

ВОЗМОЖНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ПРАЙМЕР-
ОПОСРЕДОВАННОЙ РЕПЛИКАЦИЕЙ В
МИТОХОНДРИЯХ И ХРОМОСОМАЛЬНОЙ ДНК.
ПОДДЕРЖАНИЕ НЕ ХАОТИЧЕСКОЙ
РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОМА
МИТОХОНДРИЙ

А.М. Дейчман

(amdeich@rambler.ru; сайт <http://amdeich-var-reverse-translation.ru/>)

Учреждение Российский Онкологический Научный Центр им.Н.Н.Блохина
Российской Академии Медицинских Наук, РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН

Резюме: В статье проведен анализ возможных причин появления, поддержания и контроля «РНК/ДНК-нуклеотидной чистоты», т.е. смешения/внедрения рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотидные нити ДНК митохондрий (хлоропластов) и, отчасти, хромосомной ДНК эукариот (прокариот, фагов) при праймер-зависимых процессах (репликации, репарации, сортирования промоторов, других). Рассмотрены традиционный и дополняющий его гипотетический взгляды на причины выше названных «появления, поддержания и контроля».

Ключевые слова: митохондрии; мтДНК; ДНК; короткие РНК; вПОТ, переменная Поэпитоная Обратная Трансляция; НЭ, нуклеиновый эквивалент, эпитопа; ВНП, вектор-подобная нуклеиновая последовательность.

POSSIBLE MANAGEMENT PRIMER-MEDIATED
REPLICATION IN MITOCHONDRIAL AND
CHROMOSOMAL DNA. MAINTAINING NOT RANDOMLY
EXPRESSION REGULATION MITOCHONDRIAL
GENOMES

A.M. Deichman

(amdeich@rambler.ru; site <http://amdeich-var-reverse-translation.ru/>)

Enterprise of Russian Cancer Research Center by N.N. Blokhin Russian
Academy of Medical Sciences, RCRC by N.N.Blokhina RAMS

Abstract: In the article analyzes possible causes, maintenance and control “RNA/DNA nucleotide purity”, i.e. mixing/introducing

ribonucleotides in deoxyribonucleotide DNA strands mitochondrial (chloroplast) DNA and, in part, the chromosomal DNA of eukaryotes (prokaryotes, phages) at the primer-dependent processes (replication, repair, promoters sorting, other). Considered traditional and complementary it's the hypothetical views on the causes above-mentioned "the emergence, maintenance and control".

Key words: mitochondries; mtDNA; DNA; short RNA; vIERT, variable Individual Epitope Reverse Translation; NE, nucleic equivalent of epitope; VLNS, vector-like nucleic sequence.

Содержание

Введение

Повторим кратко

Митохондрии и хлоропласты

Рибонуклеотиды в геноме митохондрий

Уточнение моделей репликации мтДНК

Праймаза и праймер у млекопитающих

Репликация мтДНК млекопитающих

Область 7S ДНК мтДНК

Область D-петли (D-loop) мтДНК

Малые РНК органелл

Малые РНК митохондрий

Малые РНК хлоропластов

Примирование репликации в кинетопластах (митохондриях)

трипаносом

Репликация и примирование в хромосомах

Репликация и репарация хромосом дрожжей

Праймер-опосредованная репликация у бактерий

(их плазмид, фагов)

Репликация плазмиды ColE1

Примирование репликации фагов

Малые РНК бактерий

Ссылки

Введение

Данная обзорно-теоретическая статья является продолжением предыдущей [1], в которой был представлен новый гипотетический механизм варибельной поэпитопной обратной трансляции (**вПОТ**) эпитопа. Этот механизм, согласно нашим предположениям, воспроизводит короткие олигорибонуклеотидные последовательности (т.н. нуклеиновые эквиваленты эпитопа, **НЭ**) в ~15-30 нуклеотидов (подробности см. в [1,2,5]). Нуклеиновые эквиваленты, переносимые **ВНП** (вектор-подобными нуклеиновыми последовательностями; ретротранспозоном) или **РНП**-(ДНП)-частицами (образуя комплекс с белками), представляется, способны:

1. **регулировать** функции широко распространенных коротких РНК (кодируемых ядерным геномом микро РНК, miRNAs; малых интерферирующих РНК, siRNAs; piRNAs герминативных клеток; др.; участвуют практически во всех процессах роста, развития, дифференцировки, пролиферации – в норме и при самых различных патологиях) и их мРНК/РНК-мишеней;
2. **вносить** точечные/несколько-нуклеотидные и регуляторные **изменения** в геномы (ядра, органелл), его экспрессию у эукариот (и прокариот) [1];
3. **взаимодействовать** с **комплементарными** участками некоторых РНК в цитоплазме.

При этом, предполагается, возможно достижение некоторых важных для клетки и ее генома регуляторных (экспрессия генома), защитных (внутриклеточных; иммунных) и эволюционных (поддержание стабильности/пластичности/варибельности генетической и эпигенетической составляющих целостности генома) целей. Ранее предлагаемый вПОТ-механизм [1] сравнивался со схожим, но не тождественным ему **гТ-механизмом** (от “reverse Translation”) М.Нашимото [50], смысл функционирования которого также состоит в возможности превращения олигопептида (т.н. «примитивного белка») в соответствующий олигонуклеотид. Однако, по мнению этого автора, с появлением современных репликативного, транскрипционного и трансляционного аппаратов (а также в связи с угрозой генетической перегрузки), гТ-механизм клеткой был отсечен [50].

Повторим кратко

вПОТ-механизм заключается в **варибельном** переписывании («ретрансляции») олигопептидной последовательности (фрагмента белка, эпитопа в ~5-10 аминокислот) в свой моно-(15-30)_{n=1} или несколько-копийный амплифицированный нуклеиновый

(олигонуклеотидный) эквивалент, НЭ в $(15-30)_n$ нуклеотидов; целочисленное n , вероятно, не превышает 4-5 единиц; если $n=1$, то это минимальный НЭ. Следует заметить, что случай воспроизводства моно- (НЭ одного типа) или гетерогенных (НЭ разных типов) амплифицированных вариантов рибо-НЭ (помимо того, что уже предложено в отношении минимального НЭ [1,8,5,3,6,др.]), означал бы, также, потенциальную возможность формирования аптамер-подобных структур, способных функционировать (в том числе конкурентно, – с подобными внутриклеточными структурами) в различных режимах, например: 1. молекулярных рибопереключателей метаболически активных сайтов в мРНК; 2. создания структур, тропных к отдельным низкомолекулярным реагентам, например, концевым аминокислотам в составе белкового эпитопа (в частности, локализованного/«застрявшего» на внутренней мембране митохондрий), – а это уже близко к варианту «обратной-трансляции»/гТ-механизма по М.Нашимото [50]; др.

В выше упомянутой статье [1] приведены несколько причин, в связи с которыми механизм может быть варибельным в каждой из трех предложенных моделей вПОТ-механизма. Основными среди них являются:

1. вырожденность генетического кода – аминокислота (кроме однокодонных метионина, триптофана), исходно кодируемая одним кодоном, при «ретрансляции» может быть переписана в другой кодон; (для вПОТ-механизма моделей 1,2; см. ниже);
2. наличие нестандартных нуклеотидов в антикодонах (например, псевдоуридина) и антикодонных участках митохондриальных тРНК (например, риботимидина/псевдоуридина в Т ψ -шпильке тРНК). До 25% всей длины тРНК могут составлять почти 5 десятков посттранскрипционно модифицированных ферментами, – метилированных/гидрированных/др., – минорных рибонуклеотидов, изменяющих конформацию тРНК); (для моделей 1,2; см. ниже);
3. резкое ограничение количества митохондриальных тРНК (у животных, грибов по 20-22 тРНК, у высших растений до 27 тРНК; они короче цитоплазматических и, например, длина варибельной V-петли у различных тРНК варьирует от 3 до 20 нуклеотидов) по сравнению с кодируемыми ядром (цитоплазматическими) и хлоропластами тРНК (32 различных гена, всего 37 генов, – вместе с пятью амплифицированными); (для моделей 1,2; см. ниже);
4. неинвариантное парное взаимодействие каждой из аминокислот эпитопа с аминокислотами из Аа-тРНК мембраны митохондрий (в отличие от почти жестко-комплементарного взаимодействия у нуклеотидов); (для модели 2; см. ниже);

5. ошибки интактных Аа-тРНК-синтетаз (модель 1) и переписывающих ферментов (полимераз); (модели 1,2; см. ниже); то же касается мутированных форм ферментов;
6. участие механизма посттранскрипционного редактирования РНК (когда, например, модифицируются нуклеотиды антикодона/прилежащих-участков тРНК, а также мРНК Аа-тРНК-синтетаз [58]);
7. варьирование длины посттранскрипционно наращиваемой ССА-концевой части тРНК/Аа-тРНК (на 3–6 нуклеотидов) за счет Аа-тРНК-нуклеотидилтрансферазной активности эукариот (у прокариот и некоторых процессированных псевдогенов тРНК эукариот ССА-конец кодируется); одновременно облегчается аминоацилирование и расширяется спектр дополнительно включаемых нуклеотидов (CMP > AMP > UMP > GMP) [54];
8. др. механизмов.

Предполагаемое место действия вПОТ-механизма, – трудно проницаемые даже для малых ионов внутренние мембраны клеточных **органелл** (митохондрий, Мг; хлоропластов, Хп), содержащие неотделимые даже в условиях жесткого лизиса (тритоном X-100, др.) фракции тРНК [15]. Дополнительной причиной, предрасполагающей к возможности существования в митохондриях механизма формирования вариабельных нуклеотидных структур, является тот факт, что уровень мутаций здесь на порядок больше, чем, в среднем, в хромосомной ДНК.

Отступление 1: отдельно следует отметить многие (и отличные от белок-синтезирующей) функции, выполняемые тРНК: роль затравки при обратной транскрипции (3'-концы тРНК, 17-20 нуклеотидов, комплементарны участкам РНК ретровирусов/ретротранспозонов; у растений, в свою очередь, 3'-концы РНК многих вирусов обладают тРНК-подобными структурами с акцепторной активностью). Некоторые тРНК участвуют также: в биосинтезе пептидогликанов (компонентов внешней оболочки некоторых бактерий), некоторых аминокислот; переносе аминокислот: через внешнюю мембрану клеток, и от аминоацил-тРНК, – на N-конец полипептидной цепи (при посттрансляционной модификации белков с участием аминоацил-тРНК-трансфераз); во внутриклеточной деградации белков; в качестве кофактора в реакции восстановления аминокислоты (например, глутаминовой кислоты при биосинтезе хлорофилла).

Кроме того, необходимо учесть, во-первых, что число генов (псевдогенов), кодирующих тРНК одной и той же аминокислоты, может различаться у разных организмов более чем на порядок. Во-вторых, общее число генов тРНК у разных организмов также варьирует сильно (на 1-2 порядка): например, у кишечной палочки *E.coli* их около 70, у человека – свыше 1 тысячи, а у шпорцевой лягушки *X.laevis* – порядка 7 тысяч. Это важно, т.к. тРНК – один из ключевых адапторов, во-первых, при синтезе белка, и, во-вторых, возможно, – при гипотетической ретрансляции белкового эпитопа в свой нуклеино-

вый эквивалент (НЭ). При смене поколений организмов и условий окружающей среды, выбор более подходящих вариантов тРНК для каждой из аминокислот, возможно, является необходимым условием воспроизводства функционально активных тРНК (и не только в отношении синтеза белка). Тем более, что ВПОТ-механизм, теоретически, – один из тех, что позволяет нарабатывать олигонуклеотидные последовательности (НЭ; не исключено, как сказано, – со свойствами аптамеров и рибопереключателей) выше названных отдельных участков генов/псевдогенов, – в частности, тРНК. Еще более важно то, что это может быть механизмом воспроизводства повторяющихся последовательностей, – самых многочисленных компонент ядерного генома клетки, природа появления которых даже не обсуждается.

Множественность процессированных псевдогенов (например, часто содержащих 3'-ССА тРНК; мРНК, рРНК, др.) в геноме интересна тем, что указывает на включение обратной транскрипции в образование псевдогенов. В среднем, число процессированных псевдогенов в геноме больше (иногда на несколько порядков), чем функциональных генов. И эти первые, более быстро накапливая точечные мутации и имитируя нуклеотидный состав под нефункциональное окружение, изменяются так (в процессе т.н. композиционной ассимиляции), что сходство между ними и окружением стирается и не определяется молекулярными зондами функциональных гомологов.

Органеллы в клетке представлены большим числом (сотни и тысячи), несколькими их разновидностями, содержащими отличное от стандартного число копий генома (часто, – после мутаций мтДНК), и характеризуются, в норме, высокой частотой и асинхронностью копирования своих геномов (при патологии, например, кардиомиоцитов, асинхронность сменяется синхронностью [16]). Кроме того, частота ошибок в хромосомной ДНК, обычно, не превышает 1 на 10^9 – 10^{10} нуклеотидов (за генерацию клеточного цикла); в митохондриальной ДНК эта частота, в среднем, на порядок больше.

Эпитоп, предполагается, локализуется («застревает») на внутренней мембране митохондрии. Это приводит к сбою в энергетическом и биохимическом обеспечении функционирования целых органелл клетки: угнетается синтез АТФ, ДНК, РНК, белковых компонент дыхательной цепи; нарушаются электронный транспорт, метаболические циклы. Сближенные антикодоны, антикодоновые участки тРНК/Аа-тРНК (модели 1, 2), при определенных обстоятельствах, предполагается, служат мини-матрицей, – или последовательно вырезаются и сшиваются (модель 3; сходный механизм функционирует в отношении уридиновых делеций/вставок при «гидд»-РНК, gRNAs-направляемом редактировании пре-мРНК в трипаносомах), – что ведет к синтезу одного или нескольких вариантов НЭ (подробности см. в [1,2,5]). Сортингу эпитопов на мембране может предшествовать фрагментация белков (своих/чужеродных), в частности, в протеасомах (где деградируют и процессируют любые

избыточные, поврежденные или чужеродные протеиды; определенный вклад в этот процесс могут вносить активности лизосом, фаголизосом соответствующих типов клеток). Таким образом, обеспечивается не только взаимодействие между белково-фенотипической и нуклеиновокислотной-генотипической компонентами (вернее, составляющими их фрагментами) клетки, но и, предположительно, необходимая обратная связь между ними в рамках относительно более замкнутой системы (...→[митохондрии→цитоплазма/ядро→митохондрии]_n→...). Такая связь может обеспечить в клетке (организме) т.н. фено-генотипическое равновесие [7].

Сам вПОТ-механизм, предполагается, связан с функционированием специальной внутриорганелльной частицы – гипотетической «ретранслосомой». Динамически действующими компонентами частицы являются эпитоп/тРНК-(Аа-тРНК)/НЭ (все три являются наномолекулярными включениями) и различные факторы органелл (варианты эндонуклеазной, экзонуклеазной, лигазной, РНК-полимеразной, ДНК-полимеразной, обратнотранскриптазной, других активностей репликативного, транскрипционного, трансляционного и РНК редактирующего аппаратов), кодируемые органеллами/ядром.

Характерная предполагаемая черта «ретранслосомы» – обеспечение **самоорганизации** всех в.н. компонент в контексте взаимодействия разных уровней организации супрамолекулярной системы (от элементарных частиц, прежде всего фотонов, атомов – до биомакромолекул, белков и нуклеиновых кислот, и их фрагментов, включая эпитоп, и его НЭ) [5]. Создается впечатление, что «химия взаимодействия» таких компонент, – вторична по отношению к не вскрытым пока факторам самоорганизации множества мультимерных супрамолекулярных структур, молекулярные и макромолекулярные субъединицы которых являются лишь малой частью общего процесса формирования многоэтапных сверхсложных взаимодействий между частицами/структурами (их частями) разных уровней [5].

Мембраны, известно, обеспечивают тонкие ансамблевые взаимодействия расположенных на них молекул. Поэтому такой механизм может работать сопряженно с мембрано-связанными белок-синтезирующим, репликативным аппаратами, а также с тесно связанными с ними путями воспроизводства энергетических и биохимических компонент органелл и процессом редактирования РНК. В настоящее время усиливается мнение, что митохондрии симбиотически служат для регуляторных целей клетки (апоптоза, обеспечения многих сигнальных путей, др.) в не меньшей степени, чем для воспроизводства в ней энергии и биохимического метаболизма. В норме мтДНК, в отличие от ядерной ДНК, не метилирована.

Митохондрии (и хлоропласты)

Размеры генома митохондрий высших животных, 15-20 т.п.н., в среднем меньше таковых у высших растений на порядок (но, например, в дыне, эта величина достигает более двух порядков); и более чем на порядок меньше, – по сравнению с хлоропластами (а редактирование хпРНК, по сравнению с мтРНК, наоборот, снижено более чем на 1-2 порядка). Размеры/вариабельность мтДНК высших растений в значительной степени определяются выраженными здесь процессами редактирования РНК и ассоциированной с повторяющимися последовательностями рекомбинантогенности; кроме того, часть последовательностей имеет ядерное и хлоропластное происхождение. Количество митохондрий здесь составляет ~50-2000 на клетку, и каждая митохондрия содержит от 1 до 100 копий генома [10].

Митохондрии животных содержат ограниченный набор генов, и, например у позвоночных, он кодирует 22 тРНК, 2 рРНК и 13 мРНК белков электрон-транспортного пути и окислительного фосфорилирования; гены фланкированы, по крайней мере, одним геном тРНК (вырезаемым RNase P, узнающей характерные шпилечные структуры), и их экспрессия всегда требует удаления соответствующих тРНК. Большая часть белков, функционирующих в органеллах, кодируется ядром; большинство генов мтДНК расположены на тяжелой (лидирующей) нити; направление транскрипции с промоторов генов обеих нитей мтДНК может быть различным. Изменчивость митохондриального генома не равномерна, но, в среднем, в 5-10 раз превышает таковую для генов и ДНК хромосом [70,19]. Наиболее полиморфна гипервариабельная некодирующая область (средняя изменчивость здесь составляет 1.7%), т.н. Д-петли (D-loop), где фиксированы множественные замены и делеции/вставки. Уровень мутаций в Д-петле характеризует эволюционные изменения внутри видов и среди близко родственных видов. Также не исключена здесь возможность инициации рекомбинаций: необходимая для этого машина, как и в случае растений, грибов и протист [28], существует.

У многих млекопитающих митохондриальный геном имеет очень короткие межгенные области (обычно менее 3-х, иногда не более 25 п.н.), практически не содержит интронов и содержит отдельные нуклеотиды, относящиеся к частично перекрывающимся генам. Оплодотворенной клеткой наследуется ДНК митохондрий, обычно, от одного из родителей, много чаще от матери, отсюда – преобладание неменделевского характера наследования; у некоторых видов, например, насекомых, выражено отцовское наследование; сперматозоиды многих млекопитающих также, показано, способны передавать небольшое, по сравнению с содержащимися в ооцитах,

число митохондрий [18]. Также известно, что соотношение транзиций/трансверсий здесь не равно 1: у человека, в частности, это соотношение, для области О_H-сайта репликации и Д-петли, составляло 32 единицы [19]; это соотношение много больше, чем даже при мутациях в случае первичных/вторичных антител (в иммуноглобулинах) [4]. Митохондрии и хлоропласты многих биологических видов, подобно бактериям, имеют кольцевую ДНК (часто одну копию), в то время как у некоторых других видов, ДНК органелл, как и хромосомы эукариот, – линейна. Кольцевая ДНК некоторых вирусов, а также плазмид, прокариот и органелл, лишена белкового окружения.

Время жизни митохондрий, способных обновляться при делении клетки (напоминающем таковое у бактерий) и увеличении функциональной нагрузки, определяется процессами роста, деления и слияния полуавтономных органелл (включая промитохондрии), и исчисляется несколькими сутками. Предполагают, что митохондрии делятся таким образом (асимметрично), чтобы максимально были сохранены исходно-эталонный (стволовой) геном органеллы, и функционирующая измененная, в частности, включением рибонуклеотидов, его копия. Большинство РНК нуклеотидов, затем, удаляются нуклеазами и заменяются на ДНК нуклеотиды ДНК-полимеразной активностью [68]. Вклад каждой из нитей ДНК митохондрий в этот процесс обоюден (последовательно/параллелен) и относителен, т.к. одна из них (более изменчивая легкая L-нить) синтезируется на другой (более консервативной тяжелой H-нити), а затем (или одновременно; и в зависимости от модели репликации, функционирующей в конкретной клетке) все происходит наоборот: на L-нити синтезируется H-нить. Но при последующем делении конкретной органеллы, когда оно состоится, все повторяется. Поскольку таких органелл много, и каждая из них делится не однократно, и, как предложено в данной концепции, НЭ (в виде ВНП/РНП) может из митохондрии «выноситься», – все это, в конце концов, может усиливать структурно-функциональную нагрузку и риск появления не реparable повреждений в ядерном геноме.

Отступление 2: Если регуляция экспрессии митохондриального/ядерного геномов и некоторых РНК цитоплазмы действительно зависит от НЭ (фрагментов мтДНК), и учитывая усиленное деление и повышенную повреждаемость генома митохондрий (особенно, некодирующей и репликативно важной области Д-петли), то можно предположить, что небольшие изменения в мтДНК могут иметь серьезные последствия для целой клетки/организма (в норме и патологии). То, что размеры/вариабельность мтДНК высших растений в значительной степени зависит от процессов редактирования РНК и связанной с повторяющимися последовательностями рекомбинантогенности, а также то, что часть

последовательностей мтДНК имеет общее происхождение с ядерным и хлоропластным геномами, не противоречит представлениям о сопряженности этих процессов с вПОТ/ВНП-передача механизмами (когда НЭ встраивается в ВНП или образует комплекс с белками, РНП, и в таком виде может переноситься между ДНК-содержащими органеллами клетки животного, предпочтительно в направлении митохондрии→ядро, и между клетками; у высших растений это также может быть хлоропласты→митохондрии/ядро-направление, хотя, как сказано выше, фиксированы и другие варианты).

Рибонуклеотиды в геноме митохондрий

Уже **почти 30 лет** известно, что реплицируемая и даже нереплицируемая ДНК митохондрий (мтДНК) реально содержит рибонуклеотиды [29], не являющиеся артефактом. Природа, а во многом и смысл их появления, до сих пор мало ясны, но при этом время репликации мтДНК удлиняется на ~2 часа, – что связывают с последующей их заменой на дезоксирибонуклеотиды [68]. В различных тканях млекопитающих (человека, мыши, крысы, др.) рибонуклеотиды определены как в нереплицируемой, так и, но в гораздо большой степени, в реплицируемой мтДНК. Причем в реплицируемой мтДНК это справедливо как для Н-тяжелой нити (т.н. лидирующей при репликации ДНК; преобладают пурины), – так и, но много интенсивнее, для L-легкой (т.н. отстающей; преобладают пиримидины) нити митохондрий. В нереплицируемой мтДНК обнаруживают почти одинаково равномерное распределение не избыточного количества рибонуклеотидов в обеих нитях. В реплицируемых нитях это распределение неравномерно, рибонуклеотидов в новосинтезируемой L-нити не только много больше, но, также, здесь отмечены локальные участки повышенного их скопления (это напоминает, в частности, распределение мутаций/гипермутаций в отдельных областях, т.н. CDRs, реаранжированных генов иммуноглобулинов). Однако и в L-нити также имеются участки, содержащие рассеянные рибонуклеотиды.

Основные единичные сайты инициации репликации (major-sites), ориджны тяжелой (O_H) и легкой (O_L) нитей, располагаются в некодирующей области и разнесены в пространстве, времени и направлении действия [68]. У человека O_H -ориджн находится в районе 110-441 (всего 331), а O_L -ориджн – 5721-5798 (всего 77) нуклеотидов. Число сайтов инициации репликации (как и репликонов) и транскрипции у разных биологических видов может несколько варьировать [10]. В новосинтезированной H-нити наиболее часто встречаются редкие рибонуклеотиды (в частности, в печени крыс, – через каждые ~500 нуклеотидов). Только в новосинтезированной L-нити встречались одновременно редкие рибонуклеотиды и кластероподобные очажки (patches) из нескольких рибонуклеотидов

[68]. Качественно этот вывод сохраняется для обеих моделей синтеза мтДНК (асинхронного/сдвоенного синтеза нитей; см. ниже).

К настоящему времени стало ясно, что принятая модель асимметричной нить-сдвигающейся репликации мтДНК является упрощенной, и в некоторых генетических системах сайтов репликации, прежде всего в L-нити, бывает несколько, но инициация неосновных сайтов востребована много меньше (касается обеих моделей синтеза мтДНК) [65]. Это следовало из анализа выделенных методом двумерного ДНК-гельэлектрофореза (2DNAGE) специфического класса репликационных интермедиатов (RIs), в которых обнаружилась РНК, включаемая в отстающую L-нить на протяжении всей ее длины (сходный результат был получен и при использовании метода атомной микроскопии) [65]. Среди этих RIs высокоочищенных митохондрий, и после переваривания однонитевых фрагментов нуклеиновых кислот, более часто встречались гибридные РНК/ДНК-дуплексные структуры, – свидетели реального пребывания рибонуклеотидов в нитях мтДНК (прежде всего в L-нити, в которой их избыток ведет к наибольшей фрагментации L-нити), превращающихся при участии ДНК-полимеразной активности в ДНК-нуклеотиды [68].

Была выдвинута идея, что отстающая L-нить изначально, и в значительной степени, закладывается в виде РНК (отдельных/нескольких рибонуклеотидов). Затем, в процессе созревания, РНК-нуклеотиды последовательно заменяется ДНК-нуклеотидами, включаемыми митохондриальной ДНК-полимеразой-γ (POLG), но точные механизмы и события этого сценария неизвестны. Инициация синтеза с лидирующей нити также требует участия РНК-праймеров, воспроизводимых, в частности, при транскрипции с промотора легкой нити (LSP). Новосинтезированный полицистронный транскрипт процессирует до отдельных мРНК и тРНК [65,27].

Праймер, возможно, образуется в результате:

1. надреза транскрипта RNAase MRP. Это рибонуклеопротеин, имеющий две функции в 2-х органеллах: инициации репликации мтДНК, и процессинга ядерной рРНК; в контексте митохондриально-ядерных взаимоотношений было бы интересным знать, – в какой последовательности. RNAase MRP эволюционно связана с RNAase P (также рибонуклеопротеин);
2. терминации транскрипции специфическими последовательностями мтДНК [65]. Интересно, что размер выше расположенных у каждого из сайтов инициации и узнаваемых при транскрибировании в мтДНК последовательностей (в области 19–39 п.н.), составляет 21 нуклеотид [27] (соответствует длине НЭ).

Предполагают, что способ инициации репликации лидирующей Н-нити мтДНК похож известному для однонаправленной репликации

бактериальной плазмиды ColE1 (когда регулируется длина рабочего участка РНК-прайма, примирующего ориджн репликации), ее рBR-производных (созданных на основе репликона природной плазмиды ColE1 вместе с генами устойчивости к антибиотикам) [25,27] и бактериофагов [27] (см. раздел «Репликация у бактерий»).

Отступление 3: Поэтому заметим, что в.н. терминация, надрез и инициация репликации, потенциально, могут регулироваться комплементарным взаимодействием НЭ с участком транскрипта (или РНК и ДНК органеллы) и/или РНК-прайма репликации.

Уточнение моделей репликации мтДНК

Возможность сдвоенного (“coupled”) синтеза обеих нитей в качестве доминирующей модели стала очевидной после обнаружения различной длины ДНК/РНК-дуплексов (и в новом соотношении с фрагментами одонитевой ДНК, онДНК) и различных РНКаз, деградирующих и, тем самым, маскирующих присутствие рибонуклеотидов в онДНК и днДНК (двунитевых ДНК) фрагментах обеих (особенно L) нитей мтДНК [68]. РНК-затравки, возможно необходимые для инициации транскрипции, и РНК-праймеры, необходимые для инициации и шагов репликации обеих (H и L) нитей мтДНК, в разных генетических системах воспроизводятся РНК-полимеразами или отличными от них, но родственными РНК-полимеразами, – праймазами [65]. Вероятно, они имеют общего предка – чем, возможно, и объясняется использование ими иницирующих рибонуклеотидных затравок. Одновременно, есть и функциональное объяснение: неточная иницирующая затравка, в дальнейшем, должна быть отделена, а образовавшаяся брешь – достроена высокоточной ДНК-полимеразой [13].

Эти РНК воспроизводятся не только в органеллах (митохондриях/хлоропластах), но и в других генетических системах и ДНК-содержащих структурах (у некоторых плазмид [12], фагов [23,65], бактерий [65], вирусов [21], дрожжей [66,45], хромосомной ДНК эукариот [57, 65]), основанных на репликации как «голых» кольцевых молекул ДНК, так и ядерной ДНК эукариот, комплексирующих с белками. Нуклеотиды РНК-затравок, реальных и потенциальных праймеров (фрагментов новосинтезированных транскриптов, РНК-продуктов процессинга, деградации мРНК; возможно, коротких РНК, антисмысловых РНК), необходимые, соответственно, для инициации транскрипции и отдельных шагов репликации, удаляются, хотя не всегда эффективно, несколькими РНКазами. Это RNAase H, S1-нуклеаза, RNAase One, др.

RNAase-H, во-первых, удаляет основную массу рибонуклеотидов. Их, как правило, должно быть более 4-х (последний нуклеотид

удаляется 5'-экзонуклеазой FEN1 [70]). При меньшем числе рибонуклеотидов RNAase H производит случайные надрезы. Заметим, однако, что разрез, даже если он случайный, – а тем более, если их несколько, – также может быть сайтом инициации различных процессов, – по крайней мере, репаративных, репликативных, транскрипционных, рекомбинационных, др.; тем более, что и сайты инициации в.н. процессов не всегда единичны. Во-вторых, RNAase-H, таргетируя рибонуклеотиды, расщепляет ДНК до одонитевых фрагментов длиной 100-1000 нуклеотидов [68]. S1-нуклеаза способствует превращению замкнутых мтДНК в разомкнутые и линейные ее формы. RNAase One, надрезая онДНК, деградирует интермедиаты из неочищенной мтДНК в смесь онДНК/днДНК-фрагментов. Две последние РНКазы могут удалять 1-4 рибонуклеотида из более длинных, чем олигонуклеотидные, ДНК-последовательностей. Рибонуклеотидные вставки в ДНК предрасполагают к образованию сайтов деградации как в естественных условиях, – и при активном участии рибонуклеаз и полимераз, частично обладающих этой активностью, так и в эксперименте, – при очистке, экстракции нуклеиновых кислот, обработке их щелочью, нагреванием. Нейтрализация РНКаз позволяет сохранить рибонуклеотиды в нитях ДНК.

Праймаза и праймер у млекопитающих

Митохондриальная РНК-праймаза млекопитающих (POLRMT), используемая транскрипционной машиной органеллы для синтеза РНК-праймера при инициации репликации отстающей L-нити мтДНК (с Н-нити), до недавнего времени (2008 года) только предполагалась существующей [65]. Эта РНК-полимераза оказалась высоко процессивной в отношении длинных областей днДНК и много менее эффективно синтезировала небольшой РНК-праймер длиной в 30-60 (25-75) нуклеотидов на онДНК-матрице. В целом, праймазы могут быть как отдельным ферментом, например у бактерий, так и входить в качестве субъединицы в ДНК-полимеразу (как, например, у ДНК-полимеразы- α животных) [13].

Выше названный короткий праймер, как считают авторы [65], мог быть использован ДНК-полимеразой- γ (PolG; у человека локализована в 15q25 области генома) для элонгации синтеза ДНК in vitro. PolG состоит из нескольких идентичных субъединиц с молекулярной массой около 50 kD. Она не обладает активностью RNAase-H вирусных ревертаз, но обладает ограниченной обратно-транскриптазной активностью, – что, вероятно, необходимо для репликации мтДНК, содержащей несколько рибонуклеотидов. Более того, предполагают, что PolG или другая полимеразы должна обладать и РНК-зависимой-

РНК-полимеразной, RdRp, активностью [68]; аналог этого фермента имеется и в хлоропластах [13].

Митохондриальный белок mtSSB, связывающий онДНК, уменьшал синтез праймера, но стимулировал праймер-зависимый синтез ДНК, т.к. после расплетающего действия геликазы (требующего 2-х молекул АТФ для разделения каждой пары оснований), mtSSB выправлял и вытягивал аутокомплементарные вторичные структуры онДНК [13]. Минимальная реписома мтДНК каждый раз заново формируется комплексом ДНК-полимеразы- γ (PolG), ДНК-геликазы-TWINKLE и белка mtSSB. Геликаза-TWINKLE обладает праймазной активностью в отношении некоторых реплицирующих бактериофагов, амeboидных протист, большинства эукариот, но не активна у видов, потерявших некоторые ее мотивы, – в частности, zinc-finger, необходимый для связывания ДНК многоклеточных животных и человека [65,59].

Этот праймосомный комплекс, формируемый и у некоторых плазмид (~1/3 плазмид с онДНК реплицируют с образованием днДНК) [12] и движущийся за репликативной вилкой вдоль онДНК, стимулировал *in vitro* репликацию лидирующей нити (преимущественно, с использованием РНК-праймера ограниченного размера [27]), а в присутствии праймазы-POLRMT, – также и отстающей нити. Скорость движения репликативной вилки зависит также от активности АТФ-независимых топоизомераз (тирозиновый остаток фермента выступает в роли и акцептора и донора фосфатных групп), регулирующих степень скрученности витков ДНК за счет вращения ее вокруг своей оси и последовательных актов разрыв/воссоединение концов одной из нитей.

Неизвестно ни одной ДНК-полимеразы, способной начать синтез ДНК без затравки (РНК- или, редко, ДНК-праймера). Последний нуклеотид затравки обязательно должен быть спаренным с матрицей; на 5'-конце реплицируемой нити ДНК всегда имеется несколько рибонуклеотидов, и, таким образом, синтез ДНК начинается с синтеза РНК [13]. Копирование мтДНК может, в конце концов, контролироваться частотой инициации транскрипции у LSP-промотора [27].

Отступление 4: митохондриальная РНК-праймаза млекопитающих (POLRMT) была показана недавно (в 2008 г.). Она синтезирует небольшой РНК-праймер длиной в 30-60 (25-75) нуклеотидов на онДНК-матрице, связываемой митохондриальным белком mtSSB (который уменьшал синтез праймера, но стимулировал праймер-зависимый синтез ДНК). Более эффективно POLRMT процессирует длинные днДНК. У прокариот праймаза, – отдельный фермент, а у эукариот – субъединица ДНК-полимеразы- α . РНК-праймер элонгировался ДНК-полимеразой- γ (PolG) при синтезе ДНК *in vitro*. PolG состоит из нескольких идентичных субъединиц (с молекулярной массой

около 50 kD), реплицирует мтДНК с несколькими рибонуклеотидами, обладает необходимой для этого ограниченной обратотранскриптазной активностью (возможно, и РНК-зависимой-РНК-полимеразной, RdRp, активностью [68]); аналог этого фермента имеется у хлоропластов [13]. Минимальная реплисома мтДНК формируется комплексом PolG/ДНК-геликаза-TWINKLE/белок-mtSSB. TWINKLE обладает праймазной активностью в отношении некоторых реплицирующих бактериофагов, амeboидных протист, большинства эукариот, но не активна у видов, потерявших некоторые ее мотивы, – в частности, zinc-finger, необходимый для связывания ДНК, многоклеточных животных и человека [65,59]. Этот комплекс (in vitro) реплицировал лидирующую, а в присутствии праймазы POLRMT, – и отстающую нить тоже.

Заметим, что вПОТ-индуцируемый олигонуклеотидный НЭ, рибо-/дезоксирибонуклеотидной природы, потенциально может комплементарно взаимодействовать с участком ДНК или с самим РНК-праймером, соответственно, либо указывая праймазе соответствующий сайт, где может синтезироваться РНК-праймер (сайт наиболее вероятного ориджна репликации), либо напрямую ограничивать/оптимизировать функциональные свойства самого РНК-праймера (как это происходит в случае репликации ColE1 плазмиды [68,25,27]).

RT-активность PolG принципиально не исключает не только считывание рибонуклеотидов (содержащихся в ДНК; возможно, в НЭ или в сближенных антикодоновых участках тРНК/Аа-тРНК), но и встраивание их в виде дезоксирибоолигонуклеотидов в мтДНК. Кроме того, она допускает появление дезоксирибо-варианта-НЭ (и в этом случае, в частности, надо помнить об известных вариантах редактирования ДНК, например, с участием РНК/ДНК-цитидиндезаминаз AROBEC3G/F [1]). Предполагаемая RdRp-активность, при использовании сближенных антикодоновых участков тРНК/Аа-тРНК или рибо-варианта-НЭ, позволяла бы (будучи показанной), соответственно, воспроизводить и амплифицировать НЭ.

Репликация мтДНК млекопитающих

Репликация мтДНК стартует у ОН-сайта (О_H-ориджна) тяжелой Н-нити, расположенного ниже LSP-промотора транскрипции легкой нити. ДНК-полимераза (PolG, др.) начинает синтезировать на лидирующей Н-нити участок L-нити ДНК, который, связываясь водородной связью с Н-нитью, вытесняет часть, а потом и всю родительскую L-нить из мтДНК-дуплекса. Последняя образует сначала неспаренную короткую петлю (ранний интермедиат репликации), принимающую форму буквы “D”. В связи с этим она получила название D-петли (D-loop, displacement loop; не путать: в D-ветви тРНК также есть D-loop); у млекопитающих ее длина составляет 500-600 нуклеотидов [12]).

Эта петля всегда содержит характерные петля-стебель (stem-loop) структуры различной длины у разных объектов. Образуется тринитевая мтДНК. ДНК-триплекс обнаружен исследователями Caltech (Калифорнийского Технологического Института) в 1971 г., а Л.К.Полинг

представил модель тринитевой ДНК еще в 1953 г. Третья нить – исходный сегмент репликации с H-нити, которая часто приостанавливается и сохраняется в таком состоянии некоторое время. Появлению третьей нити, по крайней мере у некоторых фагов, предшествует образование ДНК/РНК-гибрида, РНК которой является праймерной затравкой (а O_H -ориджн образует несовершенную шпильку [65]). ДНК/РНК-гибрид, – экстремально короткоживущий, с очень высоким оборотом (в отличие от остальной мтДНК) промежуточный продукт репликации [27]. РНК праймер синтезируется митохондриальной ДНК-зависимой РНК-полимеразой (праймазой; она связывается с ДНК и синтезирует РНК-затравки для синтеза фрагментов отстающей нити), отвечающей за экспрессию митохондриальных генов и создание РНК-праймера инициации репликации лидирующей H-нити.

У человека праймаза, – это белок гена POLRMT, локализованный в 19p13.3 области генома; он имеет больше черт сходства с РНК-полимеразами фагов и митохондриальными полимеразами низших эукариот. Праймаза бывает индивидуальным ферментом (у бактерий), или является субъединицей ДНК-полимеразы (например, у ДНК-полимеразы- α животных) [13]. мтДНК человека имеет геном в 16,6 kb с двумя (O_H/O_L)-ориджнами репликации. Репликация кольцевой двунитевой мтДНК начинается у O_H -сайта репликации лидирующей нити взаимодействием с новосинтезированным РНК-праймером, транскрибируемым с LSP-промотора отстающей L-нити [65]. После начала репликации с O_H -сайта, на расстоянии $\sim 2/3$ длины лидирующей H-нити, активируется O_L -ориджн легкой нити, и в противоположном направлении иницируется синтез лидирующей H-нити с отстающей L-нити [65]. Более современный взгляд, однако, основан, предпочтительно, на одновременном (сдвоенном) синтезе обеих нитей ДНК у многих эукариот [68, 10].

Таким образом, репликация мтДНК (независимо от модели репликации, функционирующей в клетке конкретного эукариота) является транскрипционно зависимой. В области O_H -ориджна Д-петли расположены противоположно направленные HSP/LSP-промоторы транскрипции тяжелой (H) и легкой (L) нитей [43]. Последовательность событий связана со схемой: с LSP-промотора иницируется транскрипция L-нити; синтезируется и, далее, процессирует полицистронный транскрипт (с участием RNase MRP; mitochondrial RNA processing); фрагмент транскрипта становится праймерной затравкой репликации с здесь же расположенного O_H -ориджна лидирующей H-нити, на которой, с периодическими остановками, синтезируется ДНК отстающей L-нити [43].

У млекопитающих инициация транскрипции многократно усиливается фактором транскрипции митохондрий – mtTFA, присутствие которого часто необходимо и достаточно не только для

активации обоих промотов (LSP/HSP), но и синтеза варибельной **7S ДНК** (из области Д-петли) и репликации мтДНК. mtTFA – ДНК-связывающий белок (HMG-box класса), способен связывать минорную бороздку ДНК и изменять структуру ДНК [27]. mtTFA-фактор связывается с различными частями Д-петли с неодинаковой афинностью и может выполнять разные роли в транскрипции/репликации мтДНК. При низкой его концентрации вероятна инициация транскрипции с L-нити (связанная с репликацией тяжелой нити; это доминирующая ситуация), а при высокой – с H-нити (реплицируется легкая нить). Соотношение между концентрациями mtTFA и транскрипта (точнее, уровнем/характером инициации транскрипции мт-промоторов) показывает, что это величины приблизительно одного порядка во всех генетических системах млекопитающих [27]. mtTFA связывается с CSB-I блоком (третьего домена L-нити в области Д-петли мтДНК позвоночных), где формируется РНК/ДНК-гибрид. Комплекс mtTFA–CSB-I может быть частью сигнала узнавания в сайте взаимодействия наиболее избыточного РНК праймера L-нити – с O_H-ориджом в области Д-петли мтДНК. Запуск праймер-опосредованной репликации H-нити определяется уровнем воспроизводства РНК-праймера и, в свою очередь, зависит от степени паузирования РНК-полимеразы.

Синтез РНК в митохондриях эффективен несколько более 3-х часов. Образуется полицистронный транскрипт, процессируемые фрагменты которого (малые количества неполиаденилируемых 16S/12S-рРНК, тРНК) рассматривают в качестве возможных праймеров синтеза на матрице H-нити. Расщепление транскрипта RNase-P происходит по сайтам, расположенным по обе стороны от каждого гена тРНК [27]. Прекращение этого синтеза, скорее всего, происходит при достижении равновесия между пулами внутримитохондриальных dTTPs (проверено мечеными их α -³²P-производными) и лабильных молекул 7S ДНК, синтез и деградация которых является транскрипционно примируемым процессом в митохондриях млекопитающих [27]. 7S ДНК и неполи-А-предшественник 7S РНК (в митохондриях крыс) представлены на низком уровне. Время полужизни 7S ДНК (в циклах синтез/деградация) не велико, – всего ~45 минут. Эффективное образование 7S ДНК требует стехиометрического соотношения мтДНК с транскрипционным фактором mtTFA (как в опыте, когда 3.6×10^{11} молекулам мтДНК соответствовало $\sim 8 \times 10^{11}$ молекул mtTFA; т.е. на каждую молекулу мтДНК приходилось 2-3 молекулы mtTFA) [27]. Процессируемые фрагменты транскриптов L-нити, в свою очередь, иницируют репликацию у O_H-сайта лидирующей H-нити, т.е. начало репликации L-нити на H-нити [12,27]. При этом в контрольной области мтДНК (**control region**) с двух сайтов синтезируется два вида низкомолекулярной 7S ДНК (судя по результатам зондирования фрагментов

Д-петли и, в частности, 7S ДНК, они нековалентно связываются с РНК), удлиняемых, далее, в реплику новосинтезируемой L-нити, которая вытесняет одноименную родительскую нить из дуплекса мтДНК с образованием ею Д-петли, смещаемой по мере синтеза L-нити [27]. Через некоторое время (после синтеза ~2/3 длины новосинтезируемой L-нити, – в соответствии с традиционной моделью асинхронного синтеза мтДНК) или одновременно (модель сдвоенного синтеза ДНК-нитей), и также при инициации РНК-праймером, активируется O_L-сайт репликации, и в противоположном направлении с отстающей L-нити начинает синтезироваться H-нить мтДНК [27].

Область 7S ДНК мтДНК

Для 7S ДНК (Д-петли мтДНК) определено, что она:

1. фиксируется в области обоих (LSP/HSP) промоторов выпуклой вариабельной Д-петли;
2. стабильно гибридизуется с родительскими нитями кольцевой молекулы;
3. образует тринитевую структуру внутри смещаемой Д-петли;
4. имеет небольшую открытую рамку считывания (ОРС), в которой синтезируется вариабельная 7S РНК; у человека она составляет почти 3 сотни (295) п.н.; в печени крыс их менее 2-х сот; избыток 7S РНК накапливается в виде 3'-полиаденилатов [27].

У человека (но не мыши, коровы) в.н. ОРС кодирует ген 7S РНК (интроны не найдены), – компонент консервативного (по четырем мотивам) между видами отдельных царств SRP-комплекса, включающего 6 секреторных/интегральных белков мембраны (SRPs-72/-68/-54/-19/-14/-9), траслоцируемых в виде рибонуклеопротеина, РНП, в эндоплазматический ретикулум (ЕР) и регулирующих трансляцию мРНК некоторых рибосом-связанных белков. Интактная SRP имеет по крайней мере 3 активности:

1. связывание с сигнальной последовательностью новосинтезированного белка;
2. продление остановки при трансляции;
3. связывание с SRP-рецептором, необходимое для продолжения элонгации и транслокации белка-мишени в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭР).

Кроме того, в изолированных митохондриях крыс, в присутствии 7S РНК поддерживались транскрипция/процессинг РНК, – сравнимые с таковыми в интактных клетках [27].

Происхождение некоторых повторов ядерного генома может быть связано с дубликацией в разные участки хромосом гена 7S РНК (=7SL, 6S; а также 4.5S у бактерий), 5'- и 3'-концы которого имеют

сходство с обратнотранскрибируемыми Alu-повторами и другими SINE последовательностями [27]. Известны псевдогены, происхождение которых связывают с 7SL- и другими типами РНК (мРНК, тРНК, рРНК; малых ядерных РНК). 7S РНК галобактерий (*H. halobium*), – избыточная, не рибосомальная РНК (в 304 нуклеотида), обнаруживающая сходство по размеру и гомологию с 7S РНК других галобактерий (имеет единичную копию гена 7S РНК), млекопитающих (~50%), но не с некоторыми другими архебактериями, эубактериями, эукариотами; в кодирующей, но не в 3'- и 5'-концевых областях 7S РНК обнаруживалось повышенное содержание Г/Ц-пар нуклеотидов. Эта РНК также найдена в хлоропластах (вместе с SRP некоторые ядерно-кодируемые белки переносятся в тилакоиды) [27]. У эукариот и архебактерий 7S РНК имеет очень сходную вторичную структуру [49].

Отступление 5: Таким образом, репликация мтДНК (включая синтез 7S-ДНК/РНК, Д-петли) является транскрипционно зависимой. 7S-РНК – компонент SRP-(РНП)-комплекса, участвующий в трансляции рибосом-связанных белков и траслокации их (между ядром, цитоплазмой, органеллами – Мт/Хп/тилакоидами). Дупликация гена 7S-РНК, возможно, связана с появлением некоторых повторов (Alu, другими SINE) ядерного генома. Повышенное содержание Г/Ц-пар нуклеотидов в кодирующей части 7S-РНК (гиперизменчивой Д-петли), возможно связано с регуляцией соотношения Г/Ц- и А/Т(У)-пар посредством, в частности, редактирования РНК (в свою очередь, вероятно, сопряженного с вПОТ-механизмом).

Инициация транскрипции полицистронного транскрипта стандартными ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, обычно, не нуждается в РНК-затравке; но обратнотранскриптазная активность ретровирусов иницируется некоторыми тРНК (Lys в случае ВИЧ [9]; Trp), а стандартная ДНК-зависимая ДНК-полимераза- γ , POLG, частично/ограниченно такой активностью обладает [68]. Кроме того, сложно допустить, что олигонуклеотидный праймер [РНК-(ДНК)-затравка], связываясь, например, с промоторной областью или некоторыми другими расположенными ниже областями мтДНК, или с участками новосинтезирующегося транскрипта, не может в принципе оказывать негативного, в отношении инициации/элонгации транскрипции, действия. В случае инициации синтеза РНК с участием РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp; в митохондриях подозревают присутствие этой активности, в частности, в связи с праймазой POLRMT человека) такой затравкой может быть короткая антисенс РНК. Репликация любой ДНК требует участия РНК праймера (каковыми могут быть, в том числе, в разной степени полиаденилируемые фрагменты или продукты процессинга/деградации транскриптов рРНК/тРНК/др., выполняющих роль РНК-затравки репликации). В то же время, связываясь с O_H -ориджном, образующим несовершенную шпильку, праймаза (POLRMT) сама прерывисто синтезирует РНК праймер при репликации отстающей L-нити. (Заметим, что и редактирование РНК: 1. иногда, ведет к паузированию образования новосинтезирующегося транскрипта; 2. п.1 может быть следствием сопряженности редактирования РНК с гипотетическим вПОТ-

механизмом). С РНК-праймером связана экстремальная короткоживучесть ДНК/РНК-гибрида, предшествующего появлению ДНК-триплекса в некодирующей вариабельной области Д-петли. Низкая и высокая концентрации ядерно-кодируемого mtTFA-фактора (в локальных областях Д-петли), определяет выбор LSP/HSP-промоторов для инициации транскрипции, соответственно, L- или H-нитей.

В контексте предлагаемого гипотетического вПОТ-механизма, предположительно воспроизводящего олигонуклеотидные НЭ (переносимые нуклеиновокислотными НК-векторами, ВВП или РВП), резюмированная выше информация означает следующее. НЭ (или даже сближенные антикодоновые участки тРНК), полностью/частично комплементарно связываясь с промоторными областями (LSP/HSP), О_H-ориджном, 7S-ДНК, 7S-РНК, другими участками Д-петли, РНК-праймерных затравок, может позитивно/негативно вмешиваться в регуляцию процессов транскрипции/репликации мтДНК, трансляции цитоплазматических мРНК, транслокации белков (между ядром, цитоплазмой, МТ; у высших растений, это, дополнительно, Хп/тилакоиды), формирования/подвижности некоторых повторяющихся последовательностей хромосом; первично вмешательство может заключаться в изменении первичной структуры 7S-ДНК, 7S-РНК, других участков мтДНК, и, далее, ядерной ДНК. А концентрация mtTFA (степень экспрессии фактора в ядре) может быть как «внешним/независимым» по отношению к протекающим в митохондриях событиям фактором, так и результатом этих событий, определяемых количеством/качеством НЭ (вероятно поступающих в ядро с выше названными НК-векторами, ВВП/РВП), которые, в свою очередь, способны регулировать/переключать активность отдельных генов (подобно тому, как это делают транскрипционные факторы, – или вместе с ними) и участков (включая повторы) регуляторной некодирующей части генома. В последнем случае речь идет, вероятно, о возможности вмешательства в регуляцию эпигенетическими процессами (ферментной активностью метилаз, ацетилаз, фосфорилаз, убиквитинлигаз и т.д. – влияющих на соотношение активного эухроматина и неактивного гетерохроматина, – через модификацию гистонов, т.н. «гистоновый код», и ремодулирующих структуру хроматина белковых комплексов т.н. «нуклеосомного кода»), вполне вероятно, связанными с изменениями, в том числе генетическими, в регуляторной некодирующей области генома [8].

Область Д-петли (D-loop) мтДНК

Кроме мтДНК, Д-петля имеется также в геномах:

1. некоторых фагов (здесь она более короткая, чем в мтДНК, и ее образование подавлялось рифампицином – ингибитором транскрипции и РНК полимеразы *E.coli*) [23];
2. хлоропластов, например, *Chlamydomonas reinhardtii*. Д-петля здесь: богата АТ нуклеотидами; имеются 11 малых 9-12-нуклеотидных ГЦ-богатых кластеров, локализованных в малой ОРС, потенциально кодирующей белок и имеющей одну петле-стеблевую структуру и два каскад-связанных промотора

прокариотического типа; всего здесь содержится четыре петле-стеблевых структуры, образование которых облегчается наличием прямых и зеркально симметричных повторов.

Д-петля мтДНК обнаружила гомологию: с бактериальной (*Providencia stuartii*) метилазой; с участком, соседним с Н4 гистоном *Tetrahymena thermophila* (свободно живущее реснитчатое простейшее); с участком генома *Trypanosoma brucei*, лежащим ниже теломерного повтора; с двумя короткими областями межцистронной последовательности Ті плазмиды растений [39,67,41].

Отступление 6: для последнего абзаца: возможное взаимодействие НЭ с первыми двумя участками гомологии Д-петли (метилазным; прилегающим к Н4 гистону, поддерживающему заряженность белковой составляющей хроматина) потенциально допускает, соответственно, участие этих компонент в регуляции процессов метиляции, – и в более масштабной эпигенетической регуляции («гистонового кода») генома при фосфорилировании, ацетилировании, метилировании и убиквитинировании хроматина, подверженного переходам эухроматин→гетерохроматин (за счет комбинаторики в N-концевом паттерне некоторых аминокислот гистонов, обеспечивающих функционирование т.н. «гистонового кода»). Взаимодействие с третьим участком гомологии (вблизи теломерного повтора) допускает возможность вмешательства в процесс концевой репликации; а в четвертом случае (короткие области межцистронной последовательности Ті плазмиды растений), – в процесс трансформации нормальных клеток в раковые.

Д-петля находится в единственном большом некодирующем регионе мтДНК животных, расположенном, обычно, между разными генами тРНК (у человека, например, это тРНК^{про} и тРНК^{фен} [10]). Другое ее название, – контрольная область (включает, также, кроме Д-петли, и соседние с Н-ориджком области), т.н. control region в ~1000-1500 нуклеотидов (у позвоночных), главная регулирующая область, в которой двунаправленные промоторы транскрипции L-/H-нитей находятся в непосредственной близости с однонаправленным сайтом инициации репликации H-нити (O_H-ориджком). У человека (но не мыши, коровы) здесь имеется также ОРС, кодирующая 7S РНК.

В районе Д-петли, L-нить имеет три части: домен I (С-богатый; содержит три области, связанные с терминацией синтеза Д-петли: TAS, termination associated sequence) и домен III (А/Т-богатый; содержит три CSBs-блока консервативных последовательностей) – наиболее вариabельны, богаты аденином и имеют длинные зеркально-симметричные повторы (важные для связывания с регуляторными белками); центральный домен II – более консервативный (по пяти, В-С-D-E-F, участкам), имеет низкое содержание аденина, содержит ОРС. 5'- и 3'-концы Д-петли у разных видов высоковариabельны по длине и

нуклеиновым последовательностям, но содержат термодинамически стабильные вторичные структуры, включающие консервативные CSBs последовательности (с ДНК/РНК-гибридной областью [27]), связанные с началом синтеза, и TASs последовательности, – связанные с терминацией синтеза Д-петли. Петля (control region) содержит по несколько сайтов консервативных оснований, но большая ее часть в несколько (у человека – в 3-5) раз более вариабельна, чем остальная часть митохондриального и, тем более, ядерного геномов (что используют при изучении филогеографических аспектов эволюции позвоночных) [19,22]. В частности, в 3'-половине control region четырех видов обыкновенной миноги обнаружены повторяющиеся последовательности, вариабельные по числу копий и нуклеотидной последовательности [51].

Анализ этих последовательностей показал, что ответственной за варьирование длины и состава повторов (высокого уровня замен и делеций/вставок, обычно, у 5'- и 3'-концов control region) могла быть скользящая и смещающаяся при репликации нить ДНК, – предположительно из-за межмолекулярной рекомбинации уже имеющихся [51] или образующихся de novo тандемных повторов [18]. В мтДНК, по специфическим сайтам control region (например, в фибробластах человека), также обнаруживают высокое копирование и прогрессивное накопление точечных мутаций/делеций у нормально стареющих, и лиц достигших преклонного возраста (65 лет), но не у молодых людей. Некоторые из этих мутаций (например, T414G) встречались более чем у половины (57%) индивидуумов [47]. Митохондрии представляют собой центр контроля апоптоза, поэтому внедрение фрагментов мтДНК в хромосомы может быть причиной старения и возникновения рака (в клетках опухолевой ткани апоптоз часто нарушается) [10].

Отступление 7: из выше приведенных трех абзацев следует, что, если НЭ будет в значительной степени комплементарен некоторым последовательностям control region – промоторной, области О_h-ориджна, 7S RNA, TAS, CSBs, 3'-концевым вариабельным повторяющимся (включая тандемы) последовательностям, различным мутационным сайтам мтДНК (возможно и тРНК, фланкирующим control region), – то это может привести к вмешательству (негативному/позитивному) в процессы, соответственно, транскрипции, репликации лидирующей нити, трансляции (связыванию 5'-пре-мРНК с рРНК цитоплазматической рибосомы), терминации репликации, начала репликации, скольжения/смещения реплицируемой нити ДНК, точности репликации.

Подобные петли формируются также в теломерах (t-loop), в полу-стабильных кольцевых мтДНК, в репарируемых ДНК (др.). Функции Д-петли определены не полностью, но последние исследования подтверждают ее возможное участие и в организации структуры митохондриального нуклеоида. Процесс формирования петли постоянно про-

текает с высокими скоростью и частотой. Смещающаяся Д-петля обнаружена во многих копиях мтДНК различных тканей и клеточных линий.

В некоторых случаях, также, регистрируют копирование мтДНК по типу «катящегося кольца», когда репликационная вилка скользит вокруг матричной цепи и с одного кольцевого репликона синтезируется большое число комплементарных копий. Такой механизм требует разрыва одной из нитей, наращивания на ней комплементарной нити и сопровождается вытеснением другой нити (линейной матрицы), на которой затем синтезируется ДНК; сходный процесс характерен и для некоторых вирусов.

Предназначение и значимость образования Д-петель остаются во многом не ясными [70]. В соответствии с разными моделями, репликация легкой L-нити может начинаться или одновременно с синтезом тяжелой H-нити (это более поздняя модель т.н. сдвоенного синтеза инициации репликации и образования Д-петли, например, у морских ежей [10]), – или тогда, когда синтез H-нити достигает ~2/3 целой нити (более ранняя модель нить-асимметричного синтеза с двух ориджнов). В разных генетических системах эукариот наблюдают оба варианта репликации, причем точное и быстрое удаление РНК праймера также необходимо в обоих случаях, но молекулярный механизм такого удаления в значительной степени не ясен [70].

Критическими для удаления праймера (прежде всего рибонуклеотидов), а следовательно и для самой репликации в митохондриях, предполагают действие нуклеаз (их по крайней мере три). Среди них: RNase H1, которая надрезает РНК-часть РНК/ДНК-дуплексного соединения, оставляя единичный рибонуклеотид, прикрепленный к 5'-концу нижележащего ДНК сегмента; а также FEN1 (=RAD2; обладает 5'-3'-экзо-/эндонуклеазной активностью, надрезает единичный нуклеотид или короткий участок РНК и удаляет, также, часть дезоксирибонуклеотидов) и нуклеаза DNA2. Нуклеазы могут, во-первых, включаться в созревание ядерных фрагментов Оказаки (у дрожжей, низших эукариот), и, во-вторых, мигрировать в митохондрии (у человека, млекопитающих) [70].

Малые РНК органелл

Малые РНК эукариот, имеющие ядерное происхождение, играют значительную роль и участвуют в большинстве, если не во всех, жизненно важных процессах растущих, дифференцирующихся и метаболизирующих взрослых клеток в норме и патологии. Поэтому большой интерес представляют данные, касающиеся малых РНК, кодируемых органеллами и относимых к классу некодирующих РНК (**ncRNAs**).

Стабильные ncRNAs находят в цитоплазме или цитоплазме/ядре клеток разных видов: от бактерий – до человека (окончательное число генов и видов малых РНК еще **не известно** ни для одного организма [38]). Размер ncRNAs широко варьирует от очень длинных, например Xist RNA человека составляет ~17 kb (участвует в инактивации одной из X-хромосом), до экстремально коротких, как в случае микро-РНК в 21-23 нуклеотида [43]. Последние принимают участие в выполнении таких жизненно важных функций, как транскрипция, трансляция, сплайсинг (вырезание интронов с помощью малых ядерных РНК, snRNAs, комплементарных их концевым участкам в результате деградации днРНК нуклеазами), репликация ДНК, процессинг/деградация/интерференция РНК, – как в процессе нормального роста/развития, так и при многих патологических (включая онкологические и генетически обусловленные заболевания) процессах.

Малые/средние ncRNAs транскрипта ДНК-содержащих органелл, как показано с помощью Northern blot и анализа действия нуклеазы RNase A в отношении 1700 клонов cDNA митохондрий и 5500 клонов хлоропластов, имеют размер **20–500** нуклеотидов, – характерный для подавляющего большинства ncRNAs [43]. Эти органеллы, считается, являются потомками некогда захваченных эубактерий (поэтому, далее, мы рассмотрим и бактериальные малые РНК), – постепенно/эндосимбиотически изменяющихся предшественников современных α -протеобактерий (в случае митохондрий), и предшественников цианобактерий (в случае хлоропластов), – геномы которых редуцировали и специализировались каждый раз в конкретных условиях. Степень первично-последовательностной и структурно-организационной консервации геномов этих органелл (за эволюционно значимый период), вероятно, отличается от таковой у свободноживущих бактерий. Это может быть связано с тем, что у эукариотических органелл одновременно усиливается как степень их специализации (что всегда связано с упрощением по какому-либо параметру), например тканевой, так и уровень организационной сложности органелл, взаимодействующих с ядром конкретно-специализированной (или стволовой) клетки.

Рассмотрим работу, в которой рассматривались митохондрии M.musculus (размер генома мышцы, – 16,6 kb; 37 генов) и хлоропласты из молодых листьев N.tabacum (156 kb; около 120 генов) в световой/темновой фазах их роста [43]. В растительной клетке насчитывается до 10 тысяч хлоропластов: ~100 видов их имеют, каждый, по ~100 копий. Размер генома митохондрий животных примерно в 100 раз, а хлоропластов – в 10 раз меньше, чем у свободноживущих бактерий (~1.6 x 10⁶ п.н.; хотя этот размер варьирует более чем на порядок). Геном последних, условно, меньше

человеческого генома в ~2000 раз. Подавляющая часть белковых субъединиц, функционирующих в органеллах, кодируется ядром и импортируется из цитоплазмы [43]. Интересно, что часть исследователей, на основе последовательностей, кодирующих 16S- и 18S-рРНК, строят филогенетическое древо, в котором три ветви, – архебактерии, нуклеоцитоплазма эукариот и бактерии/эукариотические-органеллы, – появились и развиваются в рамках отдельных направлений [11].

В большинстве случаев ncRNAs обеих органелл кодируются в межгеном пространстве, фолдируют в стабильные петля-стебель (stem-loop) структуры, и исчисляются небольшим числом (всего новых 18 ncRNAs). Импорт ncRNAs из цитоплазмы/ядра (это, обычно, фрагменты рРНК, тРНК; малых ядрышковых РНК, snoRNAs) в органеллы, как видно из анализа их процентного содержания после очистки органелл, был очень слабым, или отсутствовал вовсе. Эти структуры предрасполагают, в частности, к сенс-антисенс взаимодействиям (характерным для регуляции экспрессии мРНК и у бактерий), а также к некоторым видам редактирования РНК, сплайсинга, и напоминают шпильку пре-miRNA у эукариот. В то же время, в эукариотическом ядре, более половины длины генома которого приходится на некодирующие области, число кодируемых и функционирующих в ядре/цитоплазме малых регуляторных РНК (верно, по крайней мере, в отношении микро-РНК) может достигать нескольких сотен и более тысячи на геном [11].

Принято считать, что за эволюционно длительный период перенос генетической информации (нуклеотидных последовательностей) происходит, предпочтительно, в направлении Хп→Мт/Ядро, и Мт→Ядро, но не наоборот [17,5]; (однако, заметим, у высших растений также показана и обратная тенденция присутствия ядерных/хлоропластных последовательностей в мтДНК [10]; см. выше). Это соответствует показанному с помощью специальных зондов постоянно возобновляющемуся притоку относительно больших (>3 kb) вставок сегментов хпДНК (ядерно-пластидных последовательностей, NUPTs; чаще всего на длинном плече хромосомы 5) и сегментов мтДНК (ядерно-митохондриальных последовательностей, NUMTs), локализующихся во множестве специфических NUPTs/NUMTs-сайтах (NUPTs>NUMTs) и являющихся компонентами динамической фракции ядерных геномов кукурузы [56]. Одновременно, это не противоречит предположению, что гипотетический НЭ (внутри вектор-подобной нуклеиновой последовательности, ВНП; или комплексируясь с белками, в виде нуклеопротеидов, РНП/ДНП) способен перемещаться из Мт (Хп) в цитоплазму и/или ядро, и оказывать, тем самым, различные опосредованные регуляторные и структурно-функциональные воздействия.

Отступление 8: сравнительный анализ малых РНК, кодируемых и связанных с ядерным и геномами органелл (Мт, Хп) эукариот, как и прокариот (вирусов, фагов), интересен, соответственно, в связи с возможными неизвестными аспектами ядерно-цитоплазматического взаимодействия (перенос вПОТ-опосредованного НЭ, в виде ВВП-векторов, РНП- или ДНП-частиц, в ядро и цитоплазму), – а также, в связи с принятым представлением о изначально прокариотическом происхождении органелл (имеющих иные степень и способ структурно/ функциональной консервации генома, сложившихся в условиях, отличных от тех, в которых обитают свободно живущие бактерии). Малые РНК эукариот (и в некоторой степени и прокариот), известно, функционируют в большинстве жизненно важных процессов. Тот факт, что окончательное число генов и видов малых некодирующих РНК еще не известно ни для одного организма [38], возможно связан с тем, что, значительная часть кодирующих/некодирующих областей геномов, составленных из небольших их фрагментов (размером в один/несколько НЭ), являются потенциально кодирующими эти ncRNAs; вероятно, это прояснится позже.

В среднем, геном митохондрий животных в 10 раз меньше хлоропластного, и в 100 раз – бактериального. Построение филогенетического древа на основе 16S-/18S-рРНК показало, что архебактерии, ядерная наследственность (эукариот) и бактерии/органеллы (Мт/Хп), скорее появились и развивались тремя обособленными путями. Органеллы рассмотренных видов (*M.musculus* и *N.tabacum*), – и на данный момент, – кодируют только небольшое число (до 18) ncRNAs, – чаще в межгеном пространстве. Эти ncRNAs: имеют петле-стеблевые структуры, шпильку (сходную с таковой у пре-miRNA эукариот); часто антисенс-ориентированы; формируют предрасположенность к некоторым видам редактирования РНК, сплайсинга. Импорт в органеллы ncRNAs цитоплазмы/ядра – незначителен/отсутствует. В то же время, у эукариот число ядерно-кодируемых ncRNAs на один-два порядка больше (достигает нескольких сотен и более тысячи на геном).

Показано, что существует постоянно возобновляющийся приток не малых (>3 kb) вставок сегментов хпДНК (ядерно-пластидных последовательностей, NUPTs) и сегментов мтДНК (ядерно-митохондриальных последовательностей, NUMTs), локализующихся во множестве специфических NUPTs/NUMTs-сайтах (NUPTs>NUMTs), – компонентах динамической фракции ядерных геномов кукурузы [56] (направление движения генетической информации –органеллы→ядро). У высших растений показана и обратная тенденция: в мтДНК присутствуют ядерно/хлоропластные последовательности [10]. Обе тенденции не противоречат предположению, что гипотетический НЭ (внутри ВВП или РНП) способен перемещаться из Мт (Хп) в цитоплазму и/или ядро (и наоборот), и оказывать, тем самым, различные регуляторные и структурно-функциональные воздействия на геном.

Малые РНК митохондрий

Большинство анализируемых РНК (~90%), выделенных из митохондрий мыши (*M.musculus*) в виде 1700 cDNA-клонов, являлись

фрагментами pРНК (16S, 12S) или tРНК митохондрий; только 1,4% и 1% были, соответственно, фрагментами mРНК и новыми ncRNAs-кандидатами органеллы [43].

Еще 6,6% клонов представляли фрагменты ядерно-кодируемых pРНК, mРНК, микро-РНК; из них 2,5% являлись 5.8S pРНК (в 160 нуклеотидов длиной), еще столько же кодировали фрагменты 28S pРНК (длиной в 25-132 нуклеотида): незначительный импорт их в Мт, как и в случае 5S-pРНК/tРНК^{Лиз} человека [26], не исключен; по нескольку клонов приходилось на фрагменты 5S/18S pРНК, mРНК, и по одному – на микро-РНК (let7f-1, let-7g, miR-122a,b и miR-101b).

В транскрипционно активной области Д-петли идентифицировано четыре из шести новых кандидатов в малые некодирующие РНК митохондрий мыши (Mt-1,-2,-3,-4; включаются в репликацию генома). Еще две ncRNAs, – Mt-5 и Mt-6, – транскрибируются с противоположных нитей и в антисенс ориентации к регулируемым ими экспрессирующимся субъединицам mРНК генов митохондрий НАДН-дегидрогеназы (энергетического комплекса), – соответственно, ND-4 и ND-6. Все в.н. ncRNAs имели низкий уровень экспрессии; но, как и в случае микро-РНК, это не означает отсутствия их функциональной значимости [43].

Mt-1: имеет 5'-конец, идентичный предсказанному РНК-праймеру репликации мтДНК. 3'-конец Mt-1 гетерогенен по 4 нуклеотидам и совмещается с консервативными CSB-III и CSB-I/II мотивами в области Д-петли (и домена III нити L). РНК Mt-1, однако, заканчивается вблизи/перед предполагаемым сайтом расщепления RNase MRP по мотиву CSB-III. Тогда РНК-праймер репликации (Mt-1) может преждевременно терминировать транскрипцию и предотвращать расщепление полицистронного транскрипта RNase MRP. Это означает, что репликация мтДНК регулируется РНК-примированием (Mt-1) так, что скорость инициации транскрипции праймера в области Д-петли превышает скорость репликации мтДНК [24]. Четыре из пятнадцати клонов Mt-1 полиаденилируются 4-37 остатками аденина. Выраженное полиаденилирование mРНК, обычно, сопровождается появлением стабильных их форм, а не выраженное, – деградацией; степень и скорость полиаденилирования Mt-1 могут влиять на эффективность РНК-примирования при репликации мтДНК сходным образом.

Mt-2: 3'-конец этой РНК расположен в одном нуклеotide от 5'-конца tРНК^{Про}, что, потенциально, отражает возможность регуляции процессинга RNase P, расщепляющей пре-tРНК^{Про} из полицистронного транскрипта.

Mt-3: короткая РНК в 23 нуклеотида, кодируется Н-нитью и транскрибируется как антисенс-вариант РНК-праймера репликации ДНК (Mt-1) и охватывает предсказанный сайт расщепления RNase

MRP. Потенциально, Mt-3 может регулировать каталитическую активность РНК-компонента RNase MRP антисенс-механизмом, и, тем самым, влиять на уровень транскрипции и/или репликации Н-нити. Этот механизм подобен тому, что наблюдают для репликации бактериальной плазмиды ColE1, где также имеются конкурентно-комплементарные сенс-/антисенс-варианты РНК-праймера репликации, кодируемых соответствующими, PRI-II/PRI-I, генами [25].

Mt-4: имеет размер 55 нуклеотидов, транскрибируется, предположительно, с H3 промотора Н-нити.

Mt-5 и Mt-6: регулируют экспрессию генов энергетического метаболизма митохондрий, – субъединицы НАДН-дегидрогеназы ND-4 и ND-6, и имеют длину, соответственно, в 43 и 30 нуклеотидов. Mt-6 обнаруживала 3 несоответствия с ND-6 последовательностью Mt-гена (и 2 – по отношению к ядерно-кодируемому ND-6 псевдогену), – возможно из-за ошибки при обратнотранскриптазной реакции (при создании библиотеки, или при переносе Mt-6 последовательности в ядро) или в процессе секвенирования; заметим, что неполное соответствие, также, может быть регуляторно-программируемым процессом (и реализуемым через вПОТ-механизм).

Митохондриальные ncRNAs превалировали в очищенных фракциях РНК органелл, но были значительно разбавлены ядерно-кодируемыми рРНК и малыми ядрышковыми РНК (snoRNAs) в неочищенном субстрате. Все ncRNAs, идентифицированные сопоставлением экспериментально полученных РНК (“experimental RNomics”) с данными РНК-библиотеки митохондрий (“biocomputational approaches”), имели настолько низкий уровень экспрессии, что не определялись Northern blot. Кроме того, малый размер, структура и/или модификации некоторых РНК, вероятно, не позволяли им полностью превращаться в анализируемые cDNAs при применении методов RT-PCR (здесь возможны потери информации). В этих методах использовались ³²P-меченые праймеры в 20-26 нуклеотидов, комплементарные '5-/3'-концам РНК-субстрата, клонированного, далее, в рGEM-T/рGEM-T плазмидных векторах Promega [43].

Малые РНК, кодируемые органеллами, были представлены малым числом не только в митохондриях (*M.musculus*), но также в органелле на порядок большего размера, – в геноме хлоропластов (*N.tabacum*). Это не понятно, т.к. происхождение родственных органелл связывают с зубактериями, кодирующими ncRNAs на один (и более) порядок больше. В *E.coli*, например, компьютерным и экспериментальным подходами уже показано свыше 60 генов регуляторных малых ncRNAs [38]. Вероятно, из-за эволюционной дистанции между бактериями/цианобактериями с одной стороны, и органеллами (Mt/Xп) с другой, в этих парах гомология между

соответствующими ncRNAs не была найдена (она даже могла быть отсечена в силу неидентичной структурно-функциональной нагрузки). Основной сайт локализации генов коротких РНК в Мт/Хп, как и у бактерий, – некодирующие области, – за исключением антисенс-РНК, транскрибирующихся в цис-положении с нити, противоположной той, что кодирует белок или другие ncRNAs.

Можно предположить, что у эукариот, имеющих сложные отношения между геномами митохондрий (хлоропластов) и ядра, реакция на множество внешних/внутренних стимулов (включая внутримитохондриальные), не считая значительного вклада, вносимого белками, реализуется также с участием ядерно-кодируемых (miRNAs, piRNAs) и нескольких других (siRNAs, др.) коротких РНК. Кроме того, во-первых, скорость воспроизводства/оборота практически одних и тех же митохондриальных малых РНК (особенно, кодируемых в более быстро обновляющейся Д-петле), как и, в целом, репликации мтДНК, – по сравнению с хромосомной ДНК, может в среднем превышать таковую для ядерно-кодируемых коротких РНК. Во-вторых, незначительное изменение в числе/обороте и уровне экспрессии митохондриальных (органеллярных) малых РНК, потенциально, может отражать существенные изменения в синтезе воспроизводимых в ПОТ-механизмом НЭ, которые сами (или вместе с митохондриальными/органеллярными малыми РНК) способны к транслокации в ядро (в ВВП-подобных структурах) и в цитоплазму (в РНП-структурах) и внесению изменений в экспрессию ядерных генов/генома, – включая воспроизводимые ими короткие РНК (по аналогии с действием транскрипционных факторов). Это необходимо для сбалансированной реакции органелл (Мт/Хп), – и, далее, ядра/клетки, – на многочисленные провокативные, повреждающие и сигнальные воздействия, сопровождающиеся оксидативным/фотооксидативным стрессом, увеличением свободных радикалов и реактивных форм кислорода (РФК=ROS).

Отступление 9: Все ncRNAs, кодируемые собственно митохондриями: 1. превалировали в очищенных фракциях РНК органелл (сильно разбавляясь ядерно-кодируемыми рРНК и малыми ядрышковыми РНК в неочищенном субстрате); имели: 2. имели низкий уровень экспрессии (не определялись Northern blot); 3. и такие малый размер, структуру и модификации, что не превращались полностью в анализируемые далее cDNAs (ограничивали применение методов RT-PCR). Все это могло вести, и вело, к потере информации.

Четыре из шести малых РНК митохондрий (Mt-1,-2,-3,-4) кодируются транскрипционно активной областью Д-петли (H- и L-нитями), контролирующей синтез РНК праймеров и, следовательно, сами процессы и соотношение скоростей транскрипции, репликации, процессинга/расщепления полицистронного транскрипта мтДНК. Замечено, что роль праймера репликации мтДНК мыши (M.musculus) может выполнять Mt-1, а комплементарно-

го антисенс-праймера – Mt-3. Такой способ регуляции репликации ранее уже наблюдали в отношении бактериальной плазмиды ColE1, где также имеются конкурентно-комплементарные сенс-/антисенс-варианты РНК-праймера репликации, кодируемых, соответственно, PRI-II и PRI-I генами [25].

Еще две ncRNAs, – Mt-5 и Mt-6, – кодируются нитями, противоположными тем (и в анти-сенс ориентации), которые экспрессируют две субъединицы НАДН-дегидрогеназы митохондрий, – соответственно, ND-4 и ND-6, – и регулируют, тем самым, некоторые этапы процесса воспроизводства энергии. Найденные три несоответствия Mt-6 с ND-6 мт-генома, и два – в отношении ядерного ND-6-псевдогена, возможно свидетельствуют об ошибке, связанной с обратно-транскриптной реакцией (при создании cDNA-библиотеки этих генов), секвенированием, или, дополнительно, с процессом переноса Mt-6 в ядро. Заметим, что неполное соответствие, также, может быть регуляторно-программируемым процессом, реализуемым через вПОТ-механизм: НЭ, гомологичные сенс-/антисенс-вариантам Mt-6 и переносимые ВВП (РВП), могут участвовать в регуляции (1) и оставлять свой «рибонуклеотидный след» (2) в обоих геномах. Длина ncRNAs, кодируемых митохондриями, составляла величину, близкую к таковой для единичного или амплифицированного НЭ (например, для Mt-3 она составляла 23, для Mt-6 – 30, для Mt-5 – 43, и для Mt-4 – 55 нуклеотидов).

Но тогда НЭ, синтезируемые с участием гипотетического вПОТ-механизма, комплементарно взаимодействуя с короткими РНК митохондрий (Mt-1,-2,-3,-4; а также Mt-5,-6) и их мишенями (соответственно, с транскрипционно активными областями Д-петли; а также с транскриптами ND-4/ND-6-субъединиц НАДН-дегидрогеназы), с РНК праймерами репликации и РНК-компонентами рибонуклепротеидных ферментов (таких, как RNase MRP, RNase P, теломераза), потенциально могут вмешиваться, т.е. позитивно/негативно регулировать в.н. процессы (транскрипции, инициации репликации, процессинга/деградации РНК, воспроизводства энергии; полиаденилирования самих ncRNAs) в органелле.

Кроме того, само применение в эксперименте праймеров длиной в 20-26 нуклеотидов (³²P-меченых) и плазмидных векторов (с клонированным РНК-субстратом, 5'-/3'-концы которого были комплементарны праймеру), также, возможно, косвенно отражает естественно протекающие процессы с вПОТ-опосредованным воспроизведением олигонуклеотидов длиной в один/несколько НЭ, встраиваемых затем в ВВП/РВП-подобные векторы/частицы, – в соответствии с представлениями гипотетической концепции.

А много меньшие число и уровень экспрессии малых РНК, кодируемых в органеллах (Мт/Хп; и по сравнению с таковым в ядерной ДНК высших эукариот), возможно компенсируются большой скоростью/оборотом их воспроизводства при различных провокативных, повреждающих и сигнальных воздействиях, и в процессе сложных ядерно-цитоплазматических взаимоотношений. Это связано с тем, что данные малые ncRNAs кодируются: 1. в наиболее быстро обновляющейся Д-петле; 2. в самих одно/несколько-копийных геномах постоянно обновляющейся мтДНК многочисленных митохондрий каждой эукариотической клетки, имеющей только один ядерный

геном (у дифференцированных клеток, в отличие от пролиферирующих/стволовых, он не копируется). Названные воздействия/взаимоотношения могут быть связаны с изменениями в синтезе, функционировании, воспроизводстве и транслокации НЭ в ядро (в составе ВНП-векторов) и в цитоплазму/ядро (в РНП-частицах). В свою очередь, такие изменения могут вести, в частности, к возможно упреждающим регуляции/контролю (по аналогии с таковыми у транскрипционных факторов) экспрессии ядерных белковых/других генов и некоторых некодирующих/повторяющихся областей генома, в том числе, – за счет включения воспроизводимых на более поздних этапах специфичных пулов ядерно-кодируемых ncRNAs.

Малые РНК хлоропластов

В хлоропластах молодых листьев *N.tabacum* были идентифицированы 5500 cDNA-клонов, в основном представляющих фрагменты известных РНК хлоропластов (межгенных областей, 16S рРНК, тРНК; минорных, 0.4%, фракций деградирующих мРНК) и слабо импортируемые фрагменты РНК ядра (98, 38 и 25 cDNA клонов представляли, соответственно, некоторые тРНК, 5.8S рРНК и малые ядрышковые РНК, snoRNAs); еще 4% клонов относились к неизвестным ядрышковым snoRNAs. Ранее реально импорт в хлоропласты показан, по крайней мере, для некоторых тРНК [43].

Среди 10% неизвестных хпРНК органеллы (а 90% известной хпРНК представляли клоны тРНК/рРНК) обнаружено 12 новых кандидатов в малые некодирующие РНК хлоропластов (следующие ncRNAs: Ntc-1,-2,...,-11,-12), представляющих различные области генов (рРНК, белков, тРНК) и межгенные области генома хлоропластов. Некоторые из них, считают, могли быть продуктами альтернативного процессинга/сплайсинга хпРНК, – или коротких РНК, появившихся в результате инициации альтернативной транскрипции хпДНК [43]. Они являются производными, прежде всего, межгенных областей, имеют длину и располагаются, соответственно, между/вблизи следующих генов: Ntc-3, 44 нуклеотида, между генами 4.5S и 5S рРНК; Ntc-4, 40 нуклеотидов, между генами 16S рРНК и тРНК^{Иле}; Ntc-5, ориентирована в обратном направлении ' к 3'-UTR и кодируется нитью, комплементарной *atpE* гену, вплотную к 3'-части гена тРНК^{Met}; др. [43].

Среди кандидатов в малые ncRNAs имеются следующие фрагменты рРНК, белков, тРНК: 16S рРНК (Ntc-12); 3'-части рибосомального белка *rps7* (Ntc-2; высококонсервативна у более 1000 растительных видов); и интронной области тРНК^{Ала} (Ntc-6). Шесть из малых ncRNAs экспрессировалась на высоком или достаточно высоком уровне (Ntc-12, в 53 нуклеотида; Ntc-1, в 24 нуклеотида; Ntc-2, в 22-24 нуклеотида, перекрывается с ОРС *ndhB* гена; Ntc-3, Ntc-4, Ntc-5), а остальные шесть, – на низком уровне (Ntc-6, в 19 нуклеотидов; Ntc-7, Ntc-8, Ntc-

9, Ntc-10 и Ntc-11). Восемь малых ncRNAs кодировались в **межгенном** пространстве (Ntc-1, Ntc-3, Ntc-4, Ntc-7, Ntc-8, Ntc-9, Ntc-10, Ntc-11); две, – в **интронных** областях: – {1. Ntc-5 транскрибировалась вместе с тРНК^{Met} и в антисенс ориентации к нетранслируемой 3'-UTR области хп-гена *atpE*, вероятно усиливая синтез АТФ (это допускает сопряжение процессов синтеза белка и производства АТФ); 2. Ntc-6 кодировалась интронной областью тРНК^{Ala}} [43]. Заметим, что локализация экспрессируемых Ntc-ncRNAs (в межгенных областях, участках рРНК/белков/тРНК) не определяла уровень их экспрессии. Это созвучно ранее предложенному «правилу исключений», сформулированному в отношении переключения на один из предпочтительных, – из набора многих возможных, – типов белок-белковых взаимодействий, – и в условиях конкретной молекулярной системы [4].

Геномы хлоропластов обычно экспрессируются **светозависимо** и в рамках системы со сложным транскрипционным паттерном: в отличие от мтДНК (по крайней мере, животных), хпДНК имеет несколько промоторов с варьирующей в широком диапазоне длиной и обнаруживает множество альтернативных сайтов инициации транскрипции для одного и того же гена или оперона [43,31]. Кроме того, здесь функционируют 2 вида РНК-полимераз: кодируемый органеллой эубактериальный (PEP), и кодируемый ядром бактериофаг-подобный (NEP) типы. Для фотосинтетической активности хлоропластов требуются оба типа полимераз [33,34]. Малые ncRNAs хлоропластов разных, даже достаточно отдаленных видов, обнаруживают существенную гомологию, – вероятно связанную с выполнением ими важной консервативной функции [43].

Отступление 10: таким образом, 8 из 12 кандидатов в новые малые хп-ncRNAs кодировались межгенными областями. Эти малые ncRNAs (Ntc-1,-3,-4,-7,-8,-9,-10,-11), как правило, располагались между/вблизи генов тРНК/рРНК, реже – генов белков. Ntc-12 была фрагментом митохондриальной 16S рРНК. Ntc-2 кодировалась 3'-частью гена рибосомального белка *grs7*, а Ntc-5 и Ntc-6 – интронами, соответственно, белкового гена *atpE* (нитью, комплементарной 3'-UTR-области) и гена тРНК^{Ala}. Половина всех малых ncRNAs (Ntc-1,-2,-3,-4,-5,-12) экспрессировалась на высоком или достаточно высоком уровне; а оставшиеся шесть (Ntc-6,-7,-8,-9,-10,-11), – на низком уровне. Длина малых ncRNAs была определена у половины из них: у Ntc-1,-2,-6 она колебалась в диапазоне 19-24 нуклеотида (соответствует как минимальной длине ncRNAs, так и длине рабочего участка зрелых ядерно-кодируемых микро-РНК эукариот; а также, длине минимального НЭ), а у Ntc-3,-4,-12 она составляла 40-53 нуклеотида (почти в 2 раза больше).

Кроме того, в хпДНК: 1. имеется не один, а несколько различной длины промоторов и несколько альтернативных сайтов инициации транскрипции (в том числе, светозависимой) одного и того же гена/оперона; заметим, что

светозависимыми в Хп являются и некоторые виды редактирования РНК; 2. здесь функционируют 2 вида РНК полимераз: кодируемый хлоропластами эубактериальный, и кодируемый ядром бактериофаг-подобный типы. Упомянутые здесь высоко/низко экспрессирующиеся ncRNAs, вероятно, могут участвовать в процессах регуляции экспрессии (транскрипции или транскрипции/трансляции) некоторых генов органеллы: тРНК, рРНК, белков; в свою очередь, процессируемые/деградируемые продукты транскрипции хп-генов необходимы для инициации репликации хпДНК. Важно, что за эволюционно значимое время (по мнению ряда исследователей) генетическая информация предпочтительно поступает из Хп в Мт/Ядро [65]; хотя и в мт-генах (высших растений) имеются сайты, происхождение ДНК в которых связывают с ядром и пластидами [10].

Понятно, что НЭ, воспроизводимые гипотетическим вПОТ-механизмом, предположительно могут комплементарно взаимодействовать, как и в случае митохондрий, с малыми РНК хлоропластов (Ntc-1,...,-12; они расположены рядом/между генами: тРНК/рРНК, внутри генов рРНК, внутри интронов белков, тРНК), РНК-продуктами их генов-мишеней, и с РНК-праймерами и затравками транскрипции/репликации. Поэтому НЭ могут позитивно/негативно вмешиваться во все выше названные процессы (транскрипции, репликации, процессинга/деградации РНК; а в случае Ntc-5, – воспроизводства энергии), потенциально регулируемые этими малыми ncRNAs.

А обнаруженная гомология между ncRNAs хлоропластов отдаленных видов фотосинтезирующих, вероятно, связана с природой формирования этих малых РНК. Эта природа, в контексте предлагаемых гипотетических механизмов, определяется, по крайней мере, двумя главными причинами: прежде всего, во-первых, общностью физических (компонент т.н. энерголучевого потока, ЭЛП, абсорбируемого тилакоидами/хлоропластами) и физико-химических факторов (внутренней среды клеток фотосинтезирующих, зависимой, в свою очередь, от окружающих условий в твердой, жидкой и воздушной средах), влияющих на формирование НЭ при вПОТ. Во-вторых, – функционированием т.н. ГЧОС-системы (Генетической Челночной Обратной Связи), позволяющей обмениваться генетической информацией (в том числе небольшими ологонуклеотидными участками длиной в один/несколько НЭ внутри ВВП/РВП) между различными биологическими видами одного/нескольких сообществ (это горизонтальный/псевдогоризонтальный перенос), и описанной в предыдущих работах [2,5,8, др.].

Заметим, что локализация малых Ntc-ncRNAs, экспрессируемых в различных участках генов/генома хпДНК, не определяла уровень их экспрессии (это соответствует предложенному ранее «правилу исключений» в отношении переключения на один, – из многих возможных, – предпочтительных типов белок-белковых взаимодействий в контексте конкретной молекулярной системы [4]).

Примирование репликации в кинетопластах (митохондриях) трипаносом

Праймазы PRI1 и PRI2 трипаносомы *T. brucei* важны (как и АТФ) для роста и репликации митохондриальной, т.е. кинетопластной ДНК (кпДНК), и ингибируются RNase-H. Эти праймазы, максимальный уровень экспрессии которых достигается в момент синтеза ДНК, содержат РНК-узнающий и PriCT-2 мотивы и являются членами архебактериально-эукариотического суперсемейства, связанного с праймазами нуклеоцитоплазматических больших ДНК-вирусов эукариот [35,36].

Кинетопластная ДНК представляет собой сеть, включающую, во-первых, максикольцевую ДНК (по ~20-30 колец, в ~23 kb длиной каждое). В большинстве эукариотических организмов это эквивалент Мт-генома, кодирующий гены рРНК и гены белков окислительного метаболизма (но не тРНК, кодируемые ядром [32]). Во-вторых, сеть включает миникольцевые ДНК (сотни-классов; тысячи экземпляров колец в ~1 kb длиной каждый), кодирующие малые «гид»-РНК (gRNAs, в среднем, по 1-4 копии на кольцо), которые служат матрицами для U-вставочно/делеционного редактирования РНК в новосинтезирующихся транскриптах пре-мРНК максиколец. Интересно, что срединно-информационный участок «гид»-РНК (15-30 нуклеотидов [60]), также как и некоторые другие названные в статье компоненты, соответствует длине минимального НЭ [5].

Таким глобальным редактированием РНК, опосредованным «гид»-РНК, а не кодированием в максикольцах кпДНК, иногда воссоздается более 90% аминокислотной последовательности белков (например, субъединицы цитохромоксидазы, CO-III; субъединицы ATPase-6; ND8-субъединицы NADH-зависимой убихинон-оксидоредуктазы [40,5]). Своим размером (~1000 нуклеотидов), влиянием на экспрессию максикольцевой ДНК (здесь, – через редактирование РНК) и наличием консервативных CSB-блоков, миникольцевая ДНК напоминает контрольную область (control region) реплицирующей/транскрибирующей мтДНК млекопитающих (когда с участием mtTFA-фактора происходит выбор между LSP/HSP-промоторными сайтами инициации транскрипции, и, далее, инициации репликации, соответственно, с H- и L-нитей).

Репликация миниколец и, по крайней мере, первого фрагмента Оказки отстающей нити, иницируется РНК-примированием со специфического ориджна (с выходом в однонаправленные интермедиаты тета-θ-типа) [35]. Лидирующая и отстающая нити сопряженно реплицируют в новосинтезированных свободных миникольцах с ориджна инициации (содержащего, как и другие эукариоты, CSB-1,-2,-3 консервативные блоки) вне сети, в т.н. кинетофлагеллярной зоне (KFZ), – между диском кинетопластной сети и мембраной кинетопластов. Лидирующая нить иницируется примирующим механизмом у CSB-3 блока (универсального в

миникольцах; РНК-примирование ДНК-репликации миниколец известно уже более 20 лет), а отстающая, – внутри CSB-1 блока [35]. Затем миникольца мигрируют (механизм неизвестен) к противоположному краю диска кпДНК, подвергаются прерывистой репарации (здесь также возможно участие РНК-праймера) и часть из них присоединяется к сети. Мигрируют также еще несколько белков, предположительно собираемого по частям мультимерного комплекса: топоизомераза II, ДНК-полимераза-β, эндонуклеаза SSE1, два ориджн-связывающих белка, UMSBP и P38, ДНК-лигаза-кβ, ДНК - связывающий белок KAP4 и белок с неизвестной функцией P93. При этом поликлональная антисыворотка к бактериальной праймазе dnaG одновременно узнавала и PRI1 и поврежденный продукт нуклеазы. Максикольца из сети кпДНК не освобождаются, и реплицируют, топологически сближаясь с миникольцами и другими максикольцами. Ранее праймазная активность была показана (выделен очищенный белок) в отношении паразитической протисты *C. Fasciculata*.

В работе авторов (Hines J.C., Ray D.S. [35]) был определен кпДНК-специфический ген ДНК-праймазы PRI1 *T. brucei* (на поли-dA/dT-матрицах PRI1, in vitro; синтезирует РНК праймер длиной до 70-80 нуклеотидов), кодирующий белок, локализующийся в митохондриях. Нейтрализация пре-мРНК PRI1 (методом интерференции РНК, РНКи, за срок в 3-4 дня) вела к потере и макси- и миникольцевой компонент ДНК. РНКи (RNAi) мРНК праймазы PRI2 также вызывала потерю кпДНК и накопление ковалентно-замкнутых свободных миниколец [36]. При этом в 80% случаев ингибировался синтез максиколец, и в 20% – миниколец [35]. Из этого, тем не менее, не обязательно следует, согласно авторам [35], что: 1. второе было исключительно следствием первого: количественный синтез общей гетерогенной массы и отдельных популяций легко/постоянно самообновляющихся миниколец всегда более лабилен, чем таковой в отношении только много более редких и консервативных максикольцевых ДНК; 2. что роль PRI1 в синтезе отстающей нити (фрагментах Оказаки) была нейтральной, т.к. небольшое количественное смещение общего содержания миникольцевой ДНК могло сопровождаться значительным изменением качественного состава, – или полным исчезновением определенных популяций миникольцевой ДНК [5]. Праймеры длиной менее 10 нуклеотидов (источником их считают: процессинг и/или быстрое вовлечение ДНК-полимеразой короткой части пре-РНК-праймера) находили в новосинтезированной лидирующей нити миникольцевой ДНК (in vivo). К настоящему времени мало известно про инициацию репликации мини- и максиколец [35], которые, тем не менее, могут быть связаны с НЭ-опосредуемым механизмом.

Отступление 11: Таким образом, без РНК-примирующих митохондриальных праймаз PRI1/PRI2 (и, соответственно, без праймера от менее десяти, и до 7-8 десятков нуклеотидов) фиксируют отсутствие репликации и самих мини- и максикольцевой кпДНК трипаносом. В контексте предлагаемой гипотезы можно предположить, что ВПОТ-механизм (и его продукт – НЭ) могут регулировать следующие процессы:

1. воспроизводства/селекции таких и стольких «гид»-РНК (имеющих срединно-информационную часть, подобную по длине НЭ) и миниколец (имеющих свойства Д-петли контрольной области мтДНК), которые содержат именно востребованные вПОТ-механизмом консенсусные варианты НЭ; эти последние, не исключено, могут влиять на свойства миграции/репарации миниколец;
2. затем эти «гид»-РНК (содержащие востребованные вПОТ-механизмом НЭ), и в соответствующих миникольцах, участвуют в транскрипции (экспрессии) всех или только определенных генов максикольцевой ДНК (аналог самой мтДНК) трипаносом, имеющих сложный жизненный цикл (живущих свободно, – или паразитирующих в крови/тканях млекопитающих, растений, др.), при котором, в зависимости от условий, часть генов (прежде всего, субъединиц воспроизводства макроэргов трипаносомы) может быть активированной или инактивированной.
3. при этом НЭ, частично/полностью комплементарно взаимодействуя с РНК-праймером, участками мини-/максикольцевой ДНК, вероятно может вмешиваться в процессы регуляции транскрипции/репликации кольцевых компонент кпДНК (мтДНК).
4. кроме того, встраиваясь в миникольцевую ДНК, формируя качественно новые последовательности «гид»-РНК, далее НЭ имеет потенциальную возможность перемещаться в различные участки максикольцевой ДНК (в повторяющиеся последовательности, и затем в гены), которая, как и всякая мтДНК, в свою очередь, имеет сложные регуляторные (конкурентно-симбиотические, генетические) взаимоотношения с ядром и геномом (его ядерно-митохондриальными, т.е. NUMTs-подобными сайтами).

Репликация и примирование в хромосомах

Известно, что в случае репликации хромосомной ДНК также имеются лидирующая и отстающая нити (рост нитей, идет, соответственно, в $5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$ направлениях). Репликация прокариот ассоциирована с цитоплазматической, а эукариот – с ядерной мембранами. Рост отстающей нити ДНК в $3' \rightarrow 5'$ направлении прерывист (это условное направление), и на самом деле связан с ростом отдельных, т.н. фрагментов Оказаки, в стандартном $5' \rightarrow 3'$ направлении. Этот рост задерживается в связи с удалением нуклеазами каждой иницирующей РНК-праймерной затравки (включая специально синтезируемые, др.), и

с последующим объединением каждого из элонгированных фрагментов Оказаки в единую нить (рядом с репликативной вилкой).

В одной только клетке дрожжей требуется очень быстро воспроизвести и процессировать до миллиона фрагментов Оказаки (длиной в ~1000 нуклеотидов каждый), а в клетке млекопитающих, за считанные часы, – до 50 миллионов таких фрагментов (у человека их 30-60 млн. [57]) и РНК-праймеров, формирующих РНК/ДНК-гибриды, – за репликацию (генерацию клеточного цикла). В каждой хромосоме эукариотических клеток существует множество ориджнов, формирующих репликативные вилки [70]. Длина фрагментов Оказаки у бактерий, в частности *E.coli*, составляет около 1000-2000 нуклеотидов, и в синтезе ДНК участвует ДНК-полимераза-III (Pol-III). У эукариот, обычно, длина фрагментов Оказаки составляет 100-200 нуклеотидов, и элонгация синтеза ДНК продолжается с участием ДНК-полимеразы- δ .

Главными ферментами репликации являются ДНК-полимеразы (включая нуклеазные активности), геликазы, топоизомеразы, лигазы и праймазы; не менее важны ДНК-связывающие белки. Репликация состоит из большого числа последовательных этапов (семь из них):

1. узнавание точки репликации;
2. расплетание родительской двунитевой молекулы;
3. удержание нитей на достаточном расстоянии друг от друга;
4. инициация синтеза новых нитей ДНК;
5. элонгация нитей;
6. закручивание нитей в спирали и суперзакручивание спиралей;
7. терминация репликации [70]. Непрерывный синтез с единичного сайта репликации лидирующей нити производится полимеразой- ϵ (Pol- ϵ).

Синтез и созревание отстающей нити требует включения множества активностей и происходит, во-первых, с участием комплекса, образованного праймазой (это гетеротетрамер РНК-полимеразы; синтезирует комплементарный соответствующему участку ДНК праймер в 7-14 рибонуклеотидов) и ДНК-полимеразой- α , Pol- α . Это интегральный бифункциональный комплекс эукариот, образованный также 2-мя субъединицами, белками p55 и p48 (с М.М. в 55 kD и 48 kD) у человека, связывающимися с онДНК, и с ДНК/РНК-дуплексом [70]. Изолированная праймаза синтезирует мультимерные праймеры, тогда как комплексом Pol- α /праймаза синтезируются короткие дискретные продукты длиной около 10-20 нуклеотидов (т.н. α -сегменты), среди которых могут быть и ошибочные. Последние удаляются нуклеазной активностью Pol- δ , FEN1 или MSH2/MLH1-ферментного комплекса, репарирующего неправильно спаренные основания с участием экзонуклеазы EXO1, действующей в '5→3' и 3'→5' направлениях. Во-вторых, в элонгации ДНК фрагментов Оказаки

отстающей нити принимает участие полимераза-δ (Pol-δ). Праймаза и праймеры необходимы для инициации репликации обеих нитей. В связи с выше сказанным ясно, что репликация в хромосомах является РНК-примируемым, высоко упорядоченным и требующим повышенной точности регуляции процессом [70].

Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) образует платформу, координирующую последовательно доступ/диссоциацию и физическое взаимодействие конкурирующих за ДНК-субстрат полимеразы-δ (Pol-δ), нуклеазы FEN1 (ее R192-метилованных и S187-фосфорилированных форм) и ДНК-лигазы-I. Заметим, что Pol-δ, обладающая нуклеазной/полимеразной активностями, способна вытеснять РНК праймер, заполнять короткие пробелы длиной в 2-10 дезоксирибонуклеотидов, и, взаимодействуя с 3' экзонуклеазой, наращивать, обычно, 1-2 нуклеотида в смещаемой ДНК-нити. А FEN1 – узнает разветвленные структуры и делает надрезы между онДНК и днДНК [70]. Но для эффективного удаления РНК праймеров также существенны, по крайней мере, активности нуклеаз RNAase-H и DNA2.

Последняя узнает и надрезает предпочтительно 5-длинными участками ДНК, в которых удаляется часть срединной ДНК, – что ведет к появлению коротких участков; в отличие от дрожжевой, человеческая DNA2 предпочтительно мигрирует в митохондрии [70]. Если в области РНК/ДНК-гибрида длина онДНК составляет более 30 нуклеотидов (заметим, это длина одного/нескольких НЭ), то для ингибирования здесь активности эндонуклеазы FEN1 привлекаются онДНК-связывающие белки (например RPA, replication protein A). Эти белки стягивают онРНК-праймер и обнажают большую часть РНК/ДНК-гибрида для надреза его эндонуклеазой DNA2. Генерируются короткие, в 5-7 нуклеотидов участки, устойчивые к действию связывающих белков и DNA2-опосредованным надрезам (касается, в основном, дрожжей и низших эукариот) [70].

При отсутствии точности процессинга фрагментов Оказаки, эффективности удаления РНК праймеров (нуклеазами, ферментами репарации), ориджны репликации являлись бы сайтами горячих точек – чего, однако, не наблюдают. Одновременно, у мышей мутации белков (за счет неизвестного механизма), – участников этого процесса, – вели к разрывам в днДНК, хромосомным абберациям, перестановкам, полиплоидии/анеуплоидии, – т.е. к признакам, характерным для раковых клеток [70]. Механизм поддержания симбиотического сосуществования геномов ядра и органелл (митохондрий, хлоропластов) до сих пор остается интригующе неясным [67].

В отстающей нити ядерной ДНК, имеющей при репликации не мало общего с репликацией отстающей L-нити мтДНК, образуются застраиваемые ДНК-полимеразой-δ бреши и разветвленные РНК/ДНК-

структуры, превращающиеся при репликативной репарации в nick-структуры, и, далее, в двуспиральную ДНК [70,57]. Действие нуклеаз может тормозиться выше лежащим РНК-праймером.

В отношении часто обнаруживаемых единичных/нескольких 5'-монорибонуклеотидов (5'-МРН; и даже целого праймера) РНК/ДНК-дуплекса, модифицирующих спираль хромосомной ДНК, требуется не один акт репарирующего действия нуклеаз, т.к при неудалении они включаются ДНК-лигазой-I в отстающую нить ДНК-дуплекса, проявляющего нечувствительность к расщеплению щелочью; смысл включения 5'-МРН не ясен [70,57]. Такая новая/расширенная активность ДНК-лигазы-I получила название «соединяющей монорибонуклеотиды лигированием» (“junction monoribonucleotide ligation”). **Лигазы** функционируют АТФ-зависимо (у животных и бактериофагов) и НАДН-зависимо (в бактериальных клетках), их активность повышена в пролиферирующих клетках, и предполагают, что они вносят основной вклад не только в катализ образования фосфодиэфирной связи между 3'-ОН группой нового фрагмента ДНК и 5'-фосфатной группой предыдущего фрагмента Оказаки (отстающая нить облигатно нуждается в лигазе), но и во включение рибонуклеотидов в геном. Таких рибонуклеотидов могут быть многие тысячи. ДНК-лигазы-II/III больше причастны, соответственно, к процессам репарации и рекомбинации. В клетках прокариот почти всегда находятся лигазы, способные соединять, по крайней мере, олиго-рибо-/дезоксирибо-моонуклеотиды [70,57]. Аналогичный вклад с неудалением рибонуклеотидов также связывают и с нуклеазами [57].

Таким образом, перечислим: nick-трансляция (при эксперименте, – введение с олигонуклеотидным зондом цветной, флюоресцентной или радиоактивной метки по одно-/двунитевым разрывам ДНК), нуклеазами направляемое надрезание, полимеразами направляемое заполнение пробелов, образование длинных и не удаляемых FEN1 структур, и последующее действие лигаз, – могут быть критическими факторами, необходимыми при репликации как ядерной, так и митохондриальной ДНК.

Каждый фрагмент Оказаки на отстающей нити примирется независимо, и РНК-праймер удаляется из него до соединения соседних фрагментов. Для процессинга фрагментов необходимо, чтобы они взаимодействовали с соседним выше лежащим РНК-праймером только после надрезания соединяющего их рибонуклеотида нуклеазой (FEN-1/RTH-1). В этой ситуации синтез может продолжаться, – с одновременным вытеснением нижележащего фрагмента, включая монорибонуклеотид, – до тех пор, пока они не будут удалены эндонуклеазной активностью. Более того, присутствие соседнего выше лежащего праймера благоприятно для введения в фрагмент монорибонуклеотида и повреждения хромосомы [70,57]. Поэтому

нарушение созревания этих фрагментов (или их аналогов при синтезе отстающей L-нити мтДНК) увеличивает риск появления одно- и двунитевых разрывов, мутаторного фенотипа и других типов геномной нестабильности, предшествующих повреждению онкогенов, генов супрессоров и усилению инициации роста опухолевых тканей и прогрессии опухоли. Это выявлено в отношении клеток животных, – генетических мутантов по каждому из рассмотренных факторов. В частности, предполагают два основных механизма, связанных с в.н. нарушениями (мутациями). Это: 1. неэффективное удаление РНК праймера нуклеазами и исправление ошибок полимеразой- α , Pol- α [70,57]; 2. эффективное лигирование рибонуклеотидов.

Отступление 12: репликация хромосомной ДНК (про-/эукариот; одна на клетку), также как и мтДНК (их сотни в одной эукариотической клетке), связаны с синтезом лидирующей и отстающей нитей. Но в хромосоме, – это синтез по множеству, а не единичным ориджнам, формирующим репликативные вилки). Набор активностей (полимеразная, эндо-/экзонуклеазная, лигазная, топоизомеразная, праймазная, др.), определяющих различные этапы репликации у прокариот и низших/высших эукариот – схож, но индивидуальные ферменты, – по большей части различны. Отстающая нить наращивается элонгацией и прерывистым соединением миллионов независимо примируемых фрагментов Оказаки (у эукариот их длина, в среднем, на порядок меньше, а число в клетке, наоборот, превышает таковой у прокариот). Как и в случае L-нити мтДНК, репликация ядерной ДНК зависит от примирования РНК-праймерами. В хромосомной ДНК каждый из фрагментов примируется индивидуально. Длина единичного РНК-праймера (7-14/10-20 рибонуклеотидов), синтезируемого комплексом Pol- α /праймаза, близка к таковому для гипотетического минимального НЭ (15-30 нуклеотидов). Изолированная праймаза синтезирует мультимерные РНК-праймеры (что важно в случае синтеза мультикопийного НЭ), тогда как комплексом Pol- α /праймаза синтезируются короткие дискретные продукты в ~10-20 нуклеотидов (т.н. α -сегменты; соответствуют единичному НЭ).

Ошибочные рибонуклеотиды праймера удаляются нуклеазной активностью ферментов: Pol- δ , способной вытеснить РНК-праймер, заполнять пробелы в 2-10 нуклеотидов, наращивать 1-2 нуклеотида в смещаемой ДНК-нити; FEN1, узнающей/надрезающей разветвленные структуры в области между онДНК и днДНК; белков mismatch-репарации MSH2/MLH1, – и с участием экзонуклеазы EXO1. Эффективное удаление самих РНК-праймеров требует также активности нуклеаз RNAase-H и DNA2, – причем нескольких актов репарирующего их действия. В новосинтезируемой отстающей нити ДНК (синтезируемой с лидирующей нити хромосомной ДНК) обнаруживают 5'-монорибонуклеотиды, неудаленные РНКазами (нуклеазами), и включаемые ДНК-лигазой-I (с активностью “junction monoribonucleotide ligation”) в отстающую нить новообразованного ДНК-дуплекса, – т.е. лигазы, как и нуклеазы, также вносят существенный вклад в процесс включения/неудаления рибонуклеотидов (их могут быть многие тысячи) в ДНК генома. Включение

(неудаление) рибонуклеотидов в ДНК отстающей нити может нарушать созревание фрагментов Оказаки (или, аналогично, репликацию L-нити мтДНК), несет потенциальную опасность появления одно-/двунитевых разрывов, мутаторного фенотипа, усиления геномной нестабильности, – и, как следствие, ведет к повреждению онкогенов, генов супрессоров, усилению инициации роста опухолевых тканей и прогрессии опухоли.

Таким образом, стандартный/нестандартный НЭ, предположительно переносимый ВНП (вектор-подобной нуклеиновой последовательностью) или РНП (комплекс НЭ с белками) из митохондрий в ядро (цитоплазму/ядро), и комплементарно взаимодействующий с РНК-праймерами репликации, множеством сайтов их посадки в ДНК ядра, а также с транскрипционно-/ретротранспозон-активными участками генов/генома, потенциально имеет возможность вмешиваться/регулировать процессы инициации стандартной/репаративной репликации, транскрипции (в том числе, влияя на экспрессию транскрипционных факторов), переключения активности межгеновой/внутригеномной регуляции (за счет многих известных, возможно и неизвестных, молекулярно-биологических/эпи-/генетических механизмов). Кроме того, НЭ может вносить определенный динамизм в формирование первично-последовательстной (точечно/блоковой) специфичности и новизны генома, необходимой для возникновения некоторых адаптационных и эволюционных приобретений у клетки/организма/биологического-вида. Также, неполное удаление рибонуклеотидного (в случае РНК-праймера) или дезоксирибонуклеотидного (введенного RT- или полимеразной активностью; также надо учесть возможное действие ДНК-зимной активности) вариантов НЭ из нитей хромосомной ДНК, может вести, соответственно, к появлению/накоплению (характерным и для мтДНК, прежде всего ее L-нити) рибонуклеотидов и последующей замене их дезоксирибонуклеотидами в геноме. Побочными эффектами процесса генетического поиска (в частности, при участии вПОТ-механизма), связанного с регуляторными и первично-последовательственными приобретениями, могут быть выше названные расстройства и повреждения ядерного генома (разрывы ДНК, геномная нестабильность, мутаторный фенотип, опухолевые рост и прогрессия).

Репликация и репарация хромосом дрожжей

В норме, при репликации ядерного генома дрожжей *S.cerevisiae* (как и в случае хромосомальной ДНК других эукариот [57]), также значительное число рибонуклеотидов включалось ДНК-полимеразами Pol- α , Pol- δ , и Pol- ϵ [66]. И также, в случае их неудаления сбалансированным репаративным действием нуклеазной активностью (РНКаза, ДНК-полимераз), и с меньшей эффективностью и точностью, отдельные рибонуклеотиды повторно и (ДНК-контекст)-/(концентрация-dNTPs)-зависимо включались в последующие репликационные циклы генома [46,66]. Повышенное включение рибонуклеотидов в хромосомную ДНК (in-vitro/in-vivo) наблюдали в связи с введением мутаций в ген полимеразы- ϵ (Pol- ϵ) [46]; (что косвенно указывает на возможную

эволюционную связь полимераз, специфичных к разным субстратам, и ДНК/РНК-Миров). Это вело к интенсивным делениям 2-5 пар оснований (смещению участков в ДНК) в специфически ген-ориентированных **повторяющихся последовательностях**, репликативному стрессу и нестабильности генома [46].

В ядре рибонуклеотид-трифосфаты (rNTPs; концентрация их в 36-190 раз превышала таковую для dNTPs) превращались в рибонуклеотид-монофосфаты (rNMPs), – это вело к повышенному их включению в ДНК и негативно влияло на репликацию лидирующей нити. Ее реплицировала ДНК полимеразы-ε (частота включения rNMPs здесь была всего в 2,5 раза меньше, чем, в среднем, в случае встраивания рибонуклеотидов в мтДНК). Отстающую нить реплицировали полимеразы Pol-δ и Pol-α. При этом, в среднем, частота включения rNMPs полимеразой Pol-α была такой же, а Pol-δ – в 10 раз ниже, чем рибонуклеотидов, включаемых в мтДНК [45]. Таким образом, и в хромосомной ДНК неудаленные рибонуклеотиды могут представлять проблему репликации ДНК [46,66].

Помимо того факта, что отдельные/несколько рибонуклеотидов с разной частотой включаются в лидирующую/отстающую нити реплицирующей/нереплицирующей мтДНК [29,68], – как и в отстающую нить ДНК-дуплекса хромосом эукариот (здесь обнаружены 5'-монорибонуклеотиды [70,57]), а также в ДНК бактериальной плазмиды ColE1 (при ингибировании в *E.coli* синтеза белков, например, хлорамфениколом [68]) и в упакованную двунитевую ДНК герпесвируса (HSV) [21], – и учитывая, что синтез любой ДНК не начинается без участия РНК-праймера, интересным представляется еще один факт [62].

Оказалось, что РНК может служить матрицей не только при синтезе ДНК в случае ретровирусов/ретротранспозонов и удлиняющихся теломер, но и, предпочтительно, при репарации двунитевых разрывов (DSBs) у дрожжей; in-vitro/in-vivo), – в частности, экспериментально вводимыми (предполагают, и эндогенными тоже) олигорибо-/дезоксирибонуклеотидами, комплементарными поврежденным, – в том числе отдаленным друг от друга, областям ДНК эукариот, и независимо от локуса хромосомы [62]. К настоящему времени, считая (ограничиваясь предположениями), что в самой клетке такие олигонуклеотиды могут быть только продуктами разной степени созревания транскриптов, процессинга и деградации РНК/мРНК.

Ранее считалось, что репарация DSBs возможна в результате действия только:

1. гомологичной рекомбинации;
2. соединения негомологичных концов поврежденной хромосомы, достраиваемых при участии обратной транскрипции, инициация которой примировалась 3-поврежденным концом, например,

ретротранспозонов Ту-частиц цитоплазмы дрожжей, – с последующим образованием cDNA-последовательности [62].

Длина репарирующих олиго-праймеров, используемых в эксперименте [62], составляла 70-80 (редко, – 45 и менее) нуклеотидов. Олигонуклеотиды были представлены тремя группами: содержащими только ДНК (наиболее эффективная группа), только РНК (эффективная группа; длина не менее 45 нуклеотидов) и различными смешанными ДНК/РНК-вариантами (с включением в олигонуклеотид нескольких концевых или внутренних рибонуклеотидов). Эффективность репарации последней группы с увеличением числа рибонуклеотидов падала, а с увеличением дезоксирибонуклеотидов (независимо от степени гомологичности их поврежденным участкам; они встраивались в один/оба конца рибоолигоструктур), – увеличивалась на 2-3 порядка (особенно в стартовой позиции), в том числе, – за счет предотвращения концевой дегградации, прежде всего, 3'-экзо-РНКазы. Длина и состав олигонуклеотидов, таким образом, влияли на эффективность репарации [62].

Тем не менее, в присутствии некоторых РНК-матриц эффективность репарации дрожжевой ядерной ДНК увеличивалась в 500 раз [62]. При этом, ограниченную активность обратной транскриптазы, в отношении коротких РНК матриц, и независимо от присутствия ниже лежащего пробела, проявляли обычные репликативные ДНК-полимеразы α и δ . Первая была способна использовать 12-рибонуклеотидную матрицу (Mn^{2+} -зависимо), но требовала 20 дополнительных циклов связывание/диссоциация-фермента [62]. У второй полимеразы эффективность синтеза была почти в 3 раза выше и схожей в случае и ДНК- и РНК-матриц, усиливалась фактором пролиферации PCNA, но падала в присутствии выше расположенного РНК/ДНК-дуплекса. Это было показано методом исключения («нокдауном» соответствующих мутантных форм) всех известных и потенциально обладающих обратной транскриптазной активностью полимераз (а также РНКаз и потенциальных ДНК-контаминантов) [62].

Иногда репарация ДНК (например, при участии LINE1 элементов) не требовала полной РНК/ДНК-комплементарности. Это, однако, вело к включению нуклеотидов, которые, в свою очередь, вызывали появление DSBs (разрывов днДНК), блокирование/задержку репарации ДНК, увеличение частоты мутаций, а также трансформацию некоторых клеточных линий, определяемую РНК-содержащими олигонуклеотидами, а не активностью ДНК-полимераз (в частности, REV1, REV3, RAD30) [62]. Данная ситуация, как и способность ДНК-лигазы-I связывать рибонуклеотиды внутри ДНК при созревании фрагментов Оказаки (in vitro), как считают авторы [62], может иметь отношение к синтезу ДНК с рибонуклеотид-содержащих

ДНК-матриц (*in vivo*), имеющих в мтДНК (особенно в L-нити) млекопитающих [68], а также к процессам переноса гомологичной генетической информации с РНК (способной к амплификации в виде ДНК) и регуляции экспрессии, целостности и эволюции ДНК хромосом [62].

Хромосомная ДНК дрожжей *S.cerevisiae* (как и растений, человека) иногда содержит появившиеся относительно недавно короткие/перестроенные последовательности, гомологичные мтДНК. Это соответствует представлениям о переносе генетической информации из Мт в ядро (и, в целом, между ДНК-содержащими органеллами), в частности: 1. при редактировании митохондриальных мРНК [5]; 2. в результате действия гипотетических вПОТ/ВНП-(РНП)-передача механизмов (перенос этих вектора/частиц, с НЭ внутри, из Мт в ядро, или цитоплазму/ядро) [5,7]. Отдельные или группы фрагментов мтДНК естественным образом переносятся в ядро и интегрируют в хромосомы (обычно в некодирующие области, часто вблизи LTRs ретротранспозонов [55]) гаплоидных митотических дрожжей при репарации DSBs-повреждений, – что частично соответствует эндосимбиотической теории происхождения органелл. Заметим, однако, что в случае экспериментального подтверждения образования НЭ в результате деятельности вПОТ-подобного механизма, эта теория, как минимум, будет детализирована; нельзя исключить и того, однако, что она будет пересмотрена.

Происхождение репарирующих вставок было связано с несколькими не смежными областями мтДНК, а их размер/состав был аналогичен тем, что репарируют двунитевые разрывы, DSBs [55]. Эти результаты показывают, что фиксация приобретенной органелльной/мобильной ДНК в области DSBs-сайтов хромосом продолжается [69]. Выше мы уже отмечали постоянно возобновляющийся приток вставок (>3 kb) сегментов хпДНК и мтДНК по множеству специфических сайтов ядерно-митохондриальных (NUMTs) и ядерно-пластидных последовательностей (NUPTs), – компонент динамической фракции ядерных геномов кукурузы [56].

Однако, при репарации DSBs-разрывов механизмом негомологичной рекомбинации, имеющейся и у млекопитающих (соединяются некомплементарные концы), также участвуют и другие последовательности. Как и в случае псевдогенов, длинных (LINES) и коротких (SINES) диспергированных ядерных последовательностей, инкорпорируемых в геномы млекопитающих, вблизи DSBs-сайтов ДНК дрожжей локализуется захваченная сDNA ретротранспозонов Ty1 элементов. 80% этой вставочной сDNA содержит R-U5, т.е. 5'-концевую область мРНК частицы Ty1 [48,63]. Избыточность псевдогенов, LINES и SINES элементов в эукариотических геномах показывает, что феномен обратной транскрипции является, как

минимум, потенциально важным в эволюции генома. Однако, связанный с феноменом механизм запуска (инициации/включения), в основном, остается неизвестным [63].

На появление DSBs-разрывов (в частности, в репликационном *ori5*), гомологичную рекомбинацию (кроссинговером, генной конверсией) и поддержание сохранности мтДНК может влиять даже одна плейотропная мутация ядерного гена (например, MHR1, – гомолога MSH1). MHR1, вместе с другими белками, ответственен за: 1. нормальную (изредка aberrантную) рекомбинацию; 2. избегание точечных мутаций при: mismatch-репарации; эксцизионной репарации; 3. UV/ROS-(УФ/РФК)-индуцированные мутации, ведущие к функциональному угнетению ферментов респираторного пути и температурозависимой репарации мтДНК [42]. Заметим, что гомологичная митотическая рекомбинация у дрожжей (как и некоторых других эукариот) часто развивается по сценарию сестринского хроматидного обмена между: аллельными участками гомологичных хромосом; повторяющимися последовательностями одной и той же, гомологичных или гетерологичных хромосом. Также она зависит от инициирующего события, расположения и длины гомологичных участков рекомбинирующих молекул и генотипа [53].

Тем не менее, также показано, что при гомологичной/негомологичной рекомбинациях хромосомной ДНК дрожжей наблюдали включение ~20% эндогенных реаранжированных ДНК-вставок вблизи DSBs-сайтов [69]. Анализ показал, что это были cDNA-вставки элемента Ty1 (их было 37), которые делились на две группы, – длинные (140–3400 п.о.) и короткие (33-219 п.о.). Некоторые из них состояли из множества не смежных фрагментов мтДНК [69]. {По аналогии, это интересно в контексте возможности формирования опосредуемых вПОТ-механизмом амплифицированных гетерогенных вариантов не минимального, а мультикопийного, (15-30)_n-нуклеотидов, НЭ}.

В другой работе, однако, было показано, что в присутствии функциональной RT-активности (из L1 человека, Ty1 дрожжей и CRE1 Crithidia семейства Trypanosomidae), по DSBs-разрывам, индуцированным HO-эндонуклеазой у MAT-локуса выживших клеток, фиксировались такие cDNA-вставки, структура и соединительные последовательности которых указывали, преимущественно, на негомологичный тип рекомбинации с участием эндогенных ретроэлементов [63]. При синхронном создании таких сайт-специфических DSBs (индуцированных также мегануклеазой I-SceI или вырезанием транспозирующего ДНК-элемента), в большинстве популяций клеток гомологичная/негомологичная типы рекомбинаций ДНК усиливались, – в том числе, за счет связывания с белками, тропными к рекомбинирующей ДНК. В целом, рекомбинация (за счет

смещенной генной конверсии, сопровождаемой кроссинговером, процессами репаративной репликации, спаривания онДНК) вела к структурным изменениям хромосом: транспозиции, транслокации, захвату и делециям малых фрагментов ДНК [30].

На важность фактора ядерно-цитоплазматических взаимоотношений у дрожжей (эукариот) указывает тот факт, что скорость образования спонтанных мутаций ядерных генов, как показало исследование переноса фрагментов ДНК из митохондрий в цитоплазму, и уровень последующей миграции таких фрагментов в ядро, примерно соответствовали друг другу. Вероятность появления фрагментов мтДНК в ядре, что важно, увеличивалась с уменьшением их размеров [64]. Данные фактор и факт соответствуют представлениям о переносе, и предпочтительно переносе небольших олигонуклеотидных последовательностей (в частности, НЭ внутри ВПП/РПП) из митохондрий в ядро.

В эволюционном смысле, важно также допустить, что и мутации, возможно, могут не быть повреждающими в тех случаях, когда они являются синхронно/одновременно сбалансированными в обеих органеллах (или в двух взаимодействующих, например, в тРНК и Аа-тРНК-синтетазе, молекулах) одной клетки, во-первых. Причем такая сбалансированность мутаций, во-вторых, возможно, в некоторых случаях должна быть обусловленной и наследственно, т.е. закрепленной на уровне герминативных клеток (и для этого требуются специальные механизмы, в частности наши гипотетические; однако обсуждение этого вопроса выходит за рамки данной тематики). В конечном счете, в-третьих, сбалансированность мутаций необходима для обеспечения высокой пространственно-временной координации экспрессии генов/геномов органелл и ядра.

Отступление 13: Для репликации любой ДНК требуется РНК-затравка. При репликации ядерной ДНК дрожжей *S.cerevisiae* (как и в случае хромосомной ДНК других эукариот [57]), обнаруживали значительное число рибонуклеотидов, включаемых в геном ДНК-полимеразами (α , δ , и ϵ). Такое включение усиливалось при введении в полимеразы мутаций (в частности в полимеразу- ϵ , Pol- ϵ [46]); косвенно, это указывает на возможную эволюционную связь между полимеразами, ориентированными на разные (РНК/ДНК)-субстраты, и, одновременно, ДНК-/РНК-Мирами. Определенный вклад в связывание рибонуклеотидов при созревании фрагментов Оказакки отстающей нити вносит также ДНК-лигаза-I [66]. Полимеразы- α и - δ , кроме того, обладают ограниченной обратно-транскриптазной активностью. А превращение рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды может быть важным для последующего их встраивания/переноса в ДНК-содержащие клеточные органеллы (митохондрии, ядро; у растений, – и в хлоропласты).

Неудаление рибонуклеотидов нуклеазной активностью (РНКаз, ДНК-полимераз) ведет к повторному (ДНК-контекст)-/(концентрация-dNTPs)-

зависимому включению отдельных из них в последующий репликационный цикл. Мутации в полимеразе-ε (Pol-ε) не только усиливали включение рибонуклеотидов в ДНК, но и вели к интенсивным делециям 2-5 пар оснований в ген-ориентированных повторяющихся последовательностях, репликативному стрессу и нестабильности генома. Концентрация в ядре рибонуклеотид-трифосфатов, гNTPs, в десятки/сотни раз превышает таковую для дNTPs, – что способствует угнетению репликации лидирующей нити ДНК-полимеразой-ε, – при одновременном включении гNTPs в ДНК с частотой, всего в 2,5 раза меньшей, чем, в среднем, при встраивании рибонуклеотидов в мтДНК.

Отстающую нить реплицировали полимеразы Pol-α и Pol-δ, с частотой включения гNTPs, соответственно, такой же, и, в среднем, в 10 раз меньшей, чем в случае мтДНК (общая RT-активность полимераз складывалась из этих индивидуальных активностей, но, по включению рибонуклеотидов, качественно, она была у них была обратной). Кроме мтДНК (интенсивно), хромосомальной ДНК (заметно), включение гNTPs обнаружено также в ДНК бактериальной плазмиды ColE1 (при угнетении синтеза белка хлорамфениколом [68]) и в упакованную двунитевую ДНК герпесвируса (HSV) [21].

РНК, как оказалось, может служить матрицей для синтеза ДНК не только в случае ретровирусов/ретротранспозонов/теломер, но и при репарации двунитевых разрывов ядерной ДНК (DSBs; дрожжи). До сих пор считалось, что DSBs восстанавливаются у дрожжей только гомологичной/негомологичной рекомбинациями (в значительной степени это касается и других эукариот). Восстановление шло за счет: обратной транскрипции, образования и включения сDNA из мРНК Ту1-частиц вблизи DSBs-сайтов ДНК; аналогичный сценарий был характерным и в случае псевдогенов, длинных (LINEs) и коротких (SINEs) диспергированных ядерных последовательностей, которые инкорпорировали в геномы млекопитающих механизмом негомологичной рекомбинации. Также восстановление DSBs шло за счет процессов сестринского хроматидного обмена (между аллельными участками: гомологичных хромосом; повторяющихся последовательностей одной/гомологичных/гетерологичных хромосом), кроссинговера, генной конверсии. Избыток псевдогенов, LINEs/SINEs-элементов в геномах эукариот, очевидно, означает, что феномен обратной транскрипции является, как минимум, потенциально важным не только для регуляции, но и в эволюции генома. Но механизм его запуска (инициации), в основном, остается неизвестным.

Даже одна плейотропная мутация в одном из ключевых генов репарации (например, MHR1, ответственном за рекомбинацию, избегание точечных и индуцированных облучением/свободными-радикалами мутаций, сопровождающихся угнетением ферментов респираторного пути и температуро-зависимой репарации мтДНК) вела к появлению DSBs, точечных и УФ/РФК-индуцированных мутаций, абerrантной рекомбинации, нарушению различных видов (mismatch/эксцизионной) репарации [42].

Матрицей в данном опыте [66], и с различной эффективностью последующей репарации, служили экспериментально вводимые РНК-, ДНК- или смешанные РНК/ДНК-олигонуклеотиды длиной в 70-80, редко – в 45 и

менее нуклеотидов {это сопоставимо с длиной недопроцессированных малых РНК и единичных/амплифицированных (15-30)_n-форм НЭ}. Эти олигонуклеотиды были полностью (1) или частично (2), как в случае репарации с участием LINE1 элементов, гомологичны участкам с DSBs. Во втором случае, однако, репарация сопровождалась появлением вторичных DSBs, блокированием/задержкой репарации ДНК, увеличением частоты мутаций, а также трансформацией некоторых клеточных линий. ДНК-олигонуклеотиды были много более эффективны, чем РНК-олигонуклеотиды или олигонуклеотиды смешанного РНК/ДНК-типа (в которых нуклеотиды вставлялись в центральный и/или концевые участки олиго-прайма).

Некоторые олиго-РНК, и при участии РТ-активности ДНК-полимеразы- α (она могла использовать 12-нуклеотидную матрицу; но требовались повторные циклы связывание/ /диссоциация) и, особенно, ДНК-полимеразы- δ (была в 3 раза более эффективной для ДНК- и РНК-матриц), могли увеличивать эффективность репарации в 500 раз.

Важным является факт, что при гомологичной/негомологичной рекомбинациях хромосомной ДНК дрожжей вблизи DSBs-сайтов наблюдали включение длинных (140–3400 п.о.) и коротких (33–219 п.о.) эндогенных реаранжированных сDNA-вставок (их было ~20%) элемента Ty1, часть которых содержали много не смежных фрагментов мтДНК. Кроме того, в ряде случаев с участием функциональной РТ-активности (из L1 человека, Ty1 дрожжей и CRE1 Crithidia семейства Trypanosomidae), у DSBs-сайтов фиксировались такие сDNA-вставки, структура и соединительные последовательности которых указывали, преимущественно, на негомологичный тип рекомбинации с участием эндогенных ретроэлементов. Оба вида рекомбинации усиливались белками, тропными к рекомбинирующей ДНК. Заметим, что выше мы уже отмечали схожую ситуацию в отношении высших растений, – постоянно возобновляющийся приток не малых (>3 kb) вставок сегментов хпДНК и мтДНК по множеству специфических сайтов, соответственно, ядерно-митохондриальных (NUMTs) и ядерно-пластидных (NUPTs) последовательностей, – компонент динамической фракции ядерных геномов кукурузы [56].

В целом, рекомбинация (за счет процессов: смещенной геномной конверсии, сопровождаемой кроссинговером; репаративной репликации; спаривания онДНК) вела к структурным изменениям хромосом (транспозициям, транслокациям, захвату/делециям малых фрагментов ДНК). Важно, что: скорость образования спонтанных мутаций ядерных генов и уровни переноса фрагментов ДНК из митохондрий в цитоплазму и последующей миграции таких фрагментов в ядро дрожжей (эукариот) примерно соответствовали друг другу; что вероятность появления фрагментов мтДНК в ядре увеличивалась с уменьшением их размеров [64]. Выше названные «скорость» и «уровни» свидетельствуют о возможном переносе различных фрагментов мтДНК в ядро.

Действительно, в данном разделе, касающемся РНК примиряемых репликации и репарации хромосомной ДНК дрожжей, проведен анализ и экспериментально показано, что***:

1. обе нити ядерной ДНК дрожжей *S.cerevisiae* содержат рибонуклеотиды: включаемые с достаточно высокой частотой

- полимеразами (α и δ , – в отстающую нить ДНК; ϵ – в лидирующую нить); лигируемые ДНК-лигазой-I; не полностью удаляемые нуклеазной активностью (РНКаза, ДНК-полимераз); способные к включению в последующем репликационном цикле; (1а. некоторые из рибонуклеотидов могут быть неудаленными остатками РНК-прайма репликации, – или рибо-варианта НЭ, образованного вПОТ-механизмом в митохондриях и переносимого в ядро внутри ВВП/РНП).
2. полимеразы- α и - δ обладают ограниченной РТ-активностью; (2а. это может способствовать превращению рибо- в дезоксирибо- варианты НЭ и включению их в ядерную ДНК; если эти полимеразы проникают в митохондрии, – то это возможно и там).
 3. искусственное введение олигонуклеотидов (РНК-, ДНК-, и РНК/ДНК-типов), частично/полностью комплементарных участкам с DSBs, вело к усилению репарации этих участков (в 500 раз) механизмом, дополняющим или отдельным от гомологичной/негомологичной рекомбинаций; (3а. но это могут быть аналоги эндогенных недопроцессированных коротких РНК, праймеров и схожих с ними единичных/амплифицированных НЭ, потенциально действующих как регуляторы экспрессии генов/генома, и как источники нуклеотидов).
 4. восстановление могло идти за счет: обратной транскрипции (активностями, представленными: ДНК-полимеразами с РТ-активностью – Pol- α /Pol- δ ; многочисленными эндогенными ретроэлементами); репаративной репликации; спаривания онДНК; встраивания cDNA соответствующих мРНК вблизи DSBs-сайтов, где обнаруживали не смежные фрагменты мтДНК (сходный процесс, выше, описан у растений). Все это вело к структурным изменениям хромосом (транспозициям, транслокациям, захвату/делециям малых фрагментов ДНК); (4а. ограничимся главным: наличие не смежных фрагментов мтДНК в ядерной ДНК дрожжей, а также не малых вставок в ДНК растений, – свидетельство возможного переноса ДНК между ДНК-содержащими органеллами, и, косвенно, ВВП с НЭ внутри).
 5. при репарации DSBs в ядерном геноме рекомбинационный генетический обмен разных типов (сестринский хроматидный, кроссинговер, генная конверсия, др.) был связан, в том числе, и с повторяющимися последовательностями; (5а. соответствует представлению, что минимальный/расширенный варианты НЭ, опосредованные вПОТ-механизмом в митохондриях, в виде ВВП могут, прежде всего, «насыщать» повторяющиеся последовательности, откуда, далее, регуляторные сигналы и первично-последовательственные приобретения распространяются в другие повторяющиеся и кодирующие/транслируемые части ядерного генома).
 6. скорость образования спонтанных мутаций ядерных генов и уровни переноса фрагментов ДНК из митохондрий в цитоплазму и последующей миграции таких фрагментов в ядро дрожжей (эукариот) примерно соответствовали друг другу; (6а. соответствует

представлению гипотезы, что варианты НЭ, образованные в митохондриях, в виде ВНП/РНП поступают в ядро и встраиваются хромосомную ДНК; фрагменты мтДНК вблизи DSBs-сайтов действительно обнаружены. Не известно, возможен ли такой перенос напрямую, – или только через предварительный выход ВНП/РНП с НЭ внутри в цитоплазму. Такой перенос РНК-/ДНК-фрагментов может быть важным для достижения клеткой некоторых регуляторных, защитных и эволюционных целей).

7. вероятность появления фрагментов мтДНК в ядре увеличивалась с уменьшением их размеров; (7а. это не противоречит представлению, что именно НЭ, минимальный или амплифицированный его [15-30]_n-вариант, является новой стабильно-воспроизводимой генетической или фено-генотипической единицей).

*** – номера пунктов в скобках и с буквами (1а, 2а, ..., 7а) – комментарий автора.

Таким образом, перечисленные факты/тенденции/выводы не противоречат, по крайней мере, некоторым представлениям, связанным с гипотезой о воспроизводстве нуклеинового эквивалента (НЭ) механизмом вариабельной Позцитопной Обратной Трансляции (вПОТ-механизмом, ассоциированным с митохондриями), встраивании НЭ в вектор-подобную нуклеиновую последовательность (ВНП; или комплексированием НЭ с белками в виде рибо-/дезоксирибонуклеопротеида, РНП/ДНП), и последующей передаче/внедрении ВНП (или РНП/ДНП, с НЭ внутри) в различные повторяющиеся/некодирующие/нетранслируемые (а также кодирующие, – но, скорее, не в один этап) участки ядерного/митохондриального геномов.

Праймер-опосредованная репликация у бактерий (их плазмид, фагов)

Одной из возможных основных функций Д-петли ДНК митохондрий, считают, может быть ее роль в формировании праймера при репликации мтДНК (в связи с нить-асимметричной и нить-сдвоенной моделями репликации мтДНК) [68]. При этом, предполагают, что способ праймер-опосредованной инициации репликации Н-нити мтДНК может быть подобным известному для однонаправленной репликации бактериальной плазмиды ColE1 (и ее rBR-производных, созданных на основе репликона природной плазмиды ColE1 вместе с генами устойчивости к антибиотикам) [25,27] и бактериофагов [27]. Поэтому, необходимо рассмотреть репликацию ДНК у современных прокариот, учитывая, что пре-прокариоты могли быть захвачены другими одноклеточными, с которыми, далее, и продолжилось их симбиотическое выживание в качестве одно-/многоклеточных эукариот.

У бактерии *E.coli* репликация двунаправленная, с одновременным синтезом лидирующей и фрагмент-Оказаки/праймер-опосредуемым

синтезом отстающей нити двумя α -субъединицами ДНК-полимеразы-III у каждой из двух вилок репликации. 5'-конец праймера содержит около 10 рибонуклеотидов, удаляемых ДНК-полимеразой-I, и, далее, фрагменты ДНК сшиваются лигазой. Средняя скорость удлинения ДНК бактерий почти в два раза ниже чем у вирусов, но превышает таковую в нуклеосомной ядерной ДНК млекопитающих и растений на 1-2 порядка. Интегральная скорость репликации эукариотической ДНК клетки компенсируется за счет сотен/тысяч сайтов инициации (репликационных вилок), с которых одновременно синтезируются растущие и сближающиеся друг с другом соседние ДНК-репликоны хромосом. При этом, и за счет взаимодействия с ДНК-связывающими белками, каждый ориджн репликации используется, в основном, только один раз. Частота ошибок при репликации ДНК, обычно, не превышает 1 на 10^9 – 10^{10} нуклеотидов (за генерацию клеточного цикла).

Репликация плазмиды ColE1

Ферменты репликации плазмиды ColE1 принадлежат клетке-хозяину. Подобно мтДНК млекопитающих, ColE1 поддерживается и размножается как кольцевая молекула, и включает рибонуклеотиды, например, в присутствии ингибитора синтеза белков – хлорамфеникола. Это сопровождается появлением фактора наследственной нестабильности ("nucleotide discrimination factor") в реплисомах *E.coli*, действующего в соответствии с одним из нескольких механизмов лекарственной устойчивости [68].

Область начала репликации содержит два промотора: один из них связан с синтезом РНК-праймера (RNA-II), необходимого для инициации репликации плазмиды; другой – с RNA-I, продуктом одноименного гена, ингибитора праймер-опосредованной инициации репликации. RNA-II имеет две альтернативные конформации: альфа-бета (активно иницирует репликацию; только здесь RNA-II в составе РНК/ДНК-гибрида, – субстрат RNAase-H), и бета-гамма (репликацию не иницирует). Выбор последней зависит от первичной/вторичной/третичной структур участка в 21 нуклеотид, расположенного между позициями «-»359 и «-»380 [25]. Надрезанная RNA-II и ненадрезанная пре-RNA-II своей G-богатой петлей (в 265 нуклеотидов) стабильно гибридизуется с ДНК-матрицей (C-богатым участком ДНК) у сайта репликации, и используется ДНК-полимеразой-I в качестве праймера (в отсутствие этого фермента могут функционировать ДНК-полимераза-III, др.; G- и C-богатые области консервативны у видов) при репликации с лидирующей нити ДНК. Минимально эффективным праймером может служить 3'-конец RNA-II. При гибридизации также создается нетранскрибируемая область однонитевой ДНК (онДНК),

выполняющей роль матрицы для синтеза ДНК отстающей нити в отстутствии ДНК-полимеразы-I [25].

У этой плазмиды репликация регулируется комплементарным взаимодействием новосинтезированного транскрипта гена RNA-II (т.е. 5'-концевой области праймерной затравки) с антисмысловым, блокирующим функцию RNA-II продуктом гена RNA-I. Концентрация RNA-I (антисенс-праймера) внутри клетки, – критический параметр репликации; степень полиаденилирования RNA-I, как и некоторых бактериальных мРНК, регулирует уровень их стабилизации и последующее взаимодействие с RNA-II. Кодированные нити и направление транскрипции RNA-I/II генов противоположны. Образованию RNA-II предшествует надрез пре-RNA-II (длиной в 550 нуклеотидов,) нуклеазой RNAase-H. RNA-I (длиной 108 нуклеотидов) полностью комплементарна 5'-концевой последовательности пре-RNA-II и осуществляет количественный контроль плазмиды, зависимый от репликации. Дегградация RNA-I инициируется отщеплением 5'-пентануклеотида (РНКазой) и 3'-полиаденилированием, изменяющим вторичную структуру РНК (поли-А-полимеразой, рсрВ) [25].

Длина RNA-II варьирует (в диапазоне ~80-360 нуклеотидов), и репликация плазмиды инициируется более эффективно при более медленном взаимодействии RNA-I с укороченным вариантом RNA-II. Взаимодействие между RNA-I и RNA-II нейтрализует инициацию репликации RNA-II-затравкой, но только до тех пор, пока синтезируется короткий транскрипт RNA-II, длиной не более 80 нуклеотидов. Скорость образования стабильного RNA-I/RNA-II-гибрида, из нестабильного промежуточного, является определяющей для эффективного блокирования репликации плазмиды полностью комплементарными друг другу RNA-I и 5'-концевой областью RNA-II [25].

Интересно, что повышенные концентрации РНК-праймера (как и наличие инактивированных мутациями поли-А-полимераз, полинуклеотид-фосфорилаз и соответствующих рибонуклеаз) могут увеличивать степень полиаденилирования и, тем самым, стабильность и период полужизни других РНК-матриц (продуктов генов).

Ускоренная деградация поли-А-RNA-I-5 может инициироваться полинуклеотид-фосфорилазой, ПНФ (фактор усиления действия репликационного РНК-праймера). Если 3'-концевой нуклеотид этой RNA-I-5 находится внутри шпильки, – это препятствует эффективному действию ПНФ (хотя вклад в дегградацию могут вносить и другие нуклеазы). Однако, когда короткий поли-А-хвост выступает за пределы шпильки, RNA-I-5 эффективно расщепляется ПНФ 3'-экзонуклеазным механизмом (это требует расхода АТФ геликазой, белком DnaK, энолазой, белком теплового шока, др.). Поли-А-RNA-I-5 имеет период полужизни, как и типичные бактериальные мРНК, 1-2

минуты, тогда как его не-поли-А-продукты, – более 10 минут. Поли-А-концы бактериальных мРНК короче соответствующих эукариотических: их длина, в среднем, составляет 14-16 нуклеотидов (при 80-200 – у эукариот). Полиаденилируются только 1–40% молекул мРНК отдельного вида, тогда как у эукариот, – около 100%. Полиаденилирование в бактериальных клетках дестабилизирует 3'-шпилечные RNA-I, – и стабилизирует линейные новосинтезируемые мРНК (что также ведет к усилению действия: 1. репликационного РНК-праймера, т.е. репликации – за счет деградации RNA-I; 2. необходимых для репликации активностей/белков). Системы деградации бактериальных РНК в составе сложных мультиферментных частиц/комплексов получили название деградосом.

Отступление 14: Поскольку бактериальная ДНК – один из рассматриваемых видов хромосомной ДНК; и т.к. считается, что бактериальные предшественники были захвачены другими одноклеточными организмами с образованием эукариотических клеток, содержащих два-три ДНК-генома в соответствующих органеллах (митохондриях, ядре, а у растений и в хлоропластах); а также в связи с тем, что праймеропосредованная инициация репликации в мтДНК может быть схожей, в частности, с таковой для бактериальной плазмиды ColE1 (ее рBR-производных, бактериофагов), – необходимо рассмотреть синтез ДНК у прокариот.

У бактерии *E.coli*, например, репликация двунаправленная и одновременная для лидирующей и фрагмент-Оказаки/праймер-зависимой отстающей нитей. Праймер на 5'-конце содержит около 10 рибонуклеотидов, удаляемых ДНК-полимеразой-I, и, далее, фрагменты ДНК сшиваются лигазой. Средняя скорость удлинения ДНК бактерий несколько ниже чем у вирусов (в ~2 раза), но сильно превышает таковую для нуклеосомной ядерной ДНК млекопитающих и растений (на 1-2 порядка). Интегральная скорость репликации у эукариот компенсируется повышенным количеством ориджнов (сотен/тысяч сайтов инициации репликационных вилок; каждый используется один раз). Частота ошибок в хромосомной ДНК, обычно, не превышает 1 на 10^9 – 10^{10} нуклеотидов (за генерацию клеточного цикла); в митохондриальной ДНК эта частота, в среднем, на порядок больше (а в области Д-петли – еще на порядок).

Подобно кольцевой мтДНК млекопитающих, плазида ColE1 включает рибонуклеотиды, например, в присутствии ингибитора синтеза белков, – хлорамфеникола (что может быть, в частности, следствием не полного удаления РНК-праймера или НЭ; или результатом взаимодействия РНК-праймера с НЭ, – при вмешательстве последнего в процесс регуляции инициации репликации плазмиды).

Репликация плазмиды, и при активности некоторых нуклеаз (и других ферментов), регулируется скоростью синтеза и распада РНК/РНК-гибрида, образованного РНК-комплементарным взаимодействием продуктов двух генов плазмиды, противонаправленно транскрибируемых с двух промоторов противоположных нитей. Эти продукты, – RNA-II (праймер в ~80-360

нуклеотидов; принимает активную альфа-бета, и репликация-ингибирующую бета-гамма конформации) и RNA-I. Последний продукт (RNA-I), – частичный антисенс-праймер в 108 нуклеотидов; его концентрация и полиаденилирование, противоположно действующее на 3'-шпилечные структуры RNA-I и линейные формы новосинтезируемых мРНК, – критические параметры; через скорость репликации плазмид он регулирует их число. Интересно, что выбор альфа-бета или бета-гамма конформации RNA-II зависит от первичной-вторично-третичной структур участка в 21 нуклеотид, расположенного между позициями «-»359 и «-»380 (заметим, что снова размер одного из ключевых регуляторных участков соответствует минимальному НЭ). При репликации лидирующей нити ДНК праймерные RNA-II/пре-RNA-II своей G-богатой петлей стабильно гибридизуются с C-богатым участком ДНК-матрицы. Оба обогащенных участка консервативны у видов, а минимально эффективным РНК-праймером может служить 3'-конец RNA-II.

Инициация репликации зависит, прежде всего, от того, будет ли длина оставшегося свободным праймерного участка RNA-II (после образования в.н стабильного RNA-II/RNA-I-гибрида) составлять несколько более 80 нуклеотидов. В целом, исход взаимодействия, определяющего инициацию репликации, зависит от: длины, нуклеотидного паттерна и первичной-вторичной-третичной структур отдельных участков в составе RNA-I и RNA-II; степени полиаденилирования и скорости деградации нуклеазами RNA-I/RNA-II и других участников процесса инициации репликации (мРНК белков, ферментов); наличия/положения концевых шпилечных структур; близости РНК/ДНК-дуплексного гибрида к сайту инициации репликации; других факторов. При гибридизации также создается нетранскрибируемая область онДНК, выполняющая роль матрицы для синтеза ДНК с отстающей нити (в отстутствии ДНК-полимеразы-I).

Таким образом, НЭ, воспроизводимый вПОТ-механизмом, потенциально имеет возможность регуляторно (т.е. комплементарно взаимодействуя с различными участками: ДНК, – включая промоторную область, ориджны, другие; РНК, – включая сенс/антисенс-праймеры, мРНК, другие) или своей первичной последовательностью (оставляя, при этом, «рибонуклеотидный след» в ДНК) вносить изменения в соотношение процессов транскрипции, праймер-опосредуемой репликации бактерий (*E.coli*), сенс/антисенс-праймер-зависимой репликации бактериальной плазмиды ColE1 (и, возможно по аналогии с последней, в репликацию мтДНК; то же, во многом, касается и хромсомной ДНК эукариот). Кроме того, и по аналогии с транскрипционными факторами и короткими РНК, каждый отдельный минимальный или амплифицированный вариант НЭ (или их сочетание), могут обеспечивать необходимые активацию/переключение специфических активностей (ферментов, белков), требующихся в конкретных метаболических (генетических/эпигенетических) процессах.

Примирование репликации фагов

В случае, например, репликации фага G4, примирование выполняет РНК-полимераза DnaG, – продукт гена *dnaG E.coli*. Этот белок

(М.М. 60 кД; длина 582 аминокислоты) – праймаза, основная функция которой в *E.coli*, и при связывании с геликазой DnaB, состоит в инициации синтеза фрагментов Оказаки. Геликаза DnaB, используя энергию гидролиза нуклеозидтрифосфатов, открывает репликационную вилку после выхода из комплекса с DnaA- и DnaC-репрессорными белками; у эукариот геликаза – Т-антиген. Праймаза DnaG способна ограниченно использовать и ДНК-нуклеотиды (с образованием смешанного РНК/ДНК-праймаера).

Синтезирующийся стандартный РНК-праймаер (в 20-30 нуклеотидов) связывается с ДНК за 6 оснований до ДНК-шпильки, разрушает ее, и образует репликационно-затравочный РНК/ДНК-гибрид. На одном из этапов репликации фага происходит замена нуклеотидов праймера (РНК на ДНК) полимеразой, выполняющей в норме и репарационные функции. Если образовавшийся РНК-праймаер имеет длину менее 6 нуклеотидов, то синтеза РНК и ДНК идут практически одновременно [12].

Праймаза DnaG почти не гомологична известным РНК-полимеразам, но содержит 6 участков гомологии с праймазами других бактерий, ДНК-топоизомеразами (регулирующими степень скрученности витков ДНК) и некоторыми фагами. В случае *E.Coli*, DnaG иницирует синтез РНК-затравок преимущественно по 3'-GTC-сайту (в 60% случаев); в геноме бактерии имеются ~200 тысяч таких сайтов через каждые ~23 нуклеотида. В случае фагов T7 и T4 такими сайтами оказываются, соответственно, 3'-T(C/T)G и 3'-GTC. Специфичность действия праймаз может быть связана также с разной вторичной структурой петли в 17 нуклеотидов в мотиве цинкового пальца. Для эукариотических праймаз специфические последовательности не требуются, синтез праймера начинается напротив пиримидина, и на 5'-конце затравки оказывается пурин. В отсутствие ДНК-полимеразной активности, эта праймаза способна элонгировать единичные РНК-праймаеры. Бактериальные и эукариотические праймазы являются неточными полимеразами (~1 ошибка на 30 нуклеотидов вновь синтезированной РНК); эта неточность на ~3-4 порядка больше, чем в случае обратных транскриптаз, и на ~7-8 порядков, – в случае стандартных ДНК/РНК-полимераз. Они не схожи ни по первичной, ни по третичной структуре. Праймазы бывают отдельным ферментом (как у бактерий), а также составной частью, субъединицами, ДНК-полимераз (как у ДНК-полимеразы- α животных) [13].

Отступление 15: примирование ДНК фагов бактериальной праймазой DnaG ведет к образованию РНК-праймаера (изредка встраиваются и ДНК-нуклеотиды) в 20-30 нуклеотидов, – длиной, характерной для минимального НЭ [(15-30)_n, где n=1]. Этот праймер связывается с ДНК перед ДНК-шпилькой (за 6 оснований), и, разрушая ее, образует репликационно-затравочный РНК/ДНК-гибрид. Длина РНК-праймаера, большая/меньшая 6

нуклеотидов, определяет, соответственно, раздельность/сдвоенность синтезов РНК и ДНК (транскрипции/репликации) фага. Бактериально-фаговые праймазы функционируют по многочисленным специфическим сайтам {например, 3'-T(C/T)G, 3'-GTC; важна также и вторичная структура} – у бактерии их десятки/сотни тысяч, – повторяющимся через каждые ≈23 нуклеотида. Это также соответствует длине, характерной для минимального НЭ, который ранее [8,5,3,6] квалифицировался в качестве новой минимальной генетической единицы (характерной для нескольких разных структур), заменившей таковую для гена. Последний оказался сложной структурой, состоящей из отдельных частей: промоторов, энхансеров, др., – а также 5'- и 3'-частей, имеющих индивидуальную эволюционную историю, т.е. ген, как и ранее атом, «расщепился».

При отсутствии ДНК-полимеразной активности, эта праймаза способна элонгировать единичные РНК-праймеры {с образованием РНК, длина которой соответствует таковой для гипотетического (15-30)_n-амплифицированного НЭ}. Специфичность эукариотических праймаз проще: требуется только пиримидин, – и на 5'-конце заправки оказывается пурин. А то, что бактериальная праймаза DnaG способна ограниченно использовать и ДНК-нуклеотиды, ведет к образованию смешаного РНК/ДНК-праймера репликации, – возможно, еще более чувствительного к взаимодействию с НЭ. Наконец, неточность действия и бактериальных и эукариотических праймаз, не схожих своими первичной и третичной структурами, оказалась связанной с ~1 ошибкой на 30 нуклеотидов вновь синтезированной РНК, – т.е. с длиной, также характерной для минимального НЭ. Эта высокая неточность праймазы (на ~3-4 порядка больше, чем в случае обратных транскриптаз, и на ~7-8 порядков, – в случае стандартных ДНК/РНК-полимераз) может быть связана как с собственно функционированием фермента, так и с вмешательством в работу праймера дополнительных структур и механизмов (например НЭ при вПОТ).

Таким образом, в бактериально-фаговых системах НЭ, воспроизведенный гипотетическим вПОТ-механизмом (у прокариот он в деталях еще не описан), в принципе, может конкурировать/комплементарно-взаимодействовать (отчасти/полностью) как с РНК-праймером (или праймером смешаного РНК/ДНК-типа), так и с ДНК-сайтом его посадки (образования РНК/ДНК-гибрида) перед ДНК-шпилькой. Сохранившаяся после такого взаимодействия свободная часть РНК праймера может участвовать в оптимизации баланса между синтезами РНК и ДНК (транскрипцией, и транскрипционно-зависимой репликацией). Не ясно, случайным ли является соответствие длины бактериального РНК-праймера (20-30 нуклеотидов), частоты повторяемости специфических сайтов посадки РНК-праймера в бактериальном геноме (через каждые ≈23 нуклеотида), и частоты повторяемости ошибки синтеза РНК-праймазой (~1 ошибка на каждые 30 нуклеотидов), – с собственно длиной минимального НЭ (в 15-30 нуклеотидов). Версия того, что минимальный НЭ (а не сложно организованный ген) может являться, по крайней мере, на данный момент, минимальной новой генетической единицей, остается пока в силе.

Малые РНК бактерий

Бактерии быстро реагируют на постоянно изменяющиеся условия, и это может требовать многочисленных ncRNAs (включая малые; реактивных генетических переключателей), что важно, – еще до включения белками своих функций [38]. Это показано независимыми исследованиями, когда идентифицировали **огромное** количество ncRNAs, регулирующих стабильность [44] и ингибирование/активирование трансляции специфических мРНК различных бактерий/цианобактерий [38], предки которых, считается, могли быть предшественниками органелл (митохондрий, хлоропластов). В частности, ncRNAs участвуют в процессах: поддержания клеточного метаболизма, – оптимального уровня железа, сахаров; выживания бактериальной культуры в условиях стресса; регуляции факторов вирулентности у патогенных бактерий; др. Возможно дело в том, что, известно, некоторые участки мРНК (т.н. “metabolite-binding riboswitches”) и соответствующие им ncRNAs (т.н. *cis-/trans-regulatory RNAs*) являются молекулярными рибопереключателями, регулируемыми, соответственно, метаболизм (за счет специфического концентрация-зависимого связывания участков мРНК с определенным множеством низкомолекулярных метаболитов), и экспрессию близлежащих/отдаленных генов (среди ncRNAs имеются и asRNAs).

В бактерии *E.coli* (линии K-12) ncRNAs в ~30-65 нуклеотидов (точнее, в основном в группах по 30-50/50-65 нуклеотидов, а также, реже, большего и меньшего размеров) обнаруживают в sDNA-клонах фрагментов РНК, длина и частота встречаемости которых не всегда коррелирует с длиной и уровнем синтеза соответствующих транскриптов. У 20% таких фрагментов длина 3'-поли-А-концов составляла 1-5 остатков, – что облегчало их 3'-5'-деградацию экзорибонуклеазами PNPase (ПНФ, полинуклеотид-фосфорилаза) и RNAase-II [38].

В данном подходе использовался метод клонирования 21-22 нуклеотидных микро-РНК дрожофиллы (*D.melanogaster*) в эмбриональных лизатах клеток HeLa. Одновременно поиск/анализ фрагментов осуществлялся на основе зарегистрированных компьютерных баз данных. Эти фрагменты принадлежали: рРНК (наиболее избыточный класс РНК), тРНК, 5'/3'-нетранслируемым областям мРНК (79 клонов с малыми РНК), открытым рамкам считывания мРНК (потенциально, – 3-4 тысячам ОРС, некоторые из которых кодируются на противоположных нитях и перекрываются) [38].

Кроме того, некоторые фрагменты принадлежали, во-первых, генам asRNAs – коротким РНК, кодируемым 5'/3'-частями противоположных нитей белок-кодирующих генов и обеспечивающих

подавление/паузирование/активацию трансляции и защиту/деградацию спариваемым с ними мишеневым мРНК-транскриптам (при участии РНК-шаперона Hfq). Во-вторых, фрагменты обнаруживали в межгенных Ig-(intergenic)-областях, в частности: в дополнительно повторяющихся палиндромных (REP)-последовательностях в 37 п.о., расположенных между glnA/glnL-генами; в hok/sok-повторяющихся последовательностях токсинной (ldr/hok-пептиды) и антитоксинной (rdl/sok-asRNAs; регулируют синтез токсинов на пост-трансляционном уровне) областей, имеющих, также, у плазмид (например, R1), – для поддержания их встроенности в геном клетки-хозяина.

Предполагают, что, как и в случае РНК-праймеров, обеспечивающих инициацию репликации мтДНК, большинство фрагментов являлись интермедиатами не полных транскрипции, процессинга и деградации РНК бактерии [38]. Заметим, что ранее РНК таких малых размеров, обладающая, к тому же, специфически-модифицированной первичной/вторичной (с концевыми петле/стеблевыми) структурами, не была полностью доступной для определения/анализа их существующими методами с использованием олигонуклеотидных зондов (Northern blot, в комплексе с RT-PCR; и при поиске в такой РНК мутаций, – из-за устойчивости к сдвигу рамки и нонсенс-мутациям) и биохимическими методами. Поиск коротких РНК не проводился и в отношении некодирующих областей известных генов и нетранслируемых регионов, содержащих малые РНК (ncRNAs, в частности, межгенных областей), которые, несмотря на растущее признание важной их роли в физиологии бактерий, – а сегодня у всех биологических видов (архебактерий, эубактерий, эукариот), – все еще остаются трудными для получения в эксперименте, и предсказания их традиционным сиквенс-анализом [38]. В большинстве случаев, они оказываются открытыми случайно или предсказаны компьютерными алгоритмами сигналов транскрипции и особенностей генов известных малых РНК [20].

Наиболее избыточными среди тотальной РНК бактерии были фрагменты: лидерных/переносящих/спейсерных областей пре-рРНК экспоненциальной, и зрелых рРНК ранней стационарной фазы роста клеток (30.1%); некоторых видов asRNAs (обычно в trans-конфигурации), кодируемых повторяющимися последовательностями длинного прямого повтора (LDR; A–D типов) и нитями, противоположными тем, что экспрессируют их гены-мишени токсинов – Rdl-RNAs (19.0%; A–D типов) и Sok-RNAs (14.1%; SokB-RNAs была наиболее избыточной в стационарной, а SokC/SokE/SokX-RNAs – в экспоненциальной фазах роста); тРНК (8.7%) обеих фаз роста; а также суммарные фрагменты из UTRs-(8.0%)- и ORFs-(7.2%)-областей генома, нескольких LDR-РНК и РНК неизвестного происхождения (9.5%) [38]. Про последний тип РНК, частично гомологичных разным

участкам генома бактерии, думают, в частности, что они могли быть побочным результатом вторичного лигирования фрагментов РНК. Некоторые cDNAs-клоны соответствовали двунитевым петле-стеблевым структурам, чувствительным к RNase-III.

Низкий процент фрагментов таких ncRNAs, и в малом числе cDNA-клонов, составляли РНК межгенных областей (всего 0.3%), *cis*-asRNAs (1.2%; *cis*-регуляция доминирует у большинства плазмид, фагов и транспозон-кодируемых asRNAs) и усеченные версии 5'-/3'-концевых и внутренних участков малых РНК известных видов (1.9%; это касалось, соответственно, следующих ncRNAs: SsrS/Spf; RybD/RyeA/RygD и RydB/SsrA/RyjB) [38]. Некоторые 5'-UTR-производные ncRNAs-клонов принадлежали L-/THI/RFN-box-элементам (рибопереключателем). Связываясь с низкомолекулярными субстратами, они функционируют, соответственно, в следующих режимах: L, *L-box*, – регулирует биосинтез, катаболизм и транспорт лизина; THI, – регулирует биосинтез тиамина (витамина B1; а также транспорт его и других метаболитов у растений/грибов; возможно и у архибактерий), и контролирует/модифицирует процессы – альтернативный сплайсинг вышележащих OPC (uORF), сплайсинг, альтернативный 3'-концевой процессинг, экспрессию ниже лежащих генов; RFN, – регулирует биосинтез и транспорт ФМН, флавиномононуклеотида (FMN). Особенности паттерна экспрессии 3'-UTR-производных ncRNAs указывали, что также важно, на возможность существования у них дополнительной функции, независимой от соответствующих мРНК [38].

Интересно, что между тандемно-повторяющимися LDRs областями *E.coli* (LDR-A/B/C, в ~500 п.н. каждая, и LDR-D областью в ~450 п.н.; находятся в завершающей части генома, против друг друга) и hok/sok-системой плазмиды R1 (подобная система, считается, присутствует и у *E.coli*) имеется некоторая функциональная общность в рамках токсин/антитоксिनного модуля, связанная с ниже перечисленными моментами [37].

Так, обе области:

1. кодируют малые пептиды, – токсины в 35 и 51 аминокислоту, соответственно, для LdrD- и HokA-локусов. Сверхэкспрессия LdrD вызывает изменение пуринового метаболизма, быструю клеточную смерть, и, как и присутствие белкового ингибитора хлорамфеникола, ведет к образованию конденсированного нуклеоида. В LDR-A/B/C-областях *E.coli*, программой GENEMARK были предсказаны гомологи LdrD, имеющие сходные функции. Однако механизмы конденсации под действием LdrD и хлорамфеникола, включая плотность, форму и время образования сферического нуклеоида, были разные;

период полужизни мРНК *ldrD* составлял 30 минут, а ее *asRNA* (*rldD*), – 2-3 минуты (длина *rldD* составляет ~60 нуклеотидов).

2. транскрибируют высоко стабильные мРНК и нестабильные *цис*-кодируемые и, часто, *транс*-активирующие регуляторные *asRNAs* (комплементарны лидерной области мРНК, ингибируют ее трансляцию);
3. формируют стабильные вторичные структуры мРНК (в 374 и 433 нуклеотида, соответственно, для *ldrD*- и *hok*-генов);
4. представлены на хромосоме *E.coli* в виде множества копий.

Однако, несмотря на функциональную общность, белково/нуклеиновой гомологии между LDRs и *hok/sok*-подобной системой бактерии, как и присутствия LDR-подобных последовательностей в плаزمидах, не обнаружено [37]. LDRs-последовательности, в отличие от *hok/sok*-подобной системы, не участвуют в подавлении синтеза белка, не используются для стабилизации плазмид, и не включаются в пост-сегрегационный киллинг (PSK) клетки, – но присутствуют также у *Salmonella* и других энтеробактерий. Также, у *E.coli* (K-12) существует большое число других повторяющихся последовательностей (BIME, REP, PU, IRU=ERIC, boxC, IAP, RSA, TERM, PAIR, TRIP, QUAD; а также Rhs, кодирующих большие OPC). Они локализованы между кодирующими областями и содержат относительно короткие, близко лежащие инвертированные повторы (палиндромы). Некоторые повторы, возможно, транскрибируются из окружающих генов и функционируют как транскрипционные терминаторы и сайты, связывающие регуляторные белки [37].

Заметим еще раз: бактериальные *asRNAs* (малоразмерные *ncRNAs*), комплементарные концевым и лидирующим областям мРНК-мишеней, делятся, соответственно, на *цис*-кодируемые (1) и *транс*-кодируемые (2) *asRNAs*, способные позитивно/негативно регулировать трансляцию мРНК токсин-кодирующих и других белков. 5-концы первых (*цис*-) полностью комплементарны 3-концам мРНК-мишеней, и находятся на одном локусе хромосомы. У численно преобладающих вторых (*транс*-), комплементарность не полная, и расположены они на отдаленных участках хромосом по отношению к нескольким экспрессирующимся мишеням. Последнее взаимодействие влияет на связывание 5'-части мРНК с рибосомой и нуклеазо-опосредованную деградацию мРНК/*asRNA*-дуплекса (такой тип регуляции схож с описанным для эукариотических коротких РНК). В мРНК у одних прокариот с *asRNA* связывается последовательность Шайно-Долгарно (ее АГ-ГАГГ-консенсусный гексамер), у других – функционально подобные АУ-богатые последовательности, локализованные, соответственно, на 8 или 15-30 нуклеотидов выше АУГ-старт-кодона. Инициация трансляции провоцируется белковыми IF2-GTP/IF1/IF3-факторами и фор-

мил-Мет-тРНК (у эукариот аналог последовательности Шайно-Долгарно, – последовательность Кбзака). Комплементарная последовательность в рРНК (16S) локализована в ее 3'-конце.

Известные *транс*-кодируемые asRNAs связываются с РНК-шапероном (гексамерным белком Hfq, формирующим кольцевые структуры и связывающимся с А/У-богатыми областями вблизи петле/стеблевых-структур РНК), – что увеличивало стабильность asRNAs и мРНК/asRNA-дуплексов {в ~30-50 раз, – под действием петлевых A₆-(AAN)₄-элементов мРНК [61]} и защищало дуплексы от деградации (аналогичной интерференции РНК, RNAi, у эукариот). Взаимодействуя с рибонуклеазой E, шаперон регулировал утилизацию молекул РНК бактерий. Однако, при сверхэкспрессии ncRNAs связывающая функция Hfq-РНК-шаперона ослабевала (в основном в отношении некоторых А/У-богатых одностеблевых областей мРНК-мишеней) до ~25% в случае одних, – и до ~70% в случае других ncRNAs [61].

Так, например, белок Hfq и каждая из трех малых ncRNAs (DsrA, RprA и ArcZ), и в зависимости от эффективности спаривания (в каждом случае оно было не полным) с саморепрессирующейся шпилькой 5'-лидерной области доступа мРНК к рибосоме, позитивно регулируют трансляцию белка groS (σ 38-фактора, субъединицы РНК-полимеразы, действующей в стационарной фазе и при стрессе *E.coli*) [61]. Эти ncRNAs имели следующие характеристики: длина их непротранскрипированных форм составляла 100-150, а «рабочего участка» (сайта связывания с лидерной областью), как и у эукариотических коротких РНК (и фагов [12]), – 20-30 нуклеотидов; длина, например, непротранскрипированной ArcZ составляла 121, а протранскрипированной – 56 нуклеотидов [61].

Интересно, что геном *E.coli* (линия K12) обладает не только asRNAs (подавляющих трансляцию родственных мРНК, взаимодействуя с мишеневыми петля/стебель-структурами), но и другими регуляторами его экспрессии, – например, локализованными в 5'3'-концах мРНК tac/fbi-элементами, где первый – активатор петле/стеблевых-структур; др. [52]. В целом, геном кодирует большое число генов, гомологичных плазмидным, – в том числе, опосредующих апоптоз; то же касается и грамм-положительных/отрицательных бактерий и археобактерий.

Среди таких регуляторов: запускающие токсин/антитоксин-зависимую клеточную смерть, корректирующие (ре)-/фолдинг и 3'-процессинг трансляционно активных плазмид-подобных мРНК [52].

Эти регуляторы обоюдоостро контролируют:

1. число/стабилизацию плазмид (R1, F; апоптогенных, других);
2. независимый от плазмид апоптоз; регуляторы кодируются бактериальными генами – гомологами hok- (host killing);

кодирует белок Hok, повреждающий клеточную мембрану) и sok-локусов плазмид (suppression of killing). Последний кодирует Sok-RNA, – нестабильную asRNA в 63 нуклеотида, комплементарную лидирующей области мРНК-hok, регулирует трансляцию hok/mok-генов и распадается в лишенных плазмид бактериях. Продукт mok-гена (опосредующий киллинг, “mediation of killing”, клетки) требуется для трансляции hok-гена, но трансляция mok-белка непрямо регулируется Sok-RNA (на уровне ОПС, почти полностью перекрывающейся с hok-геном); найден гомолог mok, перекрывающийся с каждым из ldr-локусов.

3. РНК/РНК-взаимодействие hok-подобных токсинов и нестабильных антитоксинов (asRNAs); токсины кодируются гомологами hokA/hokC/hokE-локусов, а также опосредующими киллинг mok-локусами плазмид;
4. длительное ингибирование гибридизации длинных транслируемых мРНК (5'-конца мРНК с рибосомой, и 3'-конца – с asRNAs);
5. преждевременную активацию трансляции и образование активного tac-стебля, соответственно, консервативными fbi- и tac-элементами генома бактерии.

При этом потенциально повреждающее действие этих регуляторов, в свою очередь, обычно не вело к хромосом-опосредованной стабилизации плазмид и гибели бактерии механизмом пост-сегрегационного киллинга (PSK), т.к. компенсировалось (совместно/раздельно) другими факторами. Одновременно, предполагают, что PSK-опосредующие гены могут персистировать/распространяться внутри транспозон/вирус-подобных структур и придавать эволюционные преимущества геному бактерии, обладающему, как и плазмиды R1, всеми необходимыми регуляторными элементами [52].

Среди компенсирующих факторов имеются:

1. кодируемые бактерией вставочные элементы, например IS150/IS186 (в некоторых линиях дикого типа, например *E.coli-C* и *ECOR24*, отсутствуют, соответственно, IS150 и IS186); они нейтрализуют действие hokA/hokC/hokE-локусов/их-гомологов плазмиды/бактерии, т.е. повреждают стабильные токсин-кодируемые мРНК (медленно процессирующие в стабильные же урезанные версии);
2. точечные мутации hokB-локуса;
3. генетическая пестройка hokD-локуса;
4. действие нестабильных asRNAs (период полужизни – 3-5 минут) в отношении 3'-конца стабильных мРНК токсина, кодируемого hokA/hokC-локусами.

Однако сигнал, индуцирующий активацию *hok*-подобных генов хромосом и *hok*-генов плазмид, остается **неопознанным**.

Все это находится в соответствии с известными ограничениями в разного рода модификациях хромосомной-ДНК/генов-бактерий: от замен нуклеотидов, гомологичной рекомбинации, вторжения чужеродной ДНК [52].

Интересным является и то, например, что между нейтрализующими вставочными элементами, внедряющимися поблизости к регулируемым ими *hok*-локусам и самими локусами, расположены промежуточные последовательности с характерной длиной в 32 пары нуклеотидов (для пары IS150-элемент и *hokA*-гомологичный-локус), и в 21-22 пары нуклеотидов (для пары IS186-элемент и *hokC/hokE*-локусы). Кроме того, из *hokA*-локуса, одинаково позиционированного в геномах разных линий *E. coli*, делетировало 39 пар нуклеотидов, – вместе с «-»10-нуклеотидами промотора *asRNA* и старт-кодоном *hokA*. В этой области, у различных линий *E. coli*, замечено много единичных замен пар нуклеотидов. Длина некоторых *asRNAs*, например *SokAC*, *SokBK12* и *SokCECOR24*, составляла, соответственно, 52, 53 и 55 нуклеотидов [52]. Однонитевые 3'-концы *asRNAs* комплементарно взаимодействовали с петлями потенциально мишеневых петле/стеблевых-структур в родственных мРНК. Вторичные структуры *asRNAs* бактерий и плазмид (как в случае *SokRNA E. coli* и R1) подобны: имеются однонитевые 5'-лидерные последовательности в 10-12 нуклеотидов и богатая энергией петле/стеблевая-структура, сохраняющая 5'-однонитевую конформацию РНК. Присутствие ингибитора синтеза белка (рифампицин, 300 мг/мл) вело к истощению asRNAs и накоплению урезанных (на 32 нуклеотида по 3'-концу) и транслируемых форм мРНК [52].

Отступление 16: экспрессия конкретных генов бактерий зависит от множества близлежащих/отдаленных и по разному активируемых в быстро меняющихся условиях окружающей среды ncRNAs (в основном, длиной в ~30-65 нуклеотидов; включая *asRNAs*). Они кодируются: различными участками генов рРНК, тРНК, мРНК (5'/3'-областями, ОПС; в случае *asRNAs* – нитями, противоположными тем, что кодируют белки); межгенными областями, в частности, палиндромными REP-последовательностями (в 37 п.о.), и hok/sok-повторяющимися последовательностями токсинной и антитоксинной (регулируют синтез токсинов на посттрансляционном уровне) областей бактерий и плазмид. Длина непроцессированных форм ncRNAs (например, *DsrA*, *RprA*, *ArgZ*), составляла 100-150, а «рабочего участка» (сайта связывания с лидерной областью мРНК), как и у эукариотических коротких РНК (и фагов [12]), – 20-30 или несколько более нуклеотидов (что соответствует опосредованной вПОТ-механизмом длине минимального или амплифицированного варианта НЭ эпитопа).

Фрагменты РНК, по аналогии с методом клонирования 21-22 нуклеотидных микро-РНК дрозофиллы *D.melanogaster* (заметим, что регуляция эукариотическими короткими РНК, и в связи с НЭ, уже описана [1]) в эмбриональных лизатах клеток HeLa, исследовали в полученных cDNA-клонах (некоторые из них соответствовали двунитевым петле-стеблевым структурам), – производных различной длины транскриптов, а также – с учетом зарегистрированных компьютерных баз данных. Предполагают, что, как и в случае РНК-праймеров, обеспечивающих инициацию репликации мтДНК, большинство фрагментов являлись интермедиатами не полных транскрипции, процессинга и деградации РНК бактерии. Ранее РНК малых размеров, обладающая специфически-модифицированной первичной/вторичной (и с концевыми петле/стеблевыми) структурами, не была полностью доступной для определения их Northern blot в комплексе с RT-РСА (включая поиск мутаций) и биохимическими методами; поиск не проводился и в некодирующих областях известных генов, и в нетранслируемых областях с малыми РНК. Фрагменты открывались случайно, – или предсказывались компьютерными алгоритмами.

Часть из них (20%) содержала по 1-5 аденинов в 3'-поли-А-окончании и деградировалась по 3'-5'-концам (экзонуклеазами РNPase, ПНФ; RNAase-II). Кроме того, ncRNAs выступали в роли:

1. реактивных генетических переключателей, – в частности, стабильности и ингибирования/паузирования/активирования трансляции и защиты/деградации мРНК (при участии РНК-шаперона – белка Hfq, регулирующего утилизацию молекул РНК бактерий);
2. различных процессов поддержания клеточного метаболизма (уровня железа, сахаров, др.; в режиме молекулярных рибопереключателей при специфическом концентрация-зависимом связывании участков мРНК с некоторым множеством низкомолекулярных метаболитов).

Известные trans-asRNAs, связываясь с РНК-шапероном, т.е. гексамерным белком Hfq {его кольцевые структуры тропны к А/У-областям вблизи стебель/петлевых структур РНК, в частности $A_6/(AAN)_4$ -элементам мРНК}, увеличивали как свою стабильность, так и мРНК/asRNA-дуплексов в ~30-50 раз. В дуплексах одонитевые 5-концы asRNAs комплементарно взаимодействовали с петлями потенциально мишеневых петля/стебель-структур родственных мРНК. Сверхэкспрессия ncRNAs снижала тропность Hfq к одонитевым (в основном А/У-богатым) областям мРНК-мишеней до ~25% (от исходного уровня) в случае одних, – и до ~70% в случае других ncRNAs.

Наиболее избыточными (по cDNA-клонам ncRNAs) были фрагменты:

1. лидерных/переносящих/спейсерных областей пре-рРНК и зрелых рРНК (30.1%);
2. некоторых видов asRNAs (чаще, транс-конфигурации), кодируемых различного типа повторяющимися последовательностями длинного прямого повтора (LDR), и нитями, противоположными тем, что экспрессировали гены-мишени токсинов, – Rdl-RNAs (19.0%) и Sok-RNAs (14.1%);
3. тРНК (8.7%);
4. UTRs-(8.0 %)-областей генов;

5. ORFs-(7.2%)-областей генома;
6. нескольких LDRs-РНК и РНК неизвестного происхождения (9.5%; последние могли быть побочным результатом вторичного лигирования фрагментов РНК).

Низкий процент фрагментов РНК (по cDNA-клонам ncRNAs) составляли:

1. РНК межгенных областей (всего 0.3%);
2. cis-asRNAs (1.2%). 5'-концы этих РНК были полностью комплементарны 3'-концам мРНК-мишеней, расположенных в том же локусе хромосомы. Заметим, что у численно преобладающих trans-asRNAs комплементарность была не полной, и расположение их, по отношению к нескольким экспрессирующимся мишеням, было отдаленным. Это, как и в случае эукариотических коротких РНК, влияло на связывание 5'-части мРНК с рибосомой (и нуклеазо-опосредованную деградацию мРНК/asRNA-дуплекса). Лидирующие 5'-части мРНК бактерии, – последовательность Шайно-Долгарно (ее АГГАГГ-консенсусный гексамер) или АУ-богатые последовательности, – были локализованы у различных прокариот, соответственно, на 8 или 15-30 нуклеотидов выше АУГ-старт-кодона (у эукариот это последовательность о́зика). В рРНК (16S) комплементарная к мРНК последовательность локализована в ее 3'-конце;
3. усеченные версии 5'-концевых-/внутренних-/3'-концевых участков некоторых ncRNAs известных видов (1.9%), межгенных cis-asRNAs, trans-asRNAs, др.

Некоторые 5'-UTR-производные ncRNAs принадлежали к L-THI-/RFN-box-элементам, – рибопереключателям метаболизма, соответственно: лизина; тиамин, а также альтернативного сплайсинга вышележащих OPC (uORF), сплайсинга, альтернативного 3'-концевого процессинга, экспрессии ниже лежащих генов; флавиномононуклеотида (FMN). А особенности паттерна экспрессии 3'-UTR-производных ncRNAs позволяют считать, что у них существует дополнительная, независимая от соответствующих мРНК, функция.

Тандемно-повторяющиеся LDRs-области *E.coli* и *hok/sok*-система плазмиды R1 (подобная есть и у *E.coli*) имеют некоторую функциональную общность в рамках токсин/антитоксинового модуля, т.к. они:

1. кодируют малые пептиды, – токсины в 35 и 51 аминокислоту, соответственно, для LdrD- и HokA-локусов. Сверхэкспрессия LdrD вызывала множество изменений (пуринового метаболизма, быструю клеточную смерть, образование конденсированного нуклеоида). В LDR-A/B/C-областях *E.coli* были предсказаны гомологи LdrD, имеющие сходные функции. Период полужизни мРНК *ldrD* составлял 30 минут, а ее asRNA (*rdlD*) – 2-3 минуты (длина *rdlD* составляет ~60 нуклеотидов).
2. транскрибируют высоко стабильные мРНК и нестабильные цис-кодируемые и, часто, транс-активирующие регуляторные asRNAs, комплементарные саморепрессирующейся шпильке 5-лидерной области доступа к мРНК (регулируют трансляцию, например, белка

groS, – σ^{38} -фактора, субъединицы РНК-полимеразы, действующей в стационарной фазе и при стрессе *E.coli*);

3. формируют стабильные вторичные структуры мРНК;
4. представлены в виде множества локусов.

Однако, несмотря на функциональную общность, гомологии между LDRs-локусами и *hok/sok*-подобной системой *E.coli*, как и присутствия LDR-подобных последовательностей в плазмидах, не обнаружено. Кроме того, LDRs, в отличие от *hok/sok*-подобной системы, не участвуют в подавлении синтеза белка, не используются для стабилизации плазмид, и не включаются в пост-сегрегационный киллинг (PSK) клетки. LDRs присутствуют также у *Salmonella* и других энтеробактерий.

У *E.coli* (K-12, др.) имеются и иные межгенные повторяющиеся последовательности (BIME, REP, PU, IRU=ERIC, boxC, IAP, RSA, TERM, PAIR, TRIP, QUAD; а также Rhs, кодирующие большие OPC), содержащие относительно короткие, близко расположенные инвертированные повторы (палиндромы). Часть повторов, возможно, транскрибируется из окружающих генов и функционирует как транскрипционные терминаторы и сайты, связывающие регуляторные белки. (Можно предположить, что для сбалансированной регуляции деятельности в.н. LDRs-локусов, *hok/sok*-подобной системы и межгенных повторов требуются оптимизирующие направляющие сигналы, – в том числе в виде НЭ, опосредуемых вПОТ-механизмом).

Кроме asRNAs, геном бактерии (*E.coli*-K12, др.) обладает и другими регуляторами экспрессии, – например, 5'/3'-концевыми tac/fbi-элементами и tac-активатором пегле/стеблевых-структур мРНК. Геномы *E.coli*, грамм-положительных/отрицательных и архебактерий имеют не мало генов, гомологичных плазмидным. Среди в.н. регуляторов имеются: запускающие токсин/антитоксин-зависимую клеточную смерть, корректирующие (ре)-/фолдинг и 3'-процессинг трансляционно активных плазмид-подобных мРНК. Ими осуществляется контроль: числа/стабилизации плазмид (R1, F, др.); независимой от плазмид программируемой клеточной смерти (кодируются часто перекрывающимися генами *hok/sok*-системы); токсин/антитоксин-(РНК/РНК)-взаимодействия; длительного ингибирования гибридизации 5'-конца мРНК с рибосомой, и 3'-конца длинных мРНК – с asRNAs; преждевременной активации трансляции и образования tac-стебля, соответственно, консервативными fbi- и tac-элементами генома.

Потенциально повреждающее действие этих регуляторов, обычно, не ведет к стабилизации плазмид и гибели бактерии (механизмом пост-сегрегационного киллинга, PSK), т.к. компенсируется другими факторами. PSK-гены и необходимые регуляторные элементы распространяются внутри транспозон/вирус-подобных структур, обеспечивая бактериям и плазмидам некоторые эволюционные преимущества.

К компенсирующим факторам относятся:

1. нейтрализующие вставочные элементы (например, IS150/IS186; внедряются поблизости к регулируемым ими генам *hok*-локуса и повреждают стабильные токсин-кодируемые мРНК плазмиды/бактерии);
2. точечные мутации (*hokB*-локуса, др.);

3. генетическая перестройка (*hokD*-локуса, др.);
4. взаимодействие нестабильных *asRNAs* (период полужизни – 3-5 минут) с 3'-концом стабильных мРНК токсинов, кодируемых *hokA/hokC*-локусами.

Необходимо учесть, что введение модификаций (замена отдельных нуклеотидов, гомологичная рекомбинация, вторжение чужеродной ДНК) в хромосомную ДНК имеет ограниченный характер. И до сих пор сигнал, индуцирующий активацию *hok*-подобных генов хромосом и *hok*-генов плазмид, остается неопознанным.

Между нейтрализующими вставочными элементами и *hok*-локусами (различных линий *E. coli*) расположены промежуточные последовательности с характерной длиной в 32 пары нуклеотидов (для пары IS150/*hokA*), и в 21-22 пары нуклеотидов (для пары IS186/*hokC/hokE*). Кроме того, из *hokA*-локуса делетировало 39 пар нуклеотидов (включая «-»10-нуклеотиды промотора *asRNA* и старт-кодон *hokA*). В этой области замечено много замен единичных пар нуклеотидов. Длина многих *asRNAs* составляла несколько десятков (например, для *SokAC*, *SokBK12* и *SokCECOR24*, это, соответственно, 52, 53 и 55 нуклеотидов. Вторичные структуры *asRNAs* бактерий и плазмид (как в случае *Sok-RNA E. coli* и R1) были подобны: они имели одонитевые 5'-лидерные последовательности в 10-12 нуклеотидов и богатые энергией петле/стеблевые-структуры, сохраняющие 5'-одонитевую конформацию РНК. Присутствие ингибитора синтеза белка (рифампицина, 300 мг/мл) вело к истощению *asRNAs* и накоплению урезанных (на 32 нуклеотида по 3'-концу) транслируемых форм мРНК.

Таким образом, не исключено, что функционирование следующих структур, регуляторов и факторов, а именно:

1. экспрессируемых ncRNAs, – включая процессированные/непроцессированные их формы и нестабильные *cis-/trans-asRNAs*. Последние кодируются различными участками генов/генома прокариот и являются молекулярными рибопереключателами, контролирующими клеточный метаболизм, экспрессию генома, ингибирование/паузирование/активирование трансляции, защиту/деградацию стабильных мРНК и активность токсин-/антитоксиновой *hok/sok*-подобной системы;
2. других регуляторов экспрессии (например, 5'/3'-концевых *tac/fbi*-элементов и *tac*-активатора петле/стеблевых-структур мРНК);
3. компенсирующих факторов (нейтрализующих вставочных элементов, – например, IS150/IS186; точечных мутаций; генетической перестройки);
4. выше названных небольших промежуточных (32 п.н. и 21-22 п.н.) и делетирующих (39 п.н. + 10 п.н.) последовательностей;
5. регуляторных 5'-лидерных (10-12 п.н.) участков *asRNAs*;
6. 3'-UTR-производных ncRNAs;
7. накапливаемых урезанных (на 32 п.н.) транслируемых форм мРНК (длина всех перечисленных компонент сопоставима с таковой для $H\Omega_{n=1,2,3...}$),

– все это может контролироваться не только, как принято считать, соотношением уровней исходных взаимодействующих компонент (asRNAs, мРНК-мишеней, IS-элементов, Hfq-белка, др.), а также промежуточными продуктами незавершенных процессов транскрипции/процессинга, деградации (небольшими РНК), – но и различными РНК-затравками/праймерами. Тем более, что, повторим, до сих пор сигнал, индуцирующий активацию hok-подобных генов хромосом и hok-генов-токсина плазмид, остаётся не опознанным. Заметим, что список олигонуклеотид-связанных, потенциально сигнальных компонент, может быть значительно расширен.

Также заметим, что присутствие низкого процента фрагментов ncRNAs (сDNA-клонов из межгенных областей, cis-asRNAs, др.) не обязательно означает их слабую функциональную роль, а не быстрый оборот и высокую чувствительность к ним процессов (и с участием соответствующих мишеней). Наличие cis-/trans-, а также преобладание trans-конфигураций среди сDNA-клонов ncRNAs, возможно означает, соответственно, наличие и разветвленность сети одного/нескольких уровней регуляторов экспрессии генома. Возможно, один из этих уровней связан с дополнительной регуляцией (которую можно обозначить как «регуляцию регуляторов») ncRNAs и их мишеней с помощью НЭ.

Среди в.н. регулирующих (конкурентным комплементарным взаимодействием) и оставляющих «рибонуклеотидный след» (в хромосомальной ДНК про-/эукариот, мтДНК) РНК-затравок/праймеров, потенциально, могут быть и олигонуклеотиды, воспроизводимые гипотетическим вПОТ-механизмом в виде минимальных (~15-30 нуклеотидов) или амплифицированных $(15-30)_n$ вариантов НЭ белкового эпитопа. Амплифицированный вариант, по аналогии с РНК, возникшими в результате вторичного лигирования, может быть моно- или гетерогенным по НЭ.

Более того, само формирование комплементарных регуляторных взаимодействий между участками отдаленных/неотдаленных генов (как, например, между мРНК и рРНК/asRNAs/др.) и генома (формирование петле-стеблевых структур; гомологичных участков между генами; генами и повторяющимися последовательностями, часть которых, возможно, транскрибируется из окружающих генов и функционирует как транскрипционные терминаторы и сайты, связывающие регуляторные белки; др.) трудно себе представить, во-первых, без изначального формирования и последующего многоканального сетевого распространения НЭ (с подключением, конечно, полимеразной, обратнo-транскриптазной и других активностей) в различные области генома (требует отдельного рассмотрения). Во-вторых, сам факт и характер взаимодействия в.н. пар комплементарных структур, в свою очередь, может зависеть от конкурентного вмешательства в это взаимодействие НЭ, тропных к этим структурам.

В относительно разработанной модели вПОТ-механизма в митохондриях (пластидах) эукариот, этот механизм позволяет обеспечить обратную связь между цитоплазмой, митохондриями и ядром в рамках относительно более замкнутой, чем при отсутствии вПОТ-механизма,

целостной системы с внутренней и, что важно, внешней обратными связями; (роль цитоплазмы: отсюда поступают эпитопы фрагментируемых протеасомой отработавших, избыточных, поврежденных, чужеродных белков, превращаемых, далее, в НЭ/олигонуклеотид-подобные информационные структуры). Модель вПОТ-механизма для прокариот в данной статье не представлена. Предварительно, можно связать его с цитоплазматической мембраной, за пределами которой, вне клетки, ферменты, в частности протеазы [14], могут процессировать разные в.н. белки и поставлять их фрагменты/эпитопы, далее, для формирования НЭ, регулирующего различные ДНК/РНК-ассоциированные процессы.

Почти все работы автора (предварительные варианты) можно обнаружить на сайте: (<http://amdeich-var-reverse-translation.ru/>)

Ссылки:

1. - Дейчман А.М. О возможных новых механизмах образования коротких нуклеотидных последовательностей, участвующих в регуляции экспрессии генома // Российский Биотерапевтический Журнал (в печати). – 2011. – №4.
2. - Дейчман А.М. Один из вариантов точечных мутаций возможно запускается поэпитопной обратной трансляцией. Гипотетическая концепция // М.: Рукопись деп. в ВИНТИ. – 1993. – №1502-В93. – 56с.
3. - Дейчман А.М. Черный ящик генетического кода // Химия и Жизнь (науч.-популярн. жрнл). – 1994а. – №11. – С.28-33.
4. - Дейчман А.М. Генетический код: взаимодействие аминокислот белков (фрагментов, пептидов) в соответствии с различными правилами, принципами, кодами. Правило исключений // М.: Рукопись депон. в ВИНТИ. – 1996. – №2080-В96. – 53с.
5. - Дейчман А.М., Цой В.Ч., Барышников А.Ю. Редактирование РНК. Гипотетические механизмы (монограф.) // М.: Изд-во «Практическая Медицина» (www.medprint.ru). – 2005 (in Russian 265p. and in English 302p.).
6. - Дейчман А.М., Котина Е.В. Черный ящик генетического кода – 2 // Химия и Жизнь (науч.-попул жрнл). – 2006. – №3. – С.34-37.
7. - Дейчман А.М. Гипотетические корневые механизмы метаболизма генома формируют контуры новой парадигмы // Ст.-П.: Интеллектуальный Форум «Открытая Дверь» (ФГУП НИИ ПММ). Новые концепции естествознания. – 2007. – С. 260-267.
8. - Дейчман А.М. Черный ящик генетического кода – 3 // Электронный журнал «Русский переплет». – 2007 (27.03.2011) (<http://www.pereplet.ru/news/index.cgi?id=18977#18977>; <http://www.pereplet.ru/text/deichman.html>).

9. - Дейчман А.М.. О возможных новых истоках происхождения генетической информации (генов, геномов, вирусов; в частности – ВИЧ) // Энвайронментальная эпидемиология (электронный журнал). – 2011. – Т.5 – №1. – С.3-110 (<http://www.hiv-aids-epidemic.com.ua/2011-01%20enviro%20epi.pdf>).
10. - Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий // Электронный журнал «Русский переплет» (Биология). – 2000. – С.7 (<http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/>).
11. [35] - Мирабдуллаев И. М. Эндосимбиотическая теория – от фантастики к парадигме «Природа» // Природа. – 1991. – №12. – С.1-21.
12. - Льюин Б. Гены // М.: Мир (перевод с англ., ред. чл.-корр. АН СССР, Георгиев Г.П.). – 1987. – 544с.
13. - Спиринов А.С. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот // М.: Высшая Школа (ред. Спиринов А.С.; учебник для биологических ВУЗов). – 1990. – 352с.
14. - Тюрин Ю.А., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С.. Природная устойчивость бактерий к факторам врожденной иммунной системы, обусловленная бактериальными протеазами // Электронный журнал «ИД-Практика». Казань. – 2011 (<http://mfvt.ru/prirodnaya-ustojchivost-bakterij-k-faktoram-vrozhdennoj-immunnoj-sistemy-obuslovlennaya-bakterialnymi-proteazami/>).
15. - Филиппович И.И., Ноздрин В.Н., Светелукин В.В., Опарин А.П. Изучение локализации транскрипционной и трансляционной систем в тонких структурах хлоропластов при гранообразовании. Молекулярная генетика митохондрий // Л.: Наука (ред. Нейфак С.А., Трошин А.С.). – 1977. – С. 11–20.
16. - Фролов В.А., Пухляк В.П. Морфология митохондрий кардиомицита в норме и патологии // М.: изд-во Университета Дружбы Народов. – 1989. – 268с.
17. - Юрина Н.П., Одинова М.С. Сравнительная характеристика структурной организации геномов хлоропластов и митохондрий растений. // Генетика. – 1998. – Т.34. – №1. – С.5-22.
18. - Ankel-Simons F., Cummins J.M. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – V.93. – N24. – P.13859–13863.
19. - Aquadro C.F., Greenberg B.D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals // Genetics. – 1983. – V.103. – P.287-312.
20. - Argaman L., Hershberg R., Vogel J., Bejerano G., Wagner E.G., Margalit H., Altuvia S. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli // Curr. Biol. – 2001. – V.11. – N12. – P.941-950.
21. - Biswal N., Murray B.K., Benyesh-Melnick M. Ribonucleotides in newly synthesized DNA of herpes simplex virus // Virology. – 1974. – V.61. – P.87-99.
22. - Cann R.L., Brown W.M., Wilson A.C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA // Genetics. – 1984. – V.106. – N3. – P.479-99.

23. - Chattoraj D.K., Stahl F.W. Evidence of RNA in D loops of intracellular X DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. (Genetics). – 1980. – V.77. – N4. – P.2153-2157.
24. - Clayton D.A. Replication of animal mitochondrial DNA // Cell. – 1982. – V.28. – N4. – P.693-705.
25. - Dasgupta S., Masukata H., Tomizawa J. Multiple mechanisms for initiation of ColE1 DNA replication: DNA synthesis in the presence and absence of ribonuclease H // Cell. – 1987. – V.51, – P.1113-1122.
26. - Entelis N.S., Kolesnikova O.A., Dogan S., Martin R.P., Tarassov I.A. 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements // J. Biol. Chem. – 2001. – V.276. – N49. – P.45642-45653.
27. - Gensler S., Weber K., Schmitt W.E., Pérez-Martos A., Enriquez J.A., Montoya J., Wiesner R.J. Mechanism of mammalian mitochondrial DNA replication: import of mitochondrial transcription factor A into isolated mitochondria stimulates 7S DNA synthesis // Nucleic Acids Res. – 2001. – V.29. – N17. – P.3657–3663.
28. - Gray M.W. Origin and evolution of mitochondrial DNA // Annu. Rev. Cell. Biol. – 1989. – N5. – P.25-50.
29. - Grossman L.I., Watson R., Vinograd J. The presence of ribonucleotides in mature closed-circular mitochondrial DNA // Proc.Natl. Acad. Sci. USA. – 1973. – V.70. – P.3339-3343.
30. - Haber J.E. Transpositions and translocations induced by site-specific double-strand breaks in budding yeast // DNA Repair (Amst). – 2006. – V.5. – N(9-10). – P.998-1009.
31. - Haley j., Bogorad L. Alternative promoters are used for genes within maize chloroplast polycistronic transcription units // Plant Cell. – 1990. – N2. – P.323-333.
32. - Hancock K., Hajduk S.L. The Mitochondrial tRNAs of Trypanosoma brucei are nuclear encoded // J.Biol.Chem. – 1990. – V.265. – N31. – P.19208-19215.
33. - Hedtke B., Borner T., Weihe A. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis // Science. – 1997. – V.277. – P.809-811.
34. - Hess W.R., Borner T. Organellar RNA polymerases of higher plants // Int. Rev. Cytol. – 1999. – V.190. – P.1-59.
35. - Hines J.C., Ray D.S. A mitochondrial DNA primase is essential for cell growth and kinetoplast DNA replication in Trypanosoma brucei // Mol. Cell. Biol. – 2010. – V.30 – N6. – P.1319-1328.
36. - Hines J.C., Ray D.S. A second mitochondrial DNA primase is essential for cell growth and kinetoplast minicircle DNA replication in Trypanosoma brucei // Eukaryot. Cell. – 2011. – V.10. – N3. – P.445-454.
37. - Kawano M., Oshima T., Kasai H., Mori H. Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a *cis-encoded* small antisense RNA in *Escherichia coli* // Molecular Microbiology. – 2002. – V.45. – N2. – P.333-349.

38. - Kawano M., Reynolds A.A., Miranda-Rios J., Storz G. Detection of 5' and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – N33. – P.1040–1050.
39. - Kolodner R., Tewari K.K. Presence of displacement-смещения loops in the covalently closed circular chloroplast deoxyribonucleic acid from higher plants // *J. Biol. Chem.* – 1975. – V.250. – N22. – P.8840-8847.
40. - Landweber L.F, Gilbert W. RNA-editing as a source of genetic variation // *Nature.* – 1993. – V.363. – P.179-182.
41. - Lassen M.G., Kocchar S., Nielsen B.L. Identification of a soybean chloroplast DNA replication origin-binding protein // *Plant. Mol. Biol.* – 2011. – V.76. – N(3-5). – V.463-471.
42. - Ling F., Makishima F., Morishima N., Shibata T. A nuclear mutation defective in mitochondrial recombination in yeast // *EMBO J.* – 1995. – V.14. – N16. – P.4090-4101.
43. - Lung B., Zemann A., Madej M. J., Schuelke M., Techritz S., Ruf S., Bock R., Hüttenhofer A. Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V.34. – N14. – P.3842–3852.
44. - Mandin P., Gottesman S. A genetic approach for finding small RNAs regulators of genes of interest identifies RybC as regulating the DpiA/DpiB two component system // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V.72. – N3. – P.551-565.
45. - McElhinny N.S.A., Watts B.E., Kumar D., Watt D.L., Lundström E.B., Burgers P.M., Johansson E., Chabes A., Kunkel T.A. Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – V.107. – N11. – P.4949-4954.
46. - McElhinny N.S.A., Kumar D., Clark A.B., Watt D.L., Watts B.E., Lundström E.B., Johansson E., Chabes A., Kunkel T.A. Genome instability due to ribonucleotide incorporation into DNA // *Nat. Chem. Biol.* – 2010. – V.6. – N10. – P.774-781.
47. - Michikawa Yu., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarlato G., Attardi G. Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication // *Science.* – 1999. – V.286. – N5440. – P.774-779.
48. - Moore J.K., Haber J.E. Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks // *Nature.* – 1996. – V.383. – N6601. – P.644-6.
49. - Moritz A., Goebel W. Characterization of the 7S RNA and its gene from halobacteria // *Nucleic Acids Res.* – 1985. – V.13. – N19. – P.6969–6979.
50. - Nashimoto M. The RNA/Protein symmetry hypothesis: experimental support for reverse translation of primitive protein // *J.Theor.Biol.* – 2001. – V.209. – P.181-187.
51. [10] - Okada K., Yamazaki Yu., Yokobori S., Wada H. Repetitive sequences in the lamprey mitochondrial DNA control region and speciation of *Lethenteron* // *Gene.* – V.465. – №1-2. – 2010. – P. 45-52.
52. - Pedersen K., Gerdes K. Multiple hok genes on the chromosome of *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology.* – 1999. – N32. – P.1090-1102.

53. - Prado F., Cortés-Ledesma F., Huertas P., Aguilera A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* – 2003. – V.42. – N4. – P.185-198.
54. - Reichert A.S., Morl M. Repair of tRNAs in metazoan mitochondria // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – 28(10). – P. 2043–2048.
55. - Ricchetti M., Fairhead C., Dujon B. Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast chromosomes // *Nature.* – 1999. – V.402. – N6757. – P.96-100.
56. - Roark L.M., Hui A.Y., Donnelly L., Birchler J.A., Newton K.J. Recent and frequent insertions of chloroplast DNA into maize nuclear chromosomes // *Cytogenet. Genome Res.* – 2010. – V.129. – N(1-3). – P.17-23.
57. - Rumbaugh J.A., Murantet R.S., Shit S., Bambara R.A. Creation and Removal of Embedded Ribonucleotides in Chromosomal DNA during Mammalian Okazaki Fragment Processing // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V.272. – N36. – P.22591-22599.
58. - Rubio M.A., Pastar I., Gaston K.W., Ragone F.L., Janzen C.J., Cross G.A., Papavasiliou F.N., Alfonzo J.D. An adenosine-to-inosine tRNA-editing enzyme that can perform C-to-U deamination of DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – 104(19). – P.7821–6.
59. - Shutt T.E., Gray M.W. Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes // *J. Mol. Evol.* – 2006. – V.62. – N5. – P.588-599.
60. - Simpson L., Maslov D.A., Blum B. RNA editing in *Liechmania* mitochondria // London: Publ. Ellis Horwood Ltd. In RNA editing. The alteration of protein coding sequences of RNA (Ed. Benne R.). – 1993. – P.53-85.
61. - Soper T., Mandin P., Majdalani N., Gottesman S., Woodson S.A. Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – V.107. – N21. – P.9602–9607.
62. - Storici F., Bebenek K., Kunkel T.A., Gordenin D.A., Resnick M.A. RNA-templated DNA repair // *Nature.* – 2007. – V.447. – N7142. – P.338–341.
63. - Teng S.C., Kim B., Gabriel A. Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks // *Nature.* – 1996. – V.383. – N6601. – P.641-644.
64. - Thorsness P.E., Weber E.R. Escape and migration of nucleic acids between chloroplasts, mitochondria, and the nucleus // *Int. Rev. Cytol.* – 1996. – V.165. – P.207-234.
65. - Wanrooij S., Fusté J.M., Farge G., Shi Y., Gustafsson C.M., Falkenberg M. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – V.105. – N32. – P.11122-11127.
66. - Watt D.L., Johansson E., Burgers P.M., Kunkel T.A. Replication of ribonucleotide-containing DNA templates by yeast replicative polymerases // *DNA Repair (Amst).* – 2011 [Epub ahead of print].

67. - Wu M., Lou J.K., Chang D.Y., Chang C.H., Nie Z.Q. Structure and function of a chloroplast DNA replication origin of *Chlamydomonas reinhardtii* // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1986. – V.83. – N18. – P.6761–6765.
68. - Yang M.Y., Bowmaker M., Reyes A., Vergani L., Angeli P., Gringeri E., Jacobs H.T., Holt I.J. Biased Incorporation of Ribonucleotides on the Mitochondrial L-Strand Accounts for Apparent Strand-Asymmetric DNA Replication // Cell. – 2002. – Vol.111. – P.495-505.
69. - Yu X., Gabriel A. Patching broken chromosomes with extranuclear cellular DNA // Mol Cell. – 1999. – V.4. – N5. – P.873-881.
70. - Zheng L, Shen B. Okazaki fragment maturation: nucleases take centre stage // J. Mol. Cell. Biol. – 2011. – V.3. – N1. – P.23-30.