn et al., 1992; 2000]. Седиментационный анализ в градиенте плотности сахарозы показал, что в клетках — носителях мутации нарушена связь молекул мРНК с полисомами, вероятно, из-за дефекта аминоацилирования мутантной тРНК $^{Leu(UUR)}$ [Chomyn et al., 2000]. Ряд других точечных мутаций, обнаруженных в гене тРНК$^{Leu(UUR)}$, приведен в табл. 14.1.

Таблица 14.1

Фенотипы, связанные с мутациями генов тРНК митохондрий [по Larsson, Clayton, 1995; Grasso et al., 2001]

Мутация	тРНК ген	Фенотип
A3243G	Leu(UUR)	MELAS, PEO, диабет mellitus, нередко гломерулосклероз
T3250C	Leu(UUR)	Миопатия
A3251G	Leu(UUR)	PEO, миопатия, внезапная смерть
A3252G	Leu(UUR)	Энцефалопатия, диабет mellitus
C3256T	Leu(UUR)	PEO, мультисистемное расстройство
A3260G	Leu(UUR)	Миопатия, кардиомиопатия
T3271C	Leu(UUR)	MELAS
T3291C	Leu(UUR)	MELAS
A3302G	Leu(UUR)	Миопатия
C3303T	Leu(UUR)	Кардиомиопатия
A4269G	Ile	Кардиомиопатия, мультисистемное расстройство
T5692C	Asn	PEO
G5703A	Asn	Миопатия, PEO
T5814C	Cys	Энцефалопатия
A8344G	Lys	MERRF, липомы
T8356C	Lys	MERRF
T9997C	Gly	Кардиомиопатия
A10006G	Gly	PEO
C12246A	Ser(AGY)	PEO
T12297C	Leu(CUN)	Прогрессирующая гипертрофическая кардиомиопатия
A12308G	Leu(CUN)	Дисфункции миокарда
T14709C	Glu	Миопатия, диабет mellitus
A15923G	Thr	Фатальное инфантильное мультисистемное расстройство
C15990T	Pro	Миопатия

Следует отметить, что в одной семье мутация A3243G преимущественно вызывает диабет и глухоту, в другой — кардиомиопатию, в третьей — CPEO, в четвертой — энцефаломиопатию. Такие корреляции трудно объяснить лишь на основе тканеспецифических вариаций в сегрегации. Фенотипические последствия мутации зависят, вероятно, также от ядерного генома конкретного носителя и от его взаимодействия с мутантной мтДНК [Chinnery et al., 1999].

Мутации лизиновой тРНК. У большинства пациентов с синдромом MERRF (миоклонус-эпилепсия, "рваные" красные мышечные волокна, задержка умственного развития, атаксия, атрофия мышц и др.) обнаружена гетероплазматическая транзиция A8344G в гене $тРНК^{Lys}$. Дисфункция дыхательной цепи проявляется при очень высоком уровне мутантных молекул в клетках — не менее 85—90%. Матери пациентов с синдромом MERRF несут значительно менее выраженные синдромы либо фенотипически являются здоровыми [Larsson, Clayton, 1995].

Мутация A8344G изменяет высококонсервативный нуклеотид TψC-петли лизиновой тРНК и, ингибируя митохондриальный синтез белков, провоцирует дисфункцию цепи дыхания-окислительного фосфорилирования. Показано также, что мутация вызывает дефект аминоацилирования $тРНК^{Lys}$ и преждевременное прекращение митохондриальной трансляции [Larsson, Clayton, 1995; Enriques et al., 1995]. Более поздние исследования по связыванию с рибосомами *in vitro* обнаружили, что мутантная $тРНК^{Lys}$ неспособна к нормальному кодон-антикодоновому взаимодействию, что приводит к резкому снижению эффективности трансляции [Yasukawa et al., 2001].

У некоторых пациентов с мутацией A8344G были обнаружены множественные симметричные липомы на шее, которые содержали более высокий уровень мутантной мтДНК, чем окружающие жировые ткани, и, возможно, являлись первым проявлением мутантного фенотипа [Holme et al., 1993]. Реже встречается вторая мутация гена лизиновой тРНК: T→ C транзиция нуклеотида 8356 (T8356C), которая разрушает высококонсервативную пару комплементарных оснований TψC-петли. Данная мутация также ингибирует белковый синтез в митохондриях и вызывает дефицит дыхательной цепи (табл. 14.1) [Larsson, Clayton, 1995].

Мутации других тРНК. Основная часть обнаруженных мутаций тРНК генов является транзициями и трансверсиями (табл. 14.1). Одно из немногих исключений — тимидиновая инсерция в гене триптофановой тРНК (T5537i), выявленная в семье, пробанд которой страдал прогрессирующим неврологическим заболеванием, а его брат скончался в детском возрасте от синдрома Лея. Новая мутация T5537i обнаруживалась с очень большой частотой в тканях пробанда и умершего брата (>92%), с меньшей частотой

(42—89%) — у четырех родственников по материнской линии. Степень гетероплазмии в крови коррелировала с выраженностью клинических симптомов [Santorelli et al., 1997].

Транзиция еще одного лейцинового гена тРНК$^{Leu(CUN)}$ — T12297C — была обнаружена у больного с прогрессирующей гипертрофической кардиомиопатией [Grasso et al., 2001]. Мутантная ДНК в клетках миокарда составляла 88%, данная мутация не обнаружена ни у одного из контрольных обследованных (120 здоровых и 150 больных). Мутация затрагивает высококонсервативный нуклеотид, примыкающий к антикодоновому триплету, который позволяет рибозофосфатному скелету поворачиваться и образовывать петлю. В том же районе тРНК$^{Leu(CUN)}$ у другого пациента обнаружена еще одна мутация A12308G, также приводящая к митохондриальным дисфункциям в миокарде [Grasso et al., 2001].

В клеточных линиях *in vitro,* несущих мутации тРНК^{Lys}A8344G, тРНК $^{Leu(UUR)}$C3256T, тРНК^{Asn}G5703A, уровень данных транспортных РНК был существенно снижен, что свидетельствует о повышенной чувствительности их к нуклеолитической деградации [Taanman, 1999].

Необычной тканеспецифичностью обладают некоторые мутации генов тРНК, по крайней мере в проявлении аномалий. Так, мутации различных генов тРНК связаны с кардиомиопатиями (табл.14.1). Необъяснимой является предрасположенность у мутаций тРНК^{Ile} к формированию гипертрофической кардиомиопатии, а у мутаций тРНК$^{Ser(UCN)}$ к индуцированию глухоты, хотя в других непораженных тканях также отмечается высокий процент мутантных мтДНК молекул [Schon, 2000].

Для того чтобы определить, является ли вновь обнаруженная в мтДНК мутация патогенной, применяют целый ряд критериев [Larsson, Clayton, 1995; Chinnery et al.,1999]:

• мутация изменяет высококонсервативное основание или нарушает комплементарность консервативной пары;

• мутация отсутствует в контрольных митохондриальных геномах, которых должно быть как можно больше и которые по возможности должны быть как можно ближе к мутантной мтДНК;

• мутация обнаруживается в нескольких генеалогических группах со сходными фенотипами;

• имеется корреляция между уровнем мутировавшей мтДНК и выраженностью симптомов;

• мутация гетероплазматична (гомоплазмия по ней несовместима с жизнью);

• имеется корреляция между относительным количеством мутировавшей мтДНК и выраженностью нарушений: а) в разных тканях, б) в отдельных мышечных фибриллах; в) в клоне цибридных клеток;

• мутантная мтДНК способна индуцировать недостаточность дыхательной цепи в цибридной клеточной линии.

Не всегда удается показать, что изучаемая новая мтДНК мутация удовлетворяет всем или большинству перечисленных критериев [Kato et al., 2001; Tessa et al., 2001; Aggarwal et al., 2001]. Прямым доказательством патогенности мутации явилось бы введение мутантных мтДНК молекул в животное с получением соответствующих фенотипических эффектов [Larsson, Clayton, 1995]. Сообщения о создании первых трансмитохондриальных мышей [Sligh et al., 2000; Hirano, 2001] позволяют в перспективе надеяться на решение этой проблемы.

Мутации белок-кодирующих генов

Мутации генов комплекса I. Самый крупный из пяти комплексов цепи дыхания — окислительного фосфорилирования комплекс I состоит из 42 белковых субъединиц, семь из которых контролируются мтДНК (см. рис. 14.1). Известно уже 10 мутаций *ND*- генов, практически все они связаны с синдромом Лебера (LHON — **L**eber **h**eredity **o**ptic **n**europathy) — наследуемой по материнской линии потерей зрения (табл.14.2). При данном заболевании у людей 20—30 лет происходит подострая потеря центрального зрения из-за атрофии зрительных нервов и дегенерации ганглиозного слоя клеток ретины [Man et al., 2002].

Описанный Т.Лебером еще в 1871 г. синдром имеет ряд особенностей — неменделевский тип наследования, поражение в основном мужчин (80—

Таблица 14.2

Обнаруженные патогенные первичные мутации мтДНК при синдроме Лебера LHON [по Man et al., 2002]

Мутации		Белок	Относительная распространенность
Обычные (> 95%)	G3460A	ND1	13%
	G11778A	ND4	69%
	T14484C	ND6	14%
Редкие (<5%)	G13730A	ND5	
	G14459A	ND6	
	C14482G	ND6	
	A14495G	ND6	
	C14498T	ND6	
	C14568T	ND6	
	T14596A	ND6	

85%), проявление болезни обычно в молодом возрасте. В дальнейшем было обнаружено, что в 95% случаев причиной заболевания являются три митохондриальные мутации в генах *ND1, ND4* и *ND6* (табл.14.2). Семь других мутаций (в основном в гене *ND6*) встречаются гораздо реже [Man et al., 2002]. Недавно с помощью белкового моделирования показано, что все мутации в *ND6* расположены близко друг от друга в гидрофобном "кармане" [Chinnery et al., 2001b].

Кроме 10 перечисленных мутаций мтДНК у пациентов с LHON (табл.14.2) обнаружены еще так называемые "вторичные" мутации митохондриального генома: T4216C, A4917G, G9804A, G9438A, G13708A, G15257A и G15812A [Johns, Berman, 1991; Johns, Neufeld, 1993]. Эти нуклеотидные замены встречаются у больных с LHON гораздо чаще, чем в контрольных группах, и, по мнению некоторых исследователей, усиливают действие первичных мутаций, увеличивая риск проявления заболевания. Интересно, что четыре из этих "вторичных" мутаций, так же как и две основные "первичные" (T14484C и в меньшей степени G11778A), встречаются преимущественно в одной из девяти европейских гаплогрупп мтДНК — группе J ("джей") [Man et al., 2002].

Распространенность отдельных мутаций комплекса I зависит от географического расселения исследуемой популяции: так, транзиция G11778A, встречающаяся в родословных больных с синдромом LHON в Европе и Австралии с частотой 69% [Man et al., 2002], в Японии составляет 90% [Mashima et al., 1998]. Сравнительно редкая в большинстве стран мутация T14484C (14%) наиболее часто встречается среди канадцев французского происхождения (87%) — в данном случае, очевидно, сыграл свою роль эффект родоначальника [Macmillan et al., 2000].

LHON — наиболее распространенное митохондриальное генетическое заболевание из всех известных в настоящее время. Частота встречаемости его в британской популяции — 1 на 25000; среди всех внесенных в регистр незрячих Австралии 2% составляют пациенты с LHON [Man et al., 2002]. Весьма интригующим является тот факт, что лишь у 50% мужчин и 10% женщин — носителей патогенных мутаций комплекса I в действительности развивается оптическая невропатия и происходит потеря зрения. Возможно, в становлении заболевания участвуют какие-то дополнительные факторы, природа которых пока неясна [Chinnery et al., 1999; Man et al., 2002]. Попытка идентифицировать имеющий отношение к LHON локус на X-хромосоме не увенчалась успехом [Pegoraro et al., 1996].

Три основные мутации, приводящие к синдрому Лебера, возникали множество раз независимо [Brown et al., 1995]. В большинстве случаев мутация обнаруживалась в родословных в гомоплазменном состоянии, т.е. все мито-

хондриальные ДНК несли мутантный аллель [Harding et al., 1995]. Однако 10—15% носителей LHON характеризуются гетероплазмией. Вероятно, это может быть одной из причин неполной пенетрантности мутации: при частоте мутантных мтДНК меньше 60% риск потери зрения минимален [Chinnery et al., 2001a].

Мутации генов комплекса III. Из 11 белков комплекса III лишь цитохром *b* (cyt *b*) кодируется митохондриальной ДНК (см. рис. 14.1). К настоящему времени обнаружено 12 патогенных мутаций *cyt b* гена; все они являются спорадическими, т.е. вновь возникшими, и фенотипически представляют собой миопатии [Di Mauro, Andreu, 2000]. Локализация мутаций преимущественно в мышечной ткани, возможно, связана с тем, что при возникновении в эмбриогенезе в немышечных тканях они оказываются летальными для плода [Schon, 2000].

Мутации генов комплекса IV. Три самые крупные субъединицы цитохром *c* оксидазного комплекса кодируются митохондриальным геномом (рис.14.1). Большинство мутаций, обнаруженных в этих генах, являются спорадическими и приводят к трем различным аномалиям: миопатии, энцефаломиопатии и сидеробластной анемии.

Мутации генов комплекса V. АТФ-синтазный комплекс содержит две митохондриально кодируемые субъединицы. Патогенные мутации были обнаружены пока лишь в одной из них — *atp6*. Наследуемый по материнской линии синдром Лея — MILS (**m**aternal **i**nherited **L**eigh **s**yndrome) связан с одной из двух мутаций: T8993G и T8993C [Schon, 2000].

В случае первой мутации происходит превращение лейцина в аргинин, в случае второй — в пролин [Holt et al., 1990; de Vries et al., 1993]. MILS развивается, если мутантные ДНК составляют более 90% от всех молекул мтДНК (энцефалопатия, мышечная гипотония, атаксия, нистагм, офтальмоплегия, атрофия зрительных нервов и др.). Если аномальные мтДНК, несущие любую из двух мутаций, составляют в клетках от 70 до 90%, развивается совершенно другой синдром — NAPR (**н**европатия, **а**таксия, **п**игментный **р**етинит). Матери пациентов, несущие менее 70% мутантных мтДНК в клетках крови (вероятно, и мозга), либо бессимптомны, либо проявляющиеся у них симптомы минимальны [Schon, 2000].

Относительно небольшие различия в количестве мутантных ДНК в общем пуле митохондриальных геномов определяют, будет ли носитель мутации страдать фатальным фенотипом MILS, гораздо менее серьезными аномалиями NAPR или будет фенотипически здоровым. На основе этого был предложен оригинальный подход к лечению таких заболеваний: с помощью антибиотика олигомицина удалось уменьшить число патогенных мутантных молекул в клетке и облегчить течение заболевания [Manfredi et al., 1999].

Оригинальный метод генной терапии митохондриального дефекта T8993G был недавно предложен в отделе генной терапии одного из биотехнологических центров Японии. Нуклеотидная T—G-замена в положении 8993 создает в мутантной митохондриальной ДНК сайт узнавания эндонуклеазой *SmaI*, тогда как в неизмененной мтДНК нет рестриктных сайтов для этого фермента. Ген *SmaI* с митохондриальной направляющей последовательностью был экспрессирован в цибридных клетках; образующийся фермент избирательно элиминировал мутантную ДНК в гетероплазматических клетках. Процесс сопровождался "репопуляцией" митохондрий неповрежденными молекулами митохондриальной ДНК [Tanaka et al., 2002].

Митохондриальная ДНК — мишень для мутаций и дисфункций

Высокая мутабильность митохондриальной ДНК связана, с одной стороны, с особенностями ее организации: геном не защищен гистоновыми белками, репарационные процессы не так многообразны, как в ядре — в частности, до сих пор не показана эксцизионная репарация нуклеотидов [Croteau et al., 1999]. В то же время митохондрии являются "зоной повышенной опасности": они поглощают более 90% кислорода, попадающего в клетку, и дыхательная цепь образует при функционировании большое количество ДНК-повреждающих свободных радикалов [Larsson, Clayton, 1995; Howell, 1999].

Аккумулируя точечные мутации почти в десять раз быстрее, чем ядерная [Richter et al.,1988; Cottrell et al., 2000], митохондриальная ДНК любого представителя незамкнутой популяции отличается от мтДНК другого человека в среднем на 25 нуклеотидных замен, которые не всегда являются патологическими, а часто представляют результат полиморфизма [Chinnery et al., 1999; Malyarchuk et al., 2002]. Этот полиморфизм создает объективные трудности в выяснении истинной роли мтДНК в патогенезе, его следует учитывать при любом исследовании митохондриального генома. Кроме того, на проявления дефекта митохондриального генома, как было видно из многих приведенных примеров, оказывают влияние также генотип ядра и внешние условия (рис. 14.3).

Патологии с неустановленными причинами митохондриальных дисфункций

Известен целый ряд нейродегенеративных заболеваний с дисфункциями митохондрий, первопричина которых, однако, до сих пор не установлена [Schapira, 2002].

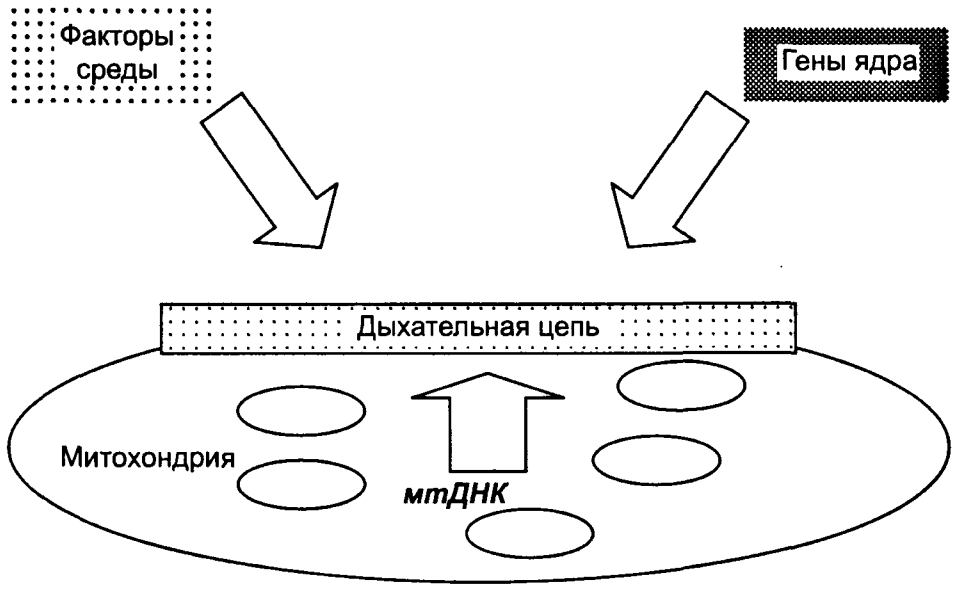


Рис.14.3. Дефекты митохондриальной ДНК не проявляются изолированно. На экспрессию генома митохондрий и функцию дыхательной цепи влияет также генотип ядра и факторы внешней среды [по Chinnery et al., 1999]

Так, эпидемиологические исследования показывают, что риск развития нейродегенеративных патологий — болезни Альцгеймера (АБ) или Паркинсона (ПБ) выше в потомстве больных матерей, чем больных отцов [Edland et al., 1996; Wooten et al., 1997]. Для объяснения этого феномена кроме предположения об аномалиях в мтДНК могут быть выдвинуты и другие гипотезы (например, о связи заболевания с Х-хромосомой). Полученные данные о наличии у больных АБ и ПБ специфических дефектов дыхательной цепи [Mutisya et al., 1994; Mizuno et al., 1995; Molina et al., 1997] другими исследователями не подтверждаются [Hutchin et al., 1997]. При сравнительном анализе мтДНК в случае нейродегенеративных заболеваний достаточно сложен вопрос о контрольной группе, так как болезнь у любого представителя контрольной группы может развиться позже, также не исключены субклинические случаи [Chinnery et al., 1999].

У больных с ПБ обнаружен дефект ферментов митохондриального комплекса I, причем исследования по геномной трансплантации показали, что дефект этот локализован в мтДНК [Gu et al., 1998]. Неясно, однако, является ли этот дефект следствием митохондриальной мутации или же это проявление существующего полиморфизма мтДНК, делающего данные клетки более чувствительными к повреждающим факторам среды. Неизвестно также, являются ли выявленные мутации соматическими или наследуются, но эти данные позволяют предполагать, что по крайней мере у некоторых больных с ПБ дефекты мтДНК могут быть первопричиной заболевания [Schapira, 2002].

У пациентов с синдромом Альцгеймера в клетках мозга и тромбоцитах обнаружен специфический дефицит активности цитохромоксидазы [Parker et al., 1990; Kish et al., 1992]. В более поздних работах изучение биопсии больных с АБ показало, что в тех же нейронах, в которых обнаруживаются наибольшие окислительные повреждения (оценивали по накоплению 8-гидроксигуанозина и нитротирозина), наблюдаются достоверные увеличения количества мтДНК и цитохромоксидазы; при этом значительное количество митохондриальной ДНК и СОХ накапливалось в цитоплазме нейронов, а не в митохондриях. Морфометрическая оценка показала, что митохондрии значительно редуцированы при АБ [Hirai et al., 2001].

Идентифицированная группа мтДНК "мутаций" у больных с АБ [Davis et al., 1997], к сожалению, оказалась артефактом: нуклеотидные замены вместо митохондриальных генов были описаны в ядерных "мтДНК-псевдогенах" [Hirano et al., 1997].

Изящный методический прием — перенос мтДНК из клеток больных АБ в лишенные собственных митохондрий клетки культуры HeLa — позволил сформулировать гипотезу, согласно которой накопление в клетках мозга таких больных митохондриальных мутаций не является первопричиной наблюдаемых биохимических аномалий. Авторы, однако, не исключают того, что данные мутации могут быть сконцентрированы локально в каком-то функционально важном, хотя и небольшом, регионе мозга, что вызовет стрессовую ситуацию и спровоцирует развитие болезни [Ito et al., 1999].

При изучении клеток лобных долей мозга больных АБ было показано более быстрое разрушение (фрагментация) как ядерной, так и митохондриальной ДНК по сравнению с клетками мозга контрольной группы. С этой "хрупкостью" связано, вероятно, уменьшение количества митохондриальных ДНК и белков и более низкая активность цитохромоксидазы в клетках лобных долей мозга у больных АБ. Авторы предлагают так называемый механизм "двойных каскадов смерти клетки" ("dual cell death cascades"): поврежденные при АБ митохондриальные ДНК вызывают нарушение функции митохондрий. В результате этого клетки мозга становятся более чувствительными к окислительному повреждению, и таким образом формируется механизм, по которому системные или внешние факторы могут влиять на течение заболевания [de la Monte et al., 2000].

Дефицит ферментов комплекса IV описан также для клеток мозга больных атаксией Friedreich's и спиномозжечковой атаксией-1 [Kish et al., 1999]. Неясно, таким образом, являются ли изменения мтДНК (если они будут показаны) специфичными для АБ и составляют ли они первопричину болезни по крайней мере у некоторых больных или же нарушения функций ферментов комплекса IV — вторичное проявление аномалии, характерное для ряда нейродегенеративных заболеваний [Schapira, 2002].

Лишь вторичным проявлением заболеваний является скорее всего ряд митохондриальных аномалий, обнаруженных при специфической патологии двигательных нейронов (амиотрофический латеральный склероз — АЛС). У многих больных АЛС обнаружена мутация ядерного гена супероксиддисмутазы I (SOD-I); повреждения, вызываемые свободными радикалами, описаны для белков, липидов и ДНК тканей многих больных, скончавшихся от амиотрофического латерального склероза [Schapira, 2002]. Митохондриальная "обычная" делеция (4977 п.н.), в избытке обнаруживаемая у больных АЛС [Dhaliwal, Grewal, 2000], а также увеличение активности ферментов комплексов I—III, негативный результат цитохимической локализации ферментов комплекса IV в отдельных миофибриллах, морфологические изменения митохондрий — все это, вероятно, является следствием мутации(й) ядерного генома [Schapira, 2002].

Активно обсуждается роль мутаций митохондриального генома в развитии таких разных генетических заболеваний, как эпилепсия, диабет, синдром Дауна, артериальная гипертензия и др. [Kunz, 2002; Canafoglia et al., 2001; Монастырская и др., 2000; Arbuzova et al., 2001; Park et al., 2001]. Тем не менее убедительные доказательства причинной роли этих мутаций в патогенезе пока отсутствуют.

На карте митохондриального генома человека представлены обнаруженные к 2002 г. точечные мутации и основная делеция, указаны также связанные с ними синдромы (рис. 14.4).

Митохондриальный геном и канцерогенез

Ежемесячно появляется огромное количество публикаций, посвященных механизмам онкогенеза; среди них немало работ, связанных с ролью митохондриальных геномов в этих процессах. За год до появления первых публикаций по митохондриальным мутациям, вызывающим различные патологии у человека, была опубликована статья, в которой впервые высказывалось предположение о связи мутаций митохондриальной ДНК с канцерогенезом [Shay, Werbin, 1987].

Позднее точечные мутации и делеции митохондриальных ДНК были обнаружены в самых разных опухолях [Horton et al., 1996; Polyak et al., 1998; Fliss et al., 2000; Nishikawa et al., 2001; Penta et al., 2001; Parella et al., 2001]. В табл. 14.3 приведен перечень мутаций, обнаруженных в одном из наиболее детальных исследований различных опухолей человека [Fliss et al., 2000]. Очень часто выявляемые при канцерогенезе мутации локализуются в D-петле молекулы мтДНК — несомненно, этот район является горячей точкой митохондриального генома [Parella et al., 2001; Nomoto et al., 2002; Tan et al., 2002].

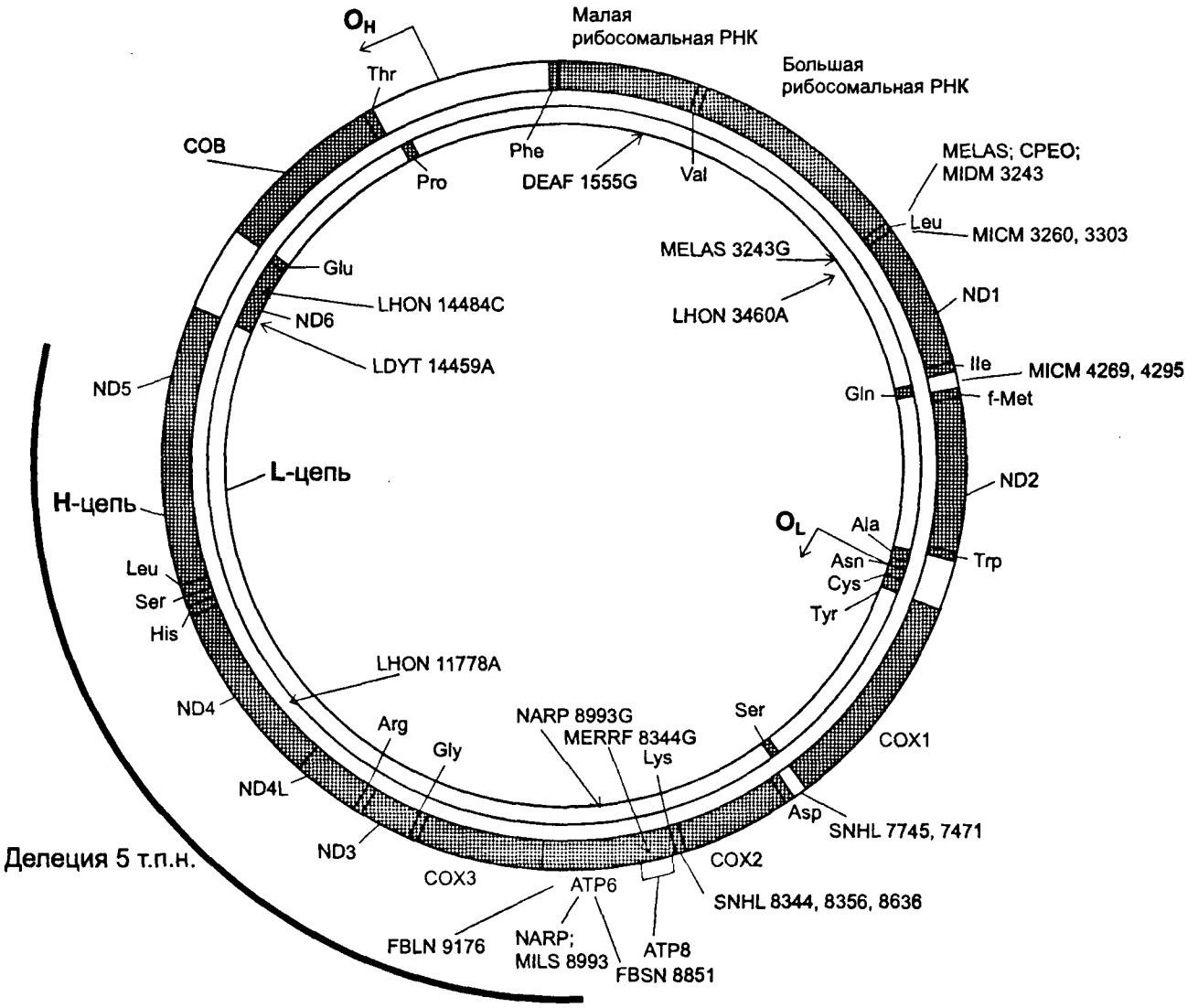


Рис. 14.4. Митохондриальный геном человека с указанными позициями делеции 5 т.п.н., а также различных точечных мутаций и связанных с ними синдромов [адаптировано из Wallace, http:/www.gen.emory.edu/mitomap.html и Mandavilli et al., 2002]

Корреляция между наличием мутаций митохондриального генома и канцерогенезом представляется очевидной, но неясно, являются ли аномалии мтДНК одним из причинных факторов или они появляются как вторичный эффект при развитии опухоли [Amuthan et al., 2001].

При исследовании тканей гепатоклеточной карциномы, которой обычно предшествует хроническое вирусное инфицирование печени, было обнаружено значительное накопление мутантных митохондриальных геномов. По мнению авторов, в данном случае вирусная инфекция приводит к накоплению мутаций в митохондриальной ДНК, причем это происходит чаще, чем при развитии других опухолей. Кроме того, наблюдалась корреляция между количеством мутантных молекул и степенью малигнизации [Nishikawa et al., 2001].

Изменению при канцерогенезе подвергается не только структура митохондриального генома, но и его экспрессия. Для сóлидных (solid) опухолей многих локализаций (молочная железа, желудок, толстый кишечник, печень, почки, мочевой пузырь, легкие), а также для лейкемий, лимфом, миелодиспластического синдрома показано увеличение экспрессии многих субъединиц дыхательной цепи митохондриального кодирования. Возможно, это отражает адаптацию митохондрий и организма в целом к условиям измененной энергетической потребности [Penta et al., 2001].

В клетках рака поджелудочной железы были найдены многочисленные гомоплазматические мутации мтДНК; однако самым удивительным оказался факт шести-восьмикратного увеличения количества митохондриальной ДНК в раковых клетках по сравнению с нормальными [Jones et al., 2001]. В эстроген-индуцированной опухоли почек у хомяков (модельный объект для изучения гормонально-индуцированного канцерогенеза) общее количество копий молекул митохондриальных ДНК, наоборот, значительно уменьшалось [Bhat, 2002].

Таблица 14.3

Митохондриальные мутации, обнаруженные в первичных опухолях [по Fliss et al., 2000]

№ пациента	Положение нуклеотида	Ген	ДНК (N→T)	Белок
Мочевой пузырь (9 из 14 пациентов, 64%)				
1124	114	D-петля	T → C	-
580	302	D-петля	делеция C	-
580	386	D-петля	C → A	-
799	2056*	16S рРНК	G → A	-
716	2445	16S рРНК	T → C	-
1127	3054*	16S рРНК	G → A	-
884	10071	*ND3*	T → C	L → L
884	10321	*ND3*	T → C	V → A
884	10792	*ND4*	A → G	L → L
884	10793	*ND4*	C → T	L → L
899	10822	*ND4*	C → T	H → H
716	10978	*ND4*	A → G	L → L
870	11065	*ND4*	A → G	L → L
870	11518	*ND4*	G → A	L → L
884	12049	*ND4*	C → T	F → F
874	12519	*ND5*	T → C	V → V
580	15642	*Cyt b*	делеция	7 aa**
899	16189	D-петля	инсерция T	-
1124	16265	D-петля	A → C	-
1127	16532*	D-петля	A → T	-

Продолжение табл. 14.3

№ пациента	Положение нуклеотида	Ген	ДНК (N→T)	Белок
Рак головы и шеи (head and neck cancer) (6 из 13 пациентов, 46%)				
1637	75	D-петля	G → A	-
1680	302	D-петля	делеция C	-
1565	514	D-петля	инсерция CG	-
1684	1811	16S рРНК	A → G	-
1708	10822	*ND4*	C → T	T → M
1678	11150	*ND4*	G → A	A → T
1680	16172	D-петля	C → T	-
1680	16292	D-петля	C → T	-
1680	16300	D-петля	A → G	-
Рак легких (6 из 14 пациентов, 43%)				
1174	150	D-петля	C → T	-
1174	195	D-петля	T → C	-
902	302	D-петля	делеция C	-
898	2664	16S рРНК	T → C	-
915	5521	тРНК Trp	G → A	-
915	12345	тРНК Leu	G → A	-
915	16183	D-петля	C → A	-
915	16187	D-петля	C → T	-
1113	16519	D-петля	T → C	-
1140	16380	D-петля	G → A	-

Примечание. У пациентов 1113, 1140 и 1174 анализировалась только область D-петли; *N* и *T* — соответственно нормальная и обнаруженная у онкологических больных последовательность; аминокислоты: A — Ala; F — Phe; H — His; L — Leu; M — Met; T — Thr; V — Val. * Гетероплазматическая мутация. ** аа — аминокислота.

Деплеция митохондриального генома, как оказалось, способна вызывать изменение экспрессии ядерных генов, связанных с прогрессивным развитием опухоли. Было показано, что генетический стресс (митохондриальная деплеция) культуры миобластов C2C12 и клеток легочной карциномы A549 вызывает сверхэкспрессию таких опухолевых маркеров, как катепсин L и бета-фактор трансформации роста (TGF β), а также резко увеличивает инвазивность этих клеток как *in vitro*, так и при их трансплантации мышам. Клетки-ревертанты с восстановленной до уровня 70% исходного количества митохондриальной ДНК не отличались от нормальных ни по экспрессии маркерных ядерных генов, ни по инвазивным свойствам. Эти факты открывают еще один аспект возможной роли мтДНК в прогрессии опухолей и их метастазировании [Amuthan et al., 2001] — посредством ретроградной регуляции ядерных онкогенов, осуществляемой митохондриальным геномом.

Приведенные в этом разделе факты разрознены, часто противоречат друг другу и не позволяют пока установить причинно-следственные связи между процессами малигнизации и аномалиями структуры и экспрессии митохондриального генома. По нашему глубокому убеждению, раскрытие особенностей злокачественного перерождения клеток и тканей произойдет не раньше, чем станут понятны механизмы, регулирующие деление, функционирование и апоптоз (программируемую смерть) нормальных клеток. Познание же этих механизмов не может произойти изолированно от понимания роли митохондриального генома, его взаимодействия с геномом ядра в реализации всей генетической программы организма.

Митохондриальный геном и старение

Предположения о роли митохондрий в процессах старения высказывались уже 30 лет назад [Harman, 1972]. Была предложена гипотеза о возникающих в онтогенезе аномалиях митохондриального генома, приводящих к старению организма [Flemming et al., 1982], а затем сформулирована концепция, согласно которой накопление мутаций митохондриальной ДНК в онтогенезе является основной причиной старения и "возрастных" заболеваний [Linnane et al., 1989].

Экспериментальные доказательства участия митохондриального генома в процессах старения и апоптоза интенсивно накапливаются на протяжении последнего десятилетия с применением самых современных, высокоразрешающих методов анализа [Michikawa et al., 1999; Wang et al., 2001; Lin et al., 2002]. Были успешно проведены лазерная микродиссекция и полный секвенс мтДНК из единичных клеток и их частей [Cao et al., 2001; Aiken et al., 2002; Taylor et al., 2001], проточная цитофотометрия и ПЦР для выделения отдельных митохондрий и анализа их генетического состава [Cavelier et al., 2000], одновременное цитохимическое выявление нормальных и мутантных мтДНК молекул с помощью двухцветной флуоресценции при гибридизации *in situ* [van de Corput et al., 1997], амплификация целых молекул мтДНК, выделенных из единичных клеток [Khrapko et al., 1999]. Весьма многообещающим в исследовании молекулярных механизмов старения является использование модельных систем, в частности цибридных клеток [Tabrizi, Schapira, 1999; Kiechle, Zhang, 2002] и трансмитохондриальных мышей, полученных путем переноса экзогенной мтДНК в эмбрион [Sligh et al., 2000; Hirano, 2001; см. также литературу к главе 12: Pinkert, Trounce, 2002; Inoue et al., 2002].

Мутации митохондриального генома и старение

В ранних исследованиях было показано, что концентрация в митохондриальной ДНК окисленного нуклеотида 8-гидрокси-дезоксигуанозина (8-OH-dG), который является биомаркером повреждения генома, с возрастом увеличивается [Haykawa et al., 1992; Mecocci et al., 1993]. В некоторых тканях, например в мышцах и ЦНС, уровень 8-OH-dG в митохондриальной ДНК оказался в 16 раз выше, чем в ядерной [Richter et al., 1988]. Также обнаружена корреляция между увеличением уровня 8-OH-dG и большей частотой крупной делеции 7,4 т.п.н. в мтДНК сердца [Haykawa et al., 1992] и мозга [Mecocci et al., 1993].

Большое количество публикаций свидетельствует о том, что накопление мутаций митохондриального генома происходит у человека в процессе жизни, при этом наибольший уровень мутаций наблюдается в ЦНС и мышцах. Со времени появления первой работы, в которой обнаружено увеличение количества делеций мтДНК с возрастом [Ikebe et al., 1990], в стареющих тканях человека выявлено более 20 различных типов делеций [Cottrell et al., 2000].

Показано накопление с возрастом так называемой "common"-делеции 4977 п.н., расположенной между нуклеотидами 8470 и 13447 (см. раздел "Крупные делеции и дупликации митохондриальных ДНК" данной главы) в скелетных мышцах [Simonetti et al., 1992; Lezza et al., 1994 и др.], сердечной мышце [Simonetti et al., 1992; Cortopassi et al., 1992; Khrapko et al., 1999], диафрагме [Cortopassi et al., 1992], сетчатке глаза [Barreau et al., 1996], коже [Yang et al., 1994], яичниках [Kitagawa et al., 1993], сперме [Kao et al., 1995]. Характерно, что в клетках плода данная делеция не обнаружена. Еще одна крупная делеция — 7,4 т.п.н. между 8649-м и 16084-м нуклеотидами — обнаруживается при старении различных тканей [Cottrell et al., 2000]. При этом, если наряду с фактором старения наблюдается аномалия какого-либо органа, частота делеций увеличивается во много раз: в 240 раз — в тканях сердечной мышцы при ее ишемии [Cottrell et al., 2000], в 17 раз — в тканях striatum при болезни Паркинсона [Ikebe et al., 1990] и т.д. Отметим, что на накопление делеций в митохондриальном геноме влияют также средовые факторы: участки кожи одного и того же индивидуума, подвергавшиеся воздействию солнца, накапливали в 30 раз больше мтДНК с делецией 4977 п.н., чем участки, не подвергавшиеся солнечным лучам [Pang et al., 1994].

Является ли накопление мутаций в митохондриальном геноме основной причиной или только фактором, сопутствующим старению? Для ответа на этот вопрос необходимо показать, что накопление мутантных молекул выражается в физиологических изменениях, которые можно соотнести с возрастными изменениями в тканях. Данный подход требует анализа мтДНК

отдельных клеток, а не клеточных пулов. Еще в ранних работах было показано, что мутации в мтДНК скелетных мышц человека не распределены равномерно по ткани, а представлены мозаичными скоплениями [Müller-Hocker et al., 1993].

Детальный анализ мтДНК на наличие делеций в 350 кардиомиоцитах, взятых у трех пациентов среднего возраста и четырех старше 100 лет, показал, что в одной из каждых семи клеток 100-летних доноров митохондриальный геном несет значительное количество делетированных молекул (от 2 до 65%). В митохондриях кардиомиоцитов пациентов среднего возраста делеций не найдено. Различные клетки характеризуются различными делециями; поэтому при исследовании мтДНК из гомогенатов тех же тканей делеций обнаружить не удалось — они оказывались за пределами разрешающей способности метода [Khrapko et al., 1999].

Подобный подход был использован другой группой исследователей для анализа делеций мтДНК в отдельных клетках скелетных мышц. Уровень мутаций был гораздо выше, чем в случае кардиомиоцитов: в большинстве клеток скелетных мышц обнаружены мтДНК с делециями, значительное количество клеток содержало только делетированные молекулы, во многих случаях в одной клетке встречались мтДНК с различными делециями [Kopsidas et al., 1998]. Возможно, эти результаты отражают объективные различия между тканями [Khrapko et al., 1999].

Биохимические последствия делеции 4977 изучались на модели цибридных клеток: показано падение митохондриального трансмембранного потенциала до порогового уровня [Porteous et al., 1998].

Не только делеции, но и точечные мутации накапливаются в мтДНК в онтогенезе. Общее количество точечных мутаций митохондриального генома в стареющих тканях человека оценивается примерно как одна мутация на молекулу мтДНК [Coller et al., 2002]. Так, в наиболее вариабельной области генома — D-петле и прилегающих к ней транскрипционных промоторах (DLP) — обнаружена зависящая от возраста аккумуляция точечных мутаций. Наиболее характерной мутацией в фибробластах пациентов старше 65 лет была трансверсия T414G, которая обнаруживалась в 50% молекул у мтДНК 57% пожилых больных, но отсутствовала у всех исследованных молодых пациентов [Michikawa et al., 1999]. При анализе области D-петли в мтДНК скелетных мышц мутация T414G отсутствовала, зато отмечено накопление у пожилых пациентов (64—101 год) двух других точечных мутаций: A189G и T408A. Ни у одного из обследованных моложе 34 лет данные мутации не выявлялись [Wang et al., 2001] (рис. 14.5).

Мутации A189G и T408A характерны только для мышечной ткани, тогда как трансверсия T414G встречалась также в мтДНК кожи. Выявленная тка-

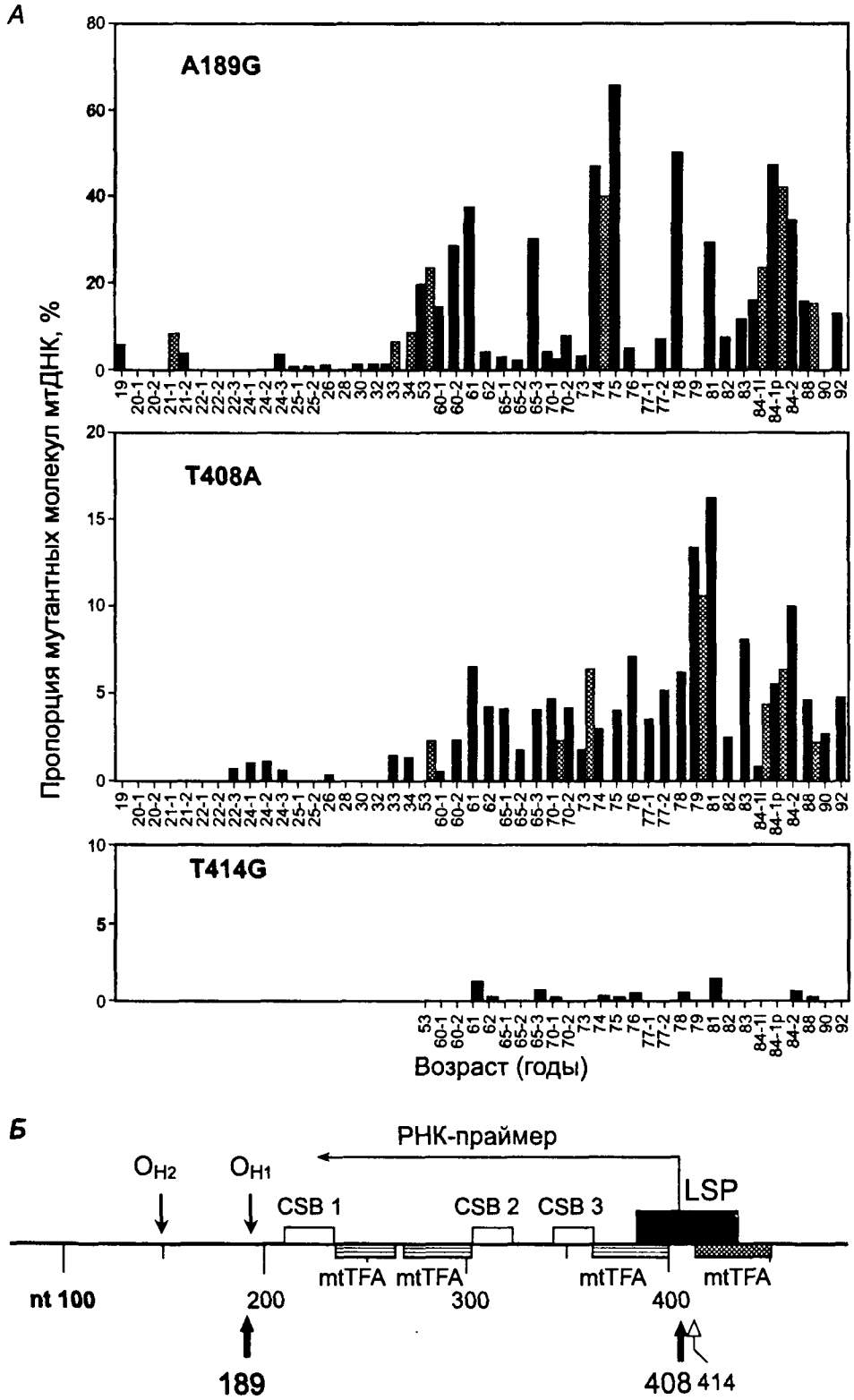


Рис. 14.5. *А* — диаграмма, суммирующая частоту встречаемости и распределение по возрастным группам A189G, T408A и T414G мутаций мтДНК пациентов разного возраста. Цифры на оси абсцисс – возраст пациентов в годах. Черные столбики отражают данные, полученные с помошью удлинения праймера, заштрихованные — с помошью анализа клонирования-секвенирования DGGE; *Б* — схема участка контрольной области мтДНК, показывающая расположение двух мутаций мтДНК, специфичных для мышечных клеток, обнаруженных в данной работе (жирные стрелки), и мутации T414G, специфичной для фибробластов (тонкая стрелка). Показаны положения связывания митохондриального фактора А (густо заштрихованный прямоугольник указывает место высокого сродства) и расположение промотора LSP для транскрипции L-цепи [по Michikawa et al., 1999]

неспецифичность мутаций у большого числа неродственных пациентов требует дальнейшего анализа [Wang et al., 2001]. Мутация A189G локализована в непосредственной близости от точки начала репликации H-цепи - O_{H1} (нуклеотид 191). Мутация T408A прилегает вплотную к транскрипционному старт-сайту L-цепи (нуклеотид 407) рядом с сегментом, имеющим высокое сродство к митохондриальному фактору транскрипции A. Мутация T414G размещается вблизи того же сегмента, в середине LSP промотора (рис. 14.4). Другие обнаруженные мутации этой "горячей зоны" также расположены в точках, критических для мтДНК репликации [Michikawa et al., 1999]. Эти участки ДНК либо раскручиваются и изгибаются при присоединении фактора транскрипции мтTFA, либо участвуют в образовании РНК-ДНК-гибридов, формируя R-петлю (см. главу 6). Вероятно, в процессе этих конформационных изменений образуются однонитчатые участки, более уязвимые для мутагенного действия кислородных радикалов [Michikawa et al., 1999]. Интересно, что сайты мутаций, специфичных как для фибробластной, так и для мышечной мтДНК, находятся в точке прикрепления мтДНК к мембране или рядом с этой областью. Данная точка является местом ядерно-митохондриального взаимодействия. Возможно, дальнейшие исследования белков, осуществляющих ядерный контроль репликации и/или числа копий мтДНК, прольют свет на наблюдаемую тканеспецифичность мутаций мтДНК, выявляемых при старении организма [Wang et al., 2001].

Несмотря на обнаружение большого количества точечных мутаций и делеций в мтДНК при старении организма, их связь с функциональными повреждениями клеток и тканей пока остается недоказанной. Как обсуждалось выше, митохондриальные мутации чаще всего рецессивны, и проявление фенотипического эффекта иногда наблюдается при концентрации мутантных копий до 90%. Приводит ли накопление делеций в мтДНК мышечных клеток, показанное в ряде работ, к нарушению функционирования этих тканей? Интересен анализ данных, полученных как бы обратным путем: от нарушения функций ферментов, находящихся под контролем митохондриального генома, к мутациям в данном геноме.

На уровне отдельных клеток было проанализировано нарушение функций митохондриальных ферментов у человека: кардиомиоциты, дефектные по цитохром *c* оксидазе, накапливались с возрастом, при этом потеря активности отмечена у единичных, случайно распределенных по миокарду клеток, что свидетельствует скорее всего о стохастической мутантной природе этих нарушений. В среднем в сердечной мышце в третьей декаде жизни COX-дефицитных клеток было 3 дефект/см^2, тогда как после 70 лет — 50 дефект/см^2 [Müller-Hocker, 1990]. Количество COX-дефицитных клеток в мышечных клетках диафрагмы и конечностей у 80—90-летних пациентов

увеличивалось в 10 раз по сравнению с 30—60-летними [Müller-Hocker et al., 1993; Byrne, Dennett, 1992].

Сочетание фенотипического подхода при выявлении митохондриальных аномалий отдельных клеток с анализом их мтДНК применили в исследовании более 82 тысяч мышечных волокон прямой мышцы бедра крыс разного возраста — 5, 18 и 38 месяцев. Количество мышечных волокон с аномалиями электронно-транспортной системы, обнаруженными гистохимически, увеличивалось от H≈300 на мышцу у 5-месячного животного до H≈1100 на мышцу у 38-месячного [Wanagat et al., 2001]. Индивидуальные клетки с функциональными аномалиями выделяли методом лазерной (laser capture) микродиссекции, и их мтДНК исследовали на наличие мутаций. Все аномальные мышечные волокна (фенотип RRF — "ragged red fiber") при анализе митохондриального генома обнаруживали различные делеции в большой митохондриальной дуге, расположенной между точками начала репликации O_H и O_L. Согласно модели, предложенной авторами [Wanagat et al., 2001], ошибка репликации, повреждение какими-то агентами или другая причина вызывают делецию мтДНК. Данная аберрантная мтДНК амплифицируется, вероятно, быстрее нормальной из-за меньшего размера своего генома. Митохондрии с делетированной мтДНК не обеспечивают полноценного функционирования электронно-транспортной цепи, ядро таких клеток путем ретроградной регуляции получает соответствующий сигнал, компенсаторным результатом которого является усиление биогенеза митохондрий и экспрессии митохондриальных генов ядерного кодирования, например, сукцинатдегидрогеназы (*SDH*), что приводит к RRF-фенотипу. Накопление мутантных митохондрий продолжается по всей длине мышечного волокна, пока не приводит к полному нарушению клеточного гомеостаза. В результате этого экспрессия ядерных генов падает, вызывая нарушение синтеза белков миофибрилл и атрофию мышечных волокон (рис. 14.6). Аномалии

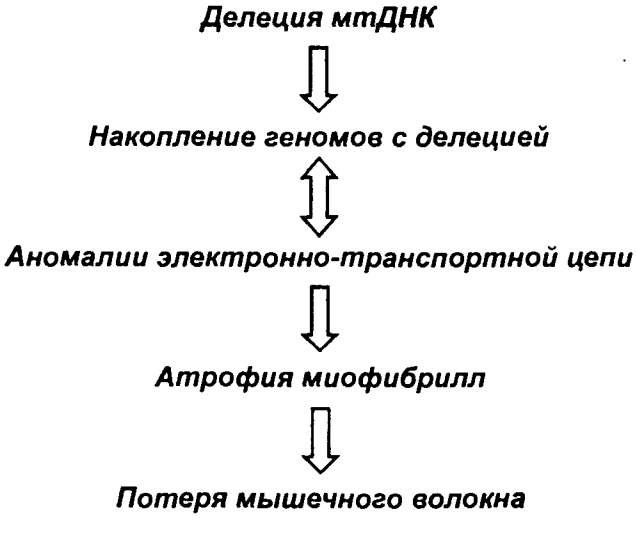


Рис. 14.6. Схема каскада событий, инициируемых делецией митохондриальной ДНК [по Aiken et al., 2002]

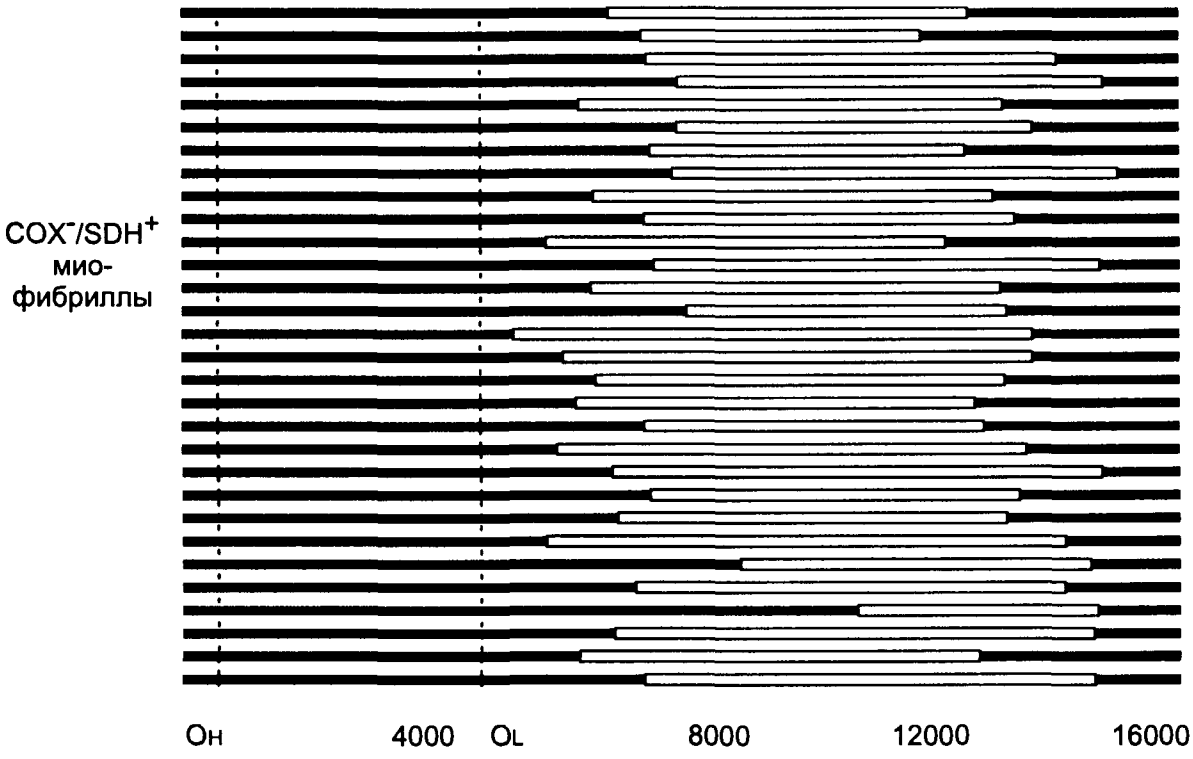


Рис. 14.7. Делеции митохондриальной ДНК в функционально аномальных участках скелетных мышц (*vastus lateralis*) макак резус [по Aiken et al., 2002]. Область от O_H до O_L — малая дуга, область от O_L до 16000 т.п.н. — большая дуга. Светлые участки — делетированные последовательности

электронно-транспортной цепи могут вызвать также изменение нейромышечного синапса (junction) и последующую денервацию миофибриллы [Wanagat et al., 2001].

Аналогичным образом была исследована связь между возрастными дегенеративными процессами в отдельных мышечных волокнах *vastus lateralis* макак резус и аномалиями их митохондриальных геномов. Тонкие срезы (10 мк) индивидуальных миофибрилл с нарушениями электронно-транспортной системы получали с помощью laser capture микроскопа Pix Cell II (Arcturus), их митохондриальные геномы сканировали на наличие делеций. При ПЦР-анализе 29 функционально аномальных участков во всех случаях обнаружена только делетированная мтДНК. Размер делетированных участков колебался от 4,4 до 9,7 т.п.н., локализованы делеции в большой митохондриальной дуге (рис.14.7). Функционально неповрежденные мышечные волокна и даже фенотипически нормальные участки дефектных волокон вне зоны повреждения содержали мтДНК только дикого типа [Cao et al., 2001].

Подобные исследования на модельных системах пока единичны, но их роль в установлении причинно-следственных связей между мутациями митохондриальных генов и старением организма трудно переоценить.

Показано, что небольшое количество молекул мтДНК с множественными делециями накапливается также в клетках мозга в процессе старения [Corral-Debrinski et al., 1992; Soong et al., 1992].

Своеобразная "клональная экспансия" мутантных мтДНК показана не только для молекул, несущих делеции, но и для точечных мутаций [Coller et al., 2002], механизмы этого процесса в последнем случае пока неясны.

На основе всех этих результатов можно заключить, что в онтогенезе в разных тканях возникают и увеличиваются клоны клеток с мутантными мтДНК, являющиеся своеобразными очагами дисфункции. Именно эти очаги индуцируют нарушения работы органа или системы органов, приводя к старению организма в целом. По образному выражению одного из редакционных комментариев, опубликованного в журнале *Nature*, митохондрии "ослабляют огонь жизни".

Митохондриальный геном и апоптоз

Программируемая клеточная смерть, или апоптоз, является фундаментальной чертой всех живых организмов. В организме животных апоптоз — необходимый этап нормального развития, гомеостаза тканей, развития нервной системы и регуляции иммунной системы [Bossy-Wetzel et al., 1998].

Смерть клеток при апоптозе в отличие от некроза осуществляется по высокоскоординированному сценарию, включающему уменьшение объема клетки, фрагментацию мембран (blebbing), конденсацию хроматина и фрагментацию ядерной ДНК [Kerr, 1971; Wyllie et al., 1980]. Для активации этой программы смерти существуют различные пути [Bossy-Wetzel et al., 1998]. В последнее время накоплено огромное количество фактов, свидетельствующих о центральной роли митохондрий в апоптозе [Bossy-Wetzel et al., 1998; Green, Reed, 1998; Mirabella et al., 2000; Wang, 2001].

Авторы не ставят целью подробное рассмотрение биохимических каскадов, происходящих при апоптозе с участием митохондрий. Однако, поскольку нарушением апоптоза нередко пытаются объяснить патогенез различных заболеваний, в частности малигнизацию, аутоиммунные и нейродегенеративные заболевания, важно понять, играет ли какую-то роль в апоптозе митохондриальный геном.

Исследование мышечных биопсий 36 пациентов с различными митохондриальными мутациями выявило характерные черты апоптоза в миофибриллах пациентов с делециями мтДНК (>40%) и с точечными мутациями митохондриальных тРНК (>70%). Предполагают, что апоптоз не просто способ избавления организма от клеток с аномальными митохондриями, но

и процесс, который усиливается при мутациях мтДНК и активно модифицирует патогенез этих заболеваний [Mirabella et al., 2000; Wang, 2001].

Однако целый ряд исследований, проведенных на модельных объектах — клетках с деплециями мтДНК и полностью лишенных мтДНК, хотя частично противоречат друг другу, все же фиксируют наличие в таких клетках апоптоза, по крайней мере *in vitro*. На основании этих результатов можно заключить, что выполнение программы апоптоза возможно и в отсутствие митохондриальной ДНК [Marchetti et al., 1996; Jiang et al., 1999; Wang, 2001]. Данный вопрос изучен совершенно недостаточно и пока не позволяет делать однозначных выводов. Во всяком случае, поскольку роль самих митохондрий в этом процессе бесспорна, можно предположить, что основные генетические элементы, контролирующие апоптоз со стороны митохондрий, переместились в ядро и продолжают оттуда участвовать в выполнении программы клеточной смерти.

Литература

Монастырская Е.А., Мурашев А.Н., Хохлова О.Н. и др. Генетические аспекты артериальной гипертензии: роль Y хромосомы и митохондриальной ДНК // Физиол. журн. им. Сеченова. 2000. Т. 86. С. 671—680.

Aggarwal P., Gill-Randall R., Wheatley T. et al. Identification of mtDNA mutation in a pedigree with gestational diabetes, deafness, Wolff–Parkinson–White syndrome and placenta accreta // Hum. Hered. 2001. Vol. 51. P. 114—116.

Aiken J., Bua E., Cao Z. et al. Mitochondrial DNA deletion mutations and sarcopenia // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002. Vol. 959. P. 412—423.

Amuthan G., Biswas G., Zhang S.Y. et al. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumour progression and cell invasion // EMBO J. 2001. Vol. 20. P. 1910—1920.

Arbuzova S., Cuckle H., Mueller R., Sehmi I. Familial Down syndrome: evidence supporting cytoplasmic inheritance // Clin. Genet. 2001. Vol. 60. P. 456—462.

Awadalla P., Eyre-Walker A., Smith J.M. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA // Science. 1999. Vol. 286. P. 2524—2525.

Ballinger S.W., Shoffner J.M., Hedaya E.V. et al. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion // Nat. Genet. 1992. Vol. 1. P.11—15.

Ballinger S.W., Shoffner J.M., Gebhart S. et al. Mitochondrial diabetes revisited (letter) // Nat. Genet. 1994. Vol. 7. P.458—459.

Barreau E., Brossas J.Y., Courtois Y. et al. Accumulation of the mitochondrial DNA deletions in human retina during aging // Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. 1996. Vol. 37. P. 384—391.

Barthelemy C., De Baulny O., Lombes A. D-loop mutations in the mitochondrial DNA: link with mitochondrial DNA depletion? // Hum. Genet. 2002. Vol. 10, No. 5. P. 479—487.

Bhat H.K. Depletion of mitochondrial DNA and enzyme in estrogen-induced hamster kidney tumours: a rodent model of hormonal carcinogenesis // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2002. Vol. 16. P. 1—9.

Blake J.C., Taanman J.-W., Morris A.M. et al. Mitochondrial DNA depletion syndrome is expressed in amniotic fluid cell cultures // Am. J. Pathol. 1999. Vol. 155, No. 1. P. 67—70.

Bodnar A.G., Cooper J.M., Holt I.J. et al. Nuclear complementation restores mtDNA levels in cultured cells from a patient with mtDNA depletion // Am. J. Hum. Genet. 1993. Vol. 53. P. 663—669.

Bodyak N.D., Nekhaeva E., Wei J.Y., Khrapko K. Quantification and sequencing of somatic deleted mtDNA in single cells: evidence for partially duplicated mtDNA in aged human tisuues // Hum. Mol. Genet. 2001. Vol. 10, No. 1. P. 17—24.

Brown M.D., Torroni A., Reckord C.L., Wallace D.C. Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicate multiple independent occurrences of the common mutations // Hum. Mutat. 1995. Vol. 6. P. 311—325.

Byrne E., Dennett X. Respiratory chain failure in adult muscle fibers: relationship with ageing and possible implications for the neuronal pool // Mutat. Res. 1992. Vol. 275. P. 125—131.

Canafoglia L., Franceschetti S., Antozzi C. et al. Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders // Neurology. 2001. Vol. 56. P. 1340—1346.

Cavelier L., Johannisson A., Gyllensten U. Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR // Exp. Cell Res. 2000. Vol. 259. P. 79—85.

Chinnery P.F., Andrews R.M., Turnbull D.M., Howell N. Leber's hereditary optic neuropathy: does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? // Am. J. Hum. Genet. 2001a. Vol. 98. P. 235—243.

Chinnery P.F., Brown D.T., Andrews R.M. et al. The mitochondrial *ND6* gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy // Brain. 2001b. Vol. 124. P. 209—218.

Chinnery P.F., Howell N., Andrews R.M., Turnbull D.M. Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity // J. Med. Genet. 1999. Vol. 36. P. 505—510.

Chomyn A., Enriques J.A., Micol V. et al. The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episode syndrome-associated human mitochondrial tRNALeu(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 19198—19209.

Chomyn A., Martinuzzi A., Yoneda M. et al. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1992. Vol. 89. P. 4221—4225.

Van de Corput M.P., van den Ouweland J.M., Dirks R.W. et al. Detection of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts of patients with Pearson's syndrome by two-colour fluorescence in situ hybridization // J. Histochem. Cytochem. 1997. Vol. 45. P. 55—61.

Cortopassi G.A., Shibata D., Soong N.W. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in ageing human tissues // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1992. Vol. 89. P. 7370—7374.

Cote H.C., Brumme Z.L., Craib K.J. et al. Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients // N. Engl. J. Med. 2002. Vol. 34, No. 11. P. 811—820.

Cottrell D.A., Blakely E.L., Borthwick G.M. et al. Role of mitochondrial DNA mutations in disease and aging // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000. Vol. 908. P. 199—207.

Croteau D.L., Stierum R.H., Bohr V.A. Mitochondrial DNA repair pathways// Mutat. Res. 1999. Vol. 434. P. 137—148.

Dalakas M.C., Semino-Mora C., Leon-Monzon M. Mitochondrial alterations with mitochondrial DNA depletion in the nerves of AIDS patients with peripheral neuropathy induced by 2'3'-dideoxycytidine (ddC) // Lab. Invest. 2001. Vol. 81, No. 11. P. 1537—1544.

Davis R.E., Miller S., Herrnstadt C. et al. Mutations in mitochondrial *c* oxidase gene segregate with late-onset Alzheimer disease // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 4526—4531.

De la Monte S.M., Luong T., Neely T.R. et al. Mitochondrial DNA damage as mechanism of cell loss in Alzheimer's disease // Lab. Invest. 2000. Vol. 80. P. 1323—1335.

De Vries D.D., van Engelen B.G., Gabreels F.J. et al. A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome // Ann. Neurol. 1993. Vol. 34. P. 410—412.

Dhaliwal G.K., Grewal R.P. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains // Neuroreport. 2000. Vol. 11. P. 2507—2509.

Edland S.D., Silverman J.M., Peskind E.R. et al. Increased risk of dementia in mothers of Alzheimer's disease cases: evidence for maternal inheritance // Neurology. 1996. Vol. 47. P. 254—256.

Enriques J.A., Chomyn A., Attardi G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of $tRNA^{Lys}$ and premature translation termination // Nat. Genet. 1995. Vol. 10. P. 47—55.

Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial deafness mutations reviewed // Hum. Mutat. 1999. Vol. 13. P. 261—270.

Flemming J.E., Miquel J., Cottrell S. et al. Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? // Gerontology. 1982. Vol. 28. P. 44—53.

Fliss M.S., Usadel H., Caballero O.L. et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids // Science. 2000. Vol. 287. P. 2017—2019.

Goto Y., Ninaka I., Horai S. A mutation in the $tRNA^{Leu(UUR)}$ gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies // Nature. 1990. Vol. 348. P. 651—653.

Grasso M., Diegoli M., Brega A. et al. The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated with dilated cardiomyopathy // Eur. J. Hum. Genet. 2001. Vol. 9. P. 311—315.

Gu M., Cooper J.M., Taanman J.W. et al. Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease // Ann. Neurol. 1998. Vol. 44. P. 177—186.

Harding A.E., Sweeney M.G., Govan G.G., Riordan-Eva P. Pedigree analysis in Leber's hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation // Am. J. Hum. Genet. 1995. Vol. 57. P. 77—86.

Harman D. Free radical theory of ageing: dietary implications // Am. J. Clin. Nutr. 1972. Vol. 25. P. 839—845.

Haykawa M., Hattori K., Sugiyama S., Ozawa T. Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. Vol. 189. P. 979—985.

Hirai K., Aliev G., Nunomura A. et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. P. 3017—3023.

Hirano M. Transmitochondrial mice: Proof of principle and promises // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2001. Vol. 98. P. 401—403.

Hirano M., Shtilbans A., Mayeux R. et al. Apparent mtDNA heteroplasmy in Alzheimer's disease patients and in normals due to PCR amplification of nucleus-embedded mtDNA pseudogenes // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997. Vol. 94. P. 14894—14899.

Hirano M., Garcia-de-Yebenes J., Jones A.C. et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32–qter // Am. J. Hum. Genet. 1998. Vol. 63. P. 526—533.

Hirano M., Konishi K., Arata N. et al. Renal complications in a patient with A-to-G mutation of mitochondrial DNA at the 3243 position of leucine tRNA // Intern. Med. 2002. Vol. 41. P. 113—118.

Holme E., Larsson N.-G., Oldfors A. et al. Multiple symmetric lipomas with high levels of mtDNA with the $tRNA^{Lys}$ $A–G^{(8344)}$ mutation as the only manifestation of disease in a carrier of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome // Am. J. Hum. Genet. 1993. Vol. 52. P. 551—556.

Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies // Nature. 1988. Vol. 331. P. 717—719.

Holt I.J., Harding A.E., Petty R.K., Morgan-Hughes J.A. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy // Am. J. Hum. Genet. 1990. Vol. 46. P. 428—433.

Holt I.J., Dunbar D.R., Jacobs H.T. Behavior of a population of partially duplicated mitochondrial DNA molecules in cell culture: segregation, maintenance and recombination dependent upon nuclear background // Hum. Mol. Genet. 1997. Vol. 6. P. 1251—1260.

Horton T.M., Petros J.A., Heddi A. et al. Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell cancinoma // Genes Chromosomes Cancer. 1996. Vol. 15. P. 95—101.

http://www.neuro.net.ru/educ/300/nmd/myt.html. ИМС Невронет. Школа невролога. Митохондриальные болезни.

Ikebe S., Tanaka M., Ohno K. et al. Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. Vol. 170. P. 1044—1048.

Inoue K., Nakada K., Ogura A. et al. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes // Nat. Genet. 2000. Vol. 26. P. 176—181.

Ito S., Ohta S., Nishimaki K. et al. Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from eldery patients with Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999. Vol. 96. P. 2099—2103.

Johns D.R., Berman J. Alternative, simultaneous complex I of mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. Vol. 174. P. 1324—1330.

Johns D.R., Neufeld M.J. Cytochrome C oxidase mutations in Leber's hereditary optic neuropathy // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 196. P. 810—815.

Jones J.B., Song J.J., Hempen P.M. et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreative cancer offers a "mass"-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations // Cancer Res. 2001. Vol. 61, No. 4. P. 1299—1304.

Kao S.H., Chao H.T., Wei Y.H. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm //Biol. Reprod. 1995. Vol. 52. P. 729—736.

Kato T., Kunugi H., Nanko S., Kato N. Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder // J. Affect. Disord. 2001. Vol. 62. P. 151—164.

Khrapko K., Bodyak N., Thilly W.G. et al. Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions // Nucl. Acids Res. 1999. Vol. 27. P. 2434—2441.

Kiechle F.L., Zhang X. The postgenomic era // Arch. Pathol. Lab. Med. 2002. Vol. 126. P.255—262.

Kish S.J., Bergeron C., Rajput A. et al. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease // J. Neurochem. 1992. Vol. 59. P. 776—779.

Kitagawa T.N., Suganuma N., Nawa A. et al. Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribonucleic acid in postmenopausal ovaries // Biol. Reprod. 1993. Vol. 49. P. 730—736.

Kopsidas G., Kovalenko S.A., Kelso J.M., Linnane A.W. An age-associated correlation between cellular bioenergy decline and mtDNA rearrangements in human skeletal muscle// Mutat. Res. 1998. Vol. 421. P. 27—36.

Kunz W.S. The role of mitochondria in epileptogenesis // Curr. Opin. Neurol. 2002. Vol. 15. P. 179—184.

Larsson N.-G., Clayton D.A. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders // Annu. Rev. Genet. 1995. Vol. 29. P.151—178.

Lee H.C., Wei Y.H. Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging // Biogerontology. 2001. Vol. 2. P. 231—244.

Lezza A.M., Boffoli D., Scacco S. et al. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in ageing human skeletal muscles // Biochim. Biophys. Res. Commun. 1994. Vol. 205. P. 772—779.

Lin M.T., Simou D.K., Ahn C.H. et al. High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain // Hum. Mol. Genet. 2002. Vol. 11. P. 133—145.

Linnane A.W., Marzuki S., Ozawa T. et al. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases // Lancet. 1989. Vol. 1. P. 642—645.

Macmillan C., Johns T.A., Fu K., Shoubridge E.A. Predominance of the T14484C mutation in French-Canadian families with Leber's hereditary optic neuropathy is due to a founder effect // Am. J. Hum. Genet. 2000. Vol. 66. P. 332—335.

Man P.Y.W., Turnbull D.M., Chinnery P.F. Leber hereditary optic neuropathy // J. Med. Genet. 2002. Vol. 39. P. 162—169.

Mandavilli B.S., Santos J.H., Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging // Mutat. Res. 2002. Vol. 509. P. 127—151.

Manfredi G., Gupta N., Vazquez-Memije M.E. et al. Oligomycin induces a decrease in the cellular content of a pathogenic mutation in the human mitochondrial ATPase 6 gene // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 9386—9391.

Mashima Y., Yamada K., Wakakura M. et al. Spectrum of pathogenic mitochondrial DNA mutations and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy // Curr. Eye Res. 1998. Vol. 17. P. 403—408.

Mecocci P., MacGarvey U., Kaufman A.E. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain // Ann. Neurol. 1993. Vol. 34. P. 609—616.

Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N. et al. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication // Science. 1999. Vol. 286. P. 774—779.

Mita S., Rizzuto R., Moraes C.T. et al. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 561—567.

Mizuno Y., Ikebe S., Hattori N. et al. Role of mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // Biochem. Biophys. Acta. 1995. Vol. 1271. P. 265—274.

Molina J.A., deBustos F., Jimenez-Jimenez F.J. et al. Respiratory chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Alzheimer's disease // Neurology. 1997. Vol. 48. P. 636—638.

Moraes C.T., Shanske S., Trischler H.-J. et al. MtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases // Am. J. Hum. Genet. 1991. Vol. 48. P. 492—501.

Moraes C.T., Ricci E., Bonila E. et al. The mitochondrial $tRNA^{Leu(UUR)}$ mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS): genetic, biochemical and morphological correlations in skeletal muscle // Am. J. Hum. Genet. 1992. Vol. 50. P. 934—949.

Muller-Hocker J. Cytochrome C oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: an age-related alteration // J. Neurol. Sci. 1990. Vol. 100. P. 14—21.

Muller-Hocker J., Seibel P., Schneiderbanger K., Kadenbach B. Different *in situ* hybridization patterns of mitochondrial DNA in cytochrome C oxidase-deficient extraocular muscle fibres in the eldery //Virchows Arch. A, Pathol. Anat. Histopathol. 1993. Vol. 422. P. 7—15.

Mutisya E.M., Bowling A.C., Beal M.F. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease // J. Neurochem. 1994. Vol. 63. P. 2179—2184.

Naviaux R.K. Mitochondrial DNA disorders // Eur. J. Pediatr. 2000. Vol. 159, Suppl. 3. P. 219—226.

Nishikawa M., Nishiguchi S., Shiomi S. et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma // Cancer Res. 2001. Vol. 61. P. 1843—1845.

Nishino I., Spinazzola A., Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE: human mitochondrial disorder // Science. 1999. Vol. 283. P. 689—692.

Nomoto S., Yamashita K., Koshikawa K. et al. Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma // Clin. Cancer Res. 2002. Vol. 8. P. 481—487.

Pang C.Y., Lee H.C., Yang J.H. et al. Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure // Arch. Biochem. Biophys. 1994. Vol. 312. P. 534—538.

Parella P., Xiao Y., Fliss M. et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates // Cancer Res. 2001. Vol. 61. P. 7623—7626.

Park K.S., Lee K., Song J.H. et al. Peripheral blood mitochondrial DNA content is inversely correlated with insulin secretion during hyperglycemic clamp studies in healthy young men // Diabetes Res. Clin. Pract. 2001. Vol. 52. P. 97—102.

Parker W.D., Filley C.M., Parks J.K. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease // Neurology. 1990. Vol. 40. P. 1302—1303.

Pegoraro E., Carelli V., Zevianni M. et al. X-inactivation patterns in female Leber's hereditary optic neuropathy patients do not support a strong X-linked determinant // Am. J. Med. Genet. 1996. Vol. 61. P. 356—362.

Penta J.S., Johnson F.M., Wachsman J.T., Copeland W.C. Mitochondrial DNA and human malignancy // Mutat. Res. 2001. Vol. 488, No. 2. P. 119—133.

Polyak K., Li Y., Zhu H. et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours // Nat. Genet. 1998. Vol. 20. P. 291—293.

Porteous W.K., James A.M., Sheard P.W. et al. Bioenergetic consequences of accumulation of the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion // Eur. J. Biochem. 1998. Vol. 257. P. 192—201.

Prezant T.R., Agapian J.V., Bohlman M.C. et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness // Nat. Genet. 1993. Vol. 4. P. 289—294.

Richter C., Park J.W., Ames B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive //Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1988. Vol. 85. P. 6465—6467.

Rötig A., Bessis J.-L., Romero N., Cormier V. Maternally inherited duplication of the mitochondrial genome in a syndrome of proximal tubulopathy, diabetes mellitus, and cerebellar ataxia // Am. J. Hum. Genet. 1992. Vol. 50. P. 364—370.

Rowe T.C., Weissig V., Lawrence J.W. Mitochondrial DNA metabolism targeting drugs // Adv. Drug Deliv. Rev. 2001. Vol. 49, No. 1—2. P. 175—187.

Santorelli F.M., Tanji K., Sano M. et al. Maternally inherited encephalopathy associated with a single-base insertion in the mitochondrial tRNATrp gene // Ann. Neurol. 1997. Vol. 42. P. 256—260.

Schon E.A. Mitochondrial genetics and disease //Trends in Biol. Sci. 2000. Vol. 25. P. 555—560.

Schon E.A., Bonilla E., DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis // J. Bioenerg. Biomembr. 1997. Vol. 29. P. 131—149.

Schapira A.H.V. The "new" mitochondrial disorders // J. Neurol. Neurosurg. and Psychiatry. 2002. Vol. 72. P. 144—149.

Shay J.W., Werbin H. Are mitochondrial DNA mutations involved in the carcinogenic process? // Mutat. Res. 1987. Vol. 186. P. 149—160.

Simonetti S., Chen X., DiMauro S. et al. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal ageing: analysis by quantitative PCR // Biochim. Biophys. Acta. 1992. Vol. 1180. P. 113—122.

Sligh J.E., Levy S.E., Waymire K.G. et al. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2000. Vol. 97. P. 14461—14466.

Soong N.W., Hinton D.R., Cortopassi G.A., Arnheim N. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain // Nat. Genet. 1992. Vol. 2. P. 318—323.

Spelbrink J.N., Li F.Y., Tiranti V. et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene4-like protein localized in mitochondria // Nat. Genet. 2001. Vol. 28. P. 223—231.

Taanman J.-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1410. P. 103—123.

Tabrizi S.J., Shapira A.H. Secondary abnormalities of mitochondrial DNA associated with neurodegeneration // Biochem. Soc. Symp. 1999. Vol. 66. P. 99—110.

Tan D.J., Bai R.K., Wong L.J. Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer // Cancer Res. 2002. Vol. 62, No. 4. P. 972—976.

Tanaka M., Borgeld H.J., Zhang J. et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria // J. Biomed. Sci. 2002. Vol. 9, No.6. P. 534—541.

Tang Y., Manfredi G., Hirano M., Schon E. Maintenance of human rearranged mitochondrial DNA in long-term cultured transmitochondrial cell lines // Mol. Biol. Cell. 2000a. Vol. 11. P. 2349—2358.

Tang Y., Schon E., Wilichowski E., Vazcuez-Memije M.E. Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): new insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression // Mol. Biol. Cell. 2000b. Vol. 11. P. 1471—1485.

Taylor R.W., Taylor G.A., Durham S.E., Turnbull D.M. The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations //Nucl. Acids Res. 2001. Vol. 29, No. 15. P. 74—74.

Tengan C.H., Moraes C.T. Duplication and triplication with staggered breakpoints in human mitochondrial DNA // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1406. P. 73—80.

Tessa A., Giannotti A., Tieri L. et al. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mtDNA // Eur. J. Hum. Genet. 2001. Vol. 9. P. 147—149.

Wallace D.C., Singh G., Lott M.T. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy // Science. 1988. Vol. 242. P. 1427—1430.

Wallace D.C. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and aging // Novartis Found. Symp. 2001. Vol. 235. P. 247—263.

Wang Y., Michikawa Y., Mallidis C. et al. Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2001. Vol. 98. P. 4022—4027.

Wong L.J., Liang M.H., Kwon H. et al. Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations // Clin. Chem. 2002. Vol. 48, No. 11. P. 1901—1912.

Wooten G.F., Currie L.J., Bennett J.P. et al. Maternal inheritance in Parkinson's disease // Ann. Neurol. 1997. Vol. 41. P. 265—268.

Yang J.H., Lee H.C., Lin K.J. et al. A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin // Arch. Dermatol. Res. 1994. Vol. 286. P. 386—390.

Yasukawa N., Suzuki T., Ishii N. et al. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon–anticodon interaction in a mitochondrial disease // EMBO J. 2001. Vol. 20. P. 4794—4802.

Zeviani M., Moraes C.T., DiMauro S. et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome // Neurology. 1988. Vol. 38. P. 1339—1346.

Заключение

Наука о внеядерных генетических системах на протяжении XX века прошла путь от описания первых пестролистных мутантов, наследующихся по материнской линии, до расшифровки полной нуклеотидной последовательности около 150 митохондриальных и хлоропластных геномов, познания тонких механизмов их экспрессии, раскрытия природы многих аномалий у разных групп эукариот, связанных с изменениями органельных геномов или ядерно-цитоплазматическим конфликтом. Исследование экспрессии генетических систем клеточных органелл привело к пониманию тонких механизмов взаимодействия внутриклеточных геномов; показало, что при доминирующей роли ядра геномы митохондрий и пластид являются неотъемлемыми компонентами эукариотической клетки, позволяющими выполнять онтогенетическую программу развития организма и реагировать на стрессовые факторы окружающей среды. Благодаря детальному исследованию экспрессии геномов клеточных органелл было открыто одно из удивительных явлений — посттранскрипционная коррекция мРНК-матриц, или РНК-эдитинг.

Изучение цитоплазматической мужской стерильности растений привело к открытию ряда фундаментальных процессов в растительной клетке и в то же время позволило получить огромный экономический эффект от использования этого феномена в гибридном семеноводстве многих сельскохозяйственных культур.

Анализ эволюции цитоплазматических геномов позволил установить основные закономерности становления эукариотической клетки и вместе с тем помог решить целый ряд сложных вопросов биосистематики.

Генетики, работающие в этой области, научились создавать новые ядерно-плазменные гибриды, проводить направленную генетическую трансформацию пластид у растений и создавать трансмитохондриальных животных.

Конечно, наряду с очевидными успехами остается еще множество неясных вопросов — мы останавливались на них в каждой из четырнадцати глав этой книги. Особенно бурно развивается сейчас “митохондриальная медицина”, затрагивающая проблемы многих заболеваний, связанных с митохондриальным геномом. Это прежде всего нейродегенеративные заболевания, злокачественные новообразования, геронтологические проблемы и др.

Геномы клеточных органелл, несмотря на их небольшие размеры, оказались действительно особым, захватывающим миром, раскрытие тайн которого уже принесло и, несомненно, еще принесет много удивительных открытий.

Перечень основных публикаций сотрудников лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси (1980—2002 гг.)

Книги

Палилова А.Н. Нехромосомная наследственность. Минск: Наука и техника, 1981. 184 с.

Давыденко О.Г. Нехромосомные мутации. Минск: Наука и техника, 1984. 165 с.

Палилова А.Н. Генетические системы у растений и их взаимодействие. Минск: Наука и техника, 1986. 160 с.

Даниленко Н.Г. Растение против вируса. Минск: Наука и техника, 1992. 88 с.

Давыденко О.Г. Нехромосомная наследственность: Курс лекций. Минск: Изд-во БГУ, 2001. 189 с.

Статьи

Давыденко О.Г. Проявление действия генов мужской стерильности пшеницы, индуцированной акридинами в зависимости от цитоплазмы // Цитология и генетика. 1981. Т. 15, № 6. С. 49–53.

Палилова А.Н., Давыденко О.Г. Влияние генома и плазмона на структуру митохондрий // Цитология и генетика. 1983. Т.17, № 1. С. 3—6.

Давыденко О.Г., Палилова А.Н. Использование морфометрического анализа для изучения влияния генома и плазмона на структуру органелл цитоплазмы // Цитология и генетика. 1983. Т.17, № 2. С. 24–28.

Палилова А.Н., Давыденко О.Г. Дивергенция структуры хлоропластов *Aegilops* и *Triticum*. Сообщение 1 // Генетика. 1984. Т. 20, № 2. С. 291—297.

Палилова А.Н., Давыденко О.Г. Дивергенция структуры хлоропластов *Aegilops* и *Triticum*. Сообщение 2 // Генетика. 1984. Т. 20, № 3. С. 440—447.

Давыденко О.Г. Отклонения в расщеплении по признаку мужская стерильность, вызванные влиянием цитоплазм // Цитология и генетика. 1984. Т. 18, № 3. С. 218—222.

Давыденко О.Г. Экспрессия и трансмиссия признака мужская стерильность в цитоплазмах *Aegilops* и *Triticum* // Сб. тр. Мироновского НИИ селекц. и семенов. пшеницы. Мироновка, 1985. С. 45—48.

Давыденко О.Г. Пестролистность растений сои, индуцированная действием эритромицина // Цитология и генетика. 1985. Т. 19, № 4. С. 277—281.

Давыденко О.Г., Сычева И.М. Морфометрический анализ хлоропластов у мутантов, различающихся по продуктивности // Цитология и генетика. 1986. Т.20, № 6. С. 421—428.

Лугинин Н.В., Давыденко О.Г., Векшин С.Р. Эффект цитоплазм на частоту сестринских хроматидных обменов у пшеницы // Цитология и генетика. 1987. Т. 21, № 6. С. 428—433.

Давыденко О.Г., Крулева М., Данков Т. Влияние на ядрото и цитопламата върху ултраструктурата на митохондрии от листен мезофил на царевица // Генетика и селекция (НРБ). 1987. Т.20, № 3. С. 187—195.

Крулева М., Давыденко О.Г. Влияние на ядрото и цитопламата върху ултраструктурата на хлоропласти от листен мезофил на царевицата // Генетика и селекция (НРБ). 1987. Т.19, № 6. С. 463—471.

Данков Т., Давыденко О.Г., Крулева М., Аношенко Б.Ю. Изменения на морфологичны признаци на растения царевица под влияние на ядро, цитоплазма и среда // Генетика и селекция (НРБ). 1987. Т. 21, № 3. С. 191—199.

Давыденко О.Г., Комарницкий И.К., Самойлов А.М., Глеба Ю.Ю. Внутривидовая изменчивость митохондриального генома у *Triticum aestivum* L. // Доклады АН УССР. Сер. Б. 1988. № 4. С. 58—61.

Давыденко О.Г., Червякова Т.О. Внутривидовая цитоплазматическая изменчивость у пшеницы мягкой // Доклады АН БССР. 1988. Т.32, № 11. С. 1032—1036.

Батуро Ф.Н., Давыденко О.Г., Кадыров М.А., Аношенко Б.Ю. Замещение цитоплазм у сортов ячменя и их селекционный эффект // Доклады АН БССР. 1989. Т. 33, № 7. С. 657—659.

Давыденко О.Г. Роль цитоплазматической изменчивости в эволюции и селекции растений // Цитология и генетика. 1989. Т. 23, № 4. С. 66—76.

Давыденко О.Г., Аношенко Б.Ю. Корреляционный анализ элементов продуктивности и ультраструктуры органелл цитоплазмы у аллоплазматических линий пшеницы // Цитология и генетика. 1989. Т. 23, № 5. С. 66—76.

Давыденко О.Г. Цитоплазматическая изменчивость сельскохозяйственных растений: Автореф. дис... докт. биол. наук. Минск, 1990.

Davydenko O.G. Interspecific polymorphism of mitochondrial DNA and breeding effect of cytoplasmic substitution in common wheat varieties // Proc. Intern. Symp. "Wheat breeding prospects and future approaches". Bulgaria, Albena. 1990. June 4—8th. P. 318—320.

Лугинин Н.В., Давыденко О.Г., Горбачева С.А., Аксенова Е.А. Эффект внутривидовых цитопламатических и ядерных замещений на частоту СХО у ячменя // Доклады АН БССР. 1991. Т.35, № 3. С. 278—282.

Davydenko O.G. Cytoplasmic effect on expression of some morphological traits, transmission and mitotic recombination in allo- and isoplasmic lines. Prof. Kihara Memorial Symposium on cytoplasmic engineering in wheat // Nuclear and organellar genomes of wheat species. Yokohama, Kihara Memorial Foundation. 1991. P. 214–222.

Давыденко О.Г. Внутривидовые эффекты цитоплазм на хозяйственно-ценные признаки пшеницы // Селекция растений: новые генетические подходы и решения. Кишинев: Штиинца, 1991. С. 278—285.

Davydenko O.G., Terekhov A.Yu., Fomchenko N.S. Structural alteration of chloroplast and mitochondrial DNA in progenies of alloplasmic wheat with rye cytoplasm // Wheat Inf. Service. 1992. No. 75. P. 7—13.

Давыденко О.Г., Сычева И.М., Кнатько Е.В. Изоплазматические линии ячменя. Эффект цитоплазм на расщепление //Изогенные линии и генетические коллекции. Новосибирск, 1993. С. 49—52.

Терехов А.Ю., Давыденко О.Г. Полиморфизм митохондриальной ДНК у сои// Доклады НАНБ.1993. Т. 37, № 5. С. 69—71.

Davydenko O.G., Sychova I.M. Cytoplasmic substitution and segregation distortion in wheat and barley //Genetic Conflicts and Parasitism. European Science Foundation Workshop. Paris, 1994.

Аксенова Е.А., Давыденко О.Г. Эффект внутривидовых цитоплазматических и ядерных замещений на частоту хиазм у ячменя // Доклады НАНБ. 1995. Т. 39, № 6. С. 72—74.

Sychjova I.M., Triboush S.O., Danilenko N.G., Davydenko O.G. The collection of allo- and isoplasmic barley lines with PDRF-studied mitochondrial DNA // Barley Genetic Newsletters. 1998. Vol. 28. P. 9—11.

Triboush S.O., Danilenko N.G., Davydenko O.G. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower // Plant Molecular Biology Reporter. 1998. Vol. 16. P. 183—189.

Трибуш С.О., Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Локализация НММ-индуцированных повреждений органельной ДНК внеядерных мутантов подсолнечника типа *chlorina* // Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы международной конференции "Молекулярная генетика и биотехнология". Минск, 1998. С. 267—271.

Sychjova I.M., Aksjonova H.A., Davydenko O.G. The effect of intraspecific cytoplasmic substitution on the frequency of chiasmata and sister chromatid exchanges and on marker gene segregation // Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement" Austria: WUV-Universitatsverlag. 1998. P. 168—174.

Давыденко О.Г., Трибуш С.О., Даниленко Н.Г., Сычева И.М. Сравнительный анализ митохондриальной ДНК у изо- и аллоплазматических линий ячменя // Генетика. 1998. Т.34, № 6. С.788—795.

Давыденко О.Г., Силкова Т.А., Фомченко Н.С., Маврищева Е.Б. Изучение возможности использования цитоплазмы *Aegilops kotschyii* для получения гибридных семян озимой пшеницы // Докл. НАНБ. 1998. Т. 42, № 6. С. 86—89.

Емельянова А.В., Синявская М.Г., Пфоссер М., Давыденко О.Г. Наследование ДНК митохондрий и хлоропластов у ржано-пшеничных гибридов // Доклады НАНБ. 1999. Т. 43, № 2. С. 79—82.

Силкова Т.А., Давыденко О.Г., Фомченко Н.С., Маврищева Е.Б. Завязываемость семян у стерильных линий на цитоплазме *Aegilops kotschyii* в условиях свободного ветроопыления // Биологическая продуктивность растений и пути ее повышения. Горки, 1999. С. 46—49.

Triboush S.O., Danilenko N.G., Ulitcheva I.I., Davydenko O.G. Location of induced mutations and reversions in the chloroplast genome of *Helianthus annuus* // Plant Growth Regulation. 1999. Vol. 27. P. 75—81.

Силкова Т.А., Давыденко О.Г., Фомченко Н.С., Маврищева Е.Б., Толстова В.А. Восстановление фертильности и проявление гетерозиса у гибридов F_1 озимой пшеницы на цитоплазме *Aegilops kotschyii* // Доклады НАНБ. 2000. Т.44, №1. С. 76—78.

Goloenko I.M., Teljatnicova A.A., Davydenko O.G. Some nuclei-cytoplasmic combi-

nations of barley substituted lines collection change the productivity characteristics // Barley Genetic Newsletters. 2000. V. 30. P. 28—31.

Силкова Т.А., Давыденко О.Г., Горбаченко Ф.И., Фомченко Н.С., Толстова В.А. Показатели некоторых хозяйственно важных признаков сортов и гибридов F_1 подсолнечника, выращенных в условиях Беларуси // Проблемы производства продукции растениеводства и пути их решения. Горки, 2000. С. 216—219.

Goloenko I.M., Teljatnicova A.A., Lukhanina N.V., Davydenko O.G. Some nuclei-cytoplasmic combinations of barley substituted lines collection change the productivity characteristics // Proc. Int. Conf. "Genetic Collections, Isogenic and alloplasmic lines" Jul 30—Aug 3, 2001. Novosibirsk, 2001. P. 70—74.

Sinyavskaja M., Aksyonova E., Dubovets N., Zabenkova K., Danilenko N., Davydenko O. Alloplasmic wheat with rye cytoplasm: peculiarities of organelle genomes integration and inheritance // Proc. Int. Conf. "Genetic Collections, Isogenic and alloplasmic lines" Jul 30—Aug 3, 2001. Novosibirsk, 2001. P. 104—107.

Даниленко Н.Г. РНК-эдитинг: генетическая информация корректируется после транскрипции // Генетика. 2001. Т. 37, № 3. С. 294—316.

Голоенко И.М., Давыденко О.Г., Шимкевич А.М. Нарушение расщеплений маркерных ядерных генов у алло- и изоплазматических линий ячменя // Генетика. 2002. Т. 38, № 7. С. 791—797.

Goloenko I.M., Lukhanina N.V., Shimkevich A.M., Aksyonova E.A., Danilenko N.G., Davydenko O.G. Productivity characteristics of substituted barley lines collection with marked chloroplast and mitochondrial genomes // Cellular & Molecular Biology Letters. 2002. Vol. 7, № 2A. P.483—491.

Научное издание

Даниленко
Нина Генусовна
Давыденко
Олег Георгиевич

Миры геномов органелл

Редактор
Я.В.Мартинович

Корректор
И.Д.Юхневич

Макетирование
Н.М.Апанасевич

Графические работы
В.В.Котович,
П.Н.Анансон

Технический редактор
А.М.Толстая

Художественное оформление
В.В.Котович

Подписано в печать с диапозитивов заказчика 11.06.03. Формат 70 × $100^{1}/_{16}$. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная. Усл. печ. л.,40,3. Уч.-изд. л. 36,5.
Тираж 1000 экз. Заказ 1549.

Издательство «Тэхналогія». ЛВ № 73 от 12.11.02. 220007. Минск, ул. Левкова, 19.

Сертификат издательской деятельности МН № 0000385, выданный 19.03.99
Белорусской торгово-промышленной палатой

Открытое акционерное общество "Полиграфический комбинат им. Я.Коласа"
220600, Минск, ул. Красная, 23.

Даниленко Нина Генусовна –
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. Автор 50 научных работ.

Давыденко Олег Георгиевич –
доктор биологических наук, член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси. Заведующий лабораторией нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Автор более 150 научных работ, в том числе монографии «Нехромосомные мутации» и учебника «Нехромосомная наследственность».