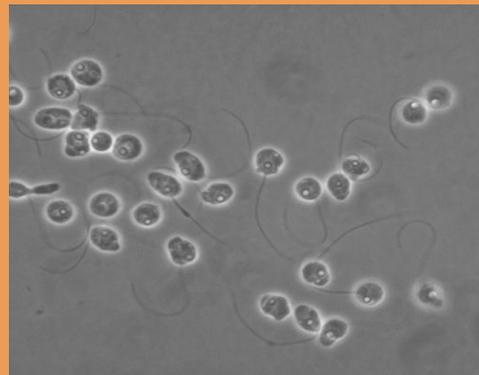


# ЛЕКЦИЯ 4

## СТРУКТУРА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ГРИБОВ И ЖИВОТНЫХ

1. Митохондриальные ДНК грибов – организация и физико-химические параметры
2. Генетическая карта мтДНК дрожжей
3. Интроны митохондриальных генов дрожжей
4. Организация митохондриального генома других грибов
5. Генетическая карта мтДНК нейроспоры
6. Митохондриальные плазмиды нейроспоры и их связь со старением штаммов
7. Организация митохондриального генома животных



# Каждая клетка грибов содержит множество митохондрий

Митохондрия дрожжей, прижизненная окраска флуоресцентным красителем

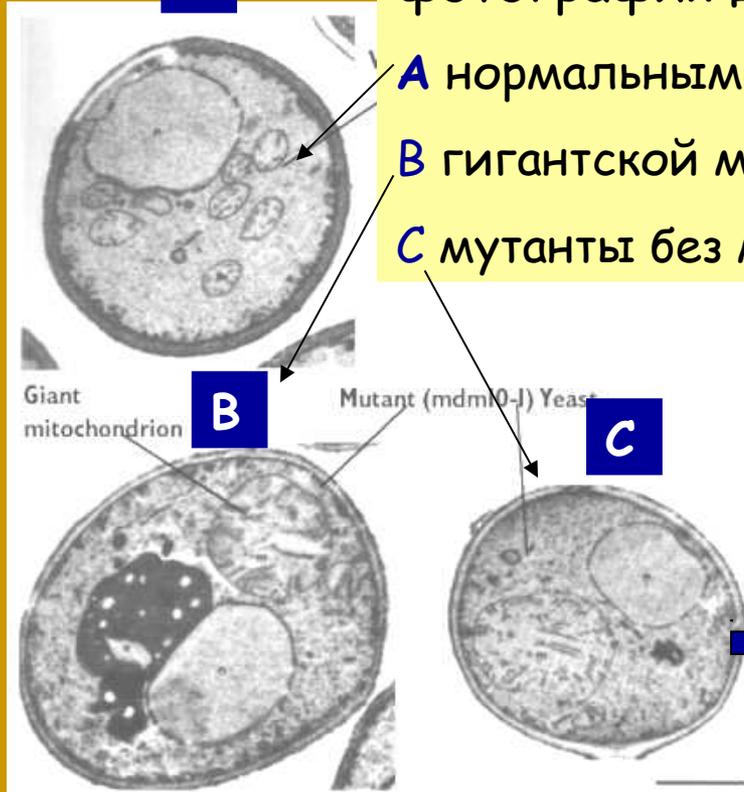
Электронно-микроскопическая фотография дрожжевых клеток с:

**A**

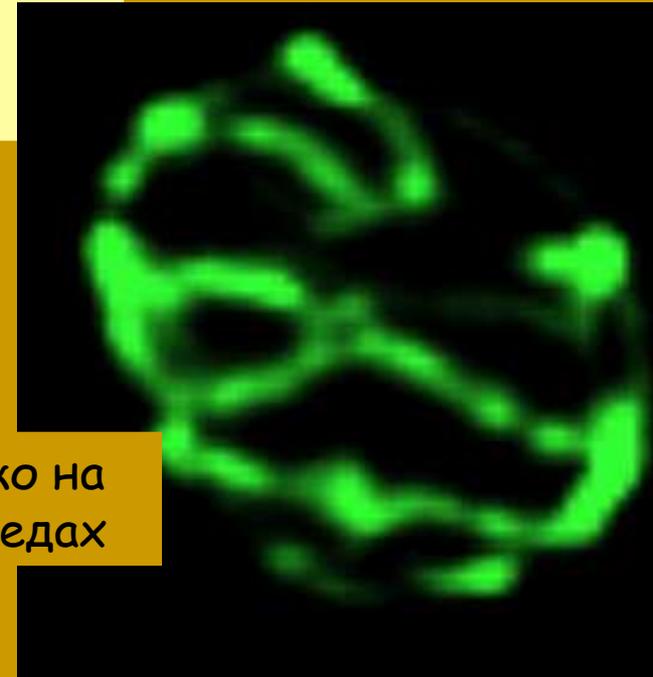
**A** нормальными митохондриями

**B** гигантской митохондрией

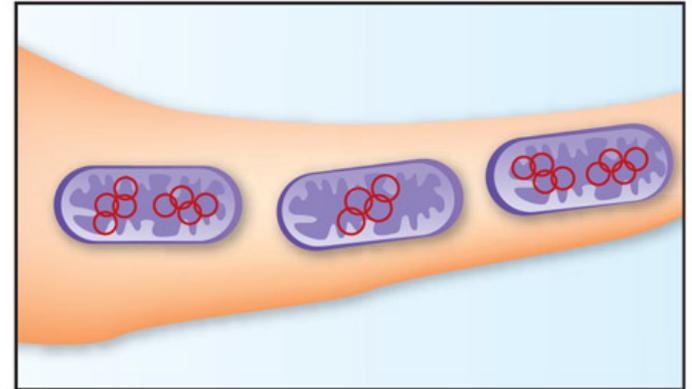
**C** мутанты без митохондрий



Выживают только на специальных средах

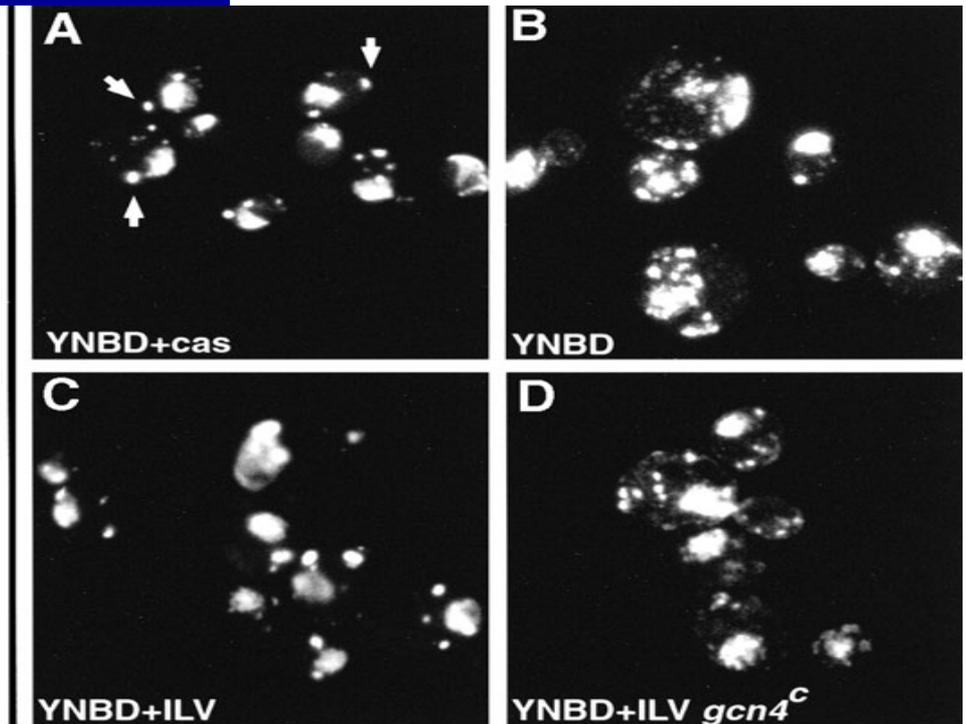


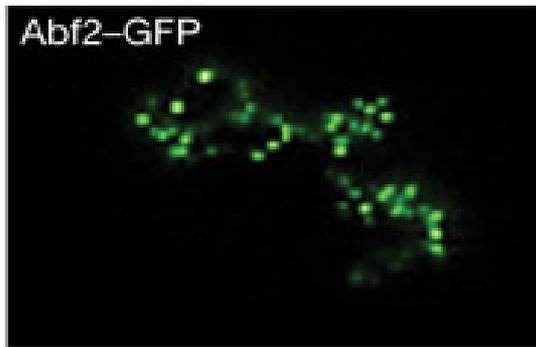
Митохондриальная ДНК,  
подобно хлоропластной,  
организована в  
нуклеоиды



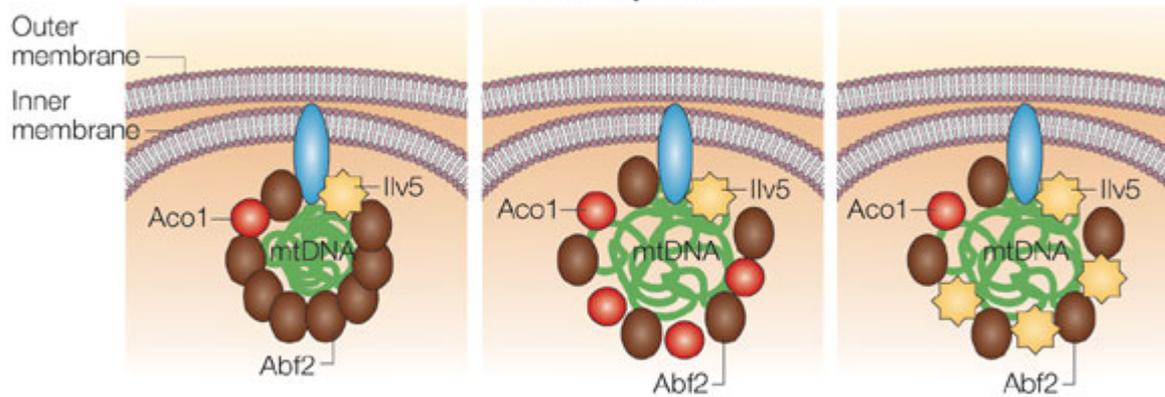
Размеры нуклеоидов  
дрожжей обычно 20-50 нм

Каждый нуклеоид содержит  
3-5 молекул мтДНК



**b**

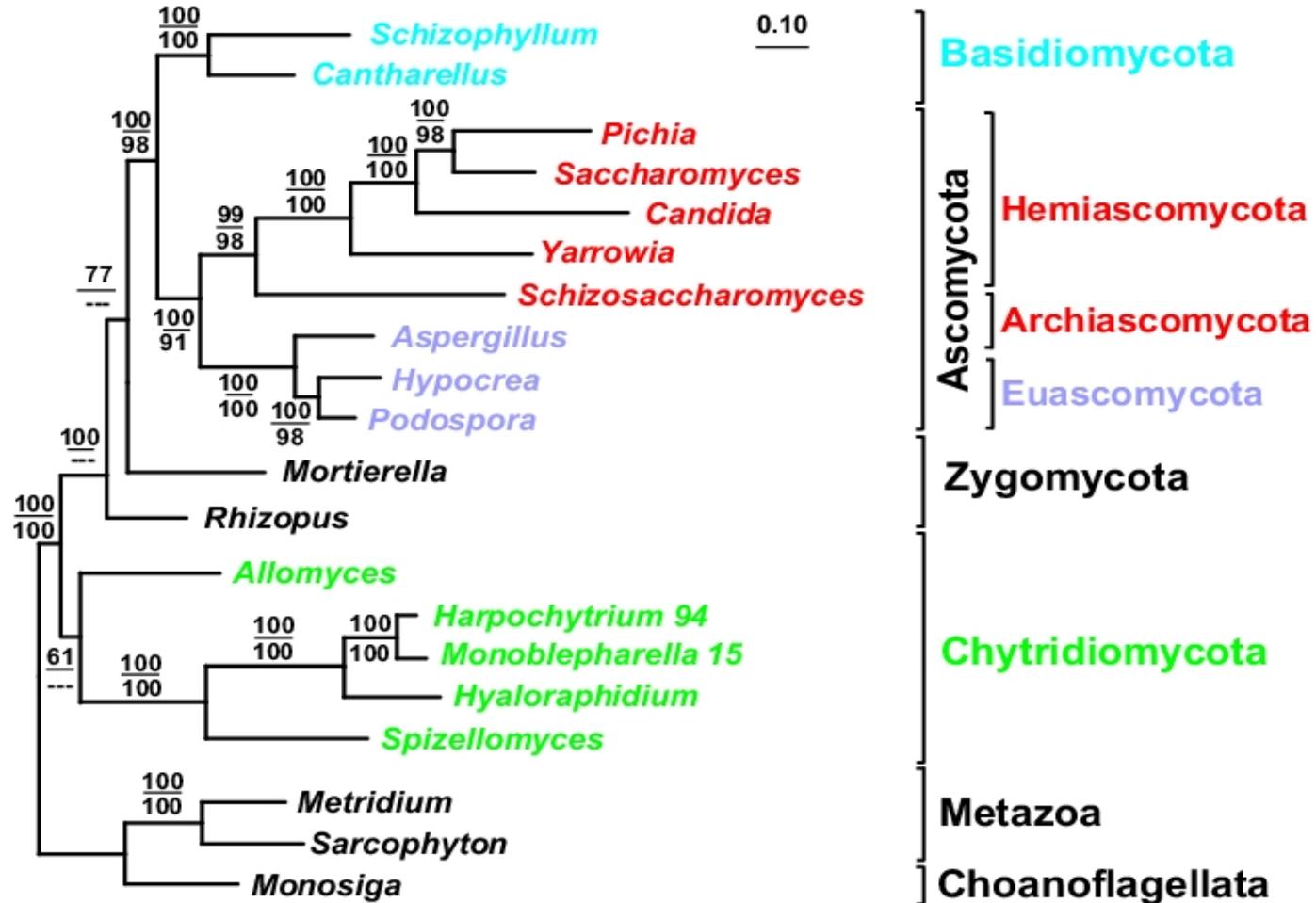
Слева - почкующаяся дрожжевая зигота, справа в тех же клетках - митохондриальные нуклеоиды



Митохондриальные нуклеоиды, подобно хлоропластным, связаны с внутренней мембраной митохондрии

В нуклеоидах молекулы ДНК связаны с гистоноподобными белками

# Грибы – обширная и разнообразная группа, включающая более 100000 видов



# Митохондриальный геном грибов необычайно изменчив по размерам: от 19000 до 85000 пар оснований, ГЦ состав: от 18% до 36%

## CHYTRIDIOMYCOTA

<i>Allomyces macrogynus</i>	Blastocladales	57.473	circle	100%	P
<i>Allomyces arbusculus</i>	Blastocladales	54	circle	15% **	P
<i>Catenaria anguillulae</i> (Barr)	Blastocladales	45	?	3% PCR	
<i>Spizellomyces punctatus</i> (Barr)	Spizellomycetales	61.3	3 circles***	100%	Y/P
<i>Rhizophlyctis rosea</i> (Barr)	Spizellomycetales	~50	circle?	5% PCR	P
<i>Rhizophyidium</i> #136 (Longcore)	Chytridiales	68.834	circle	100%	Y/P
<i>Harpochytrium</i> #94 (Longcore)	Monoblepharidales	19.473	circle	100%	Y/P
<i>Harpochytrium</i> #105 (Longcore)	Monoblepharidales	24.570	circle	100%	Y/P
<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	Monoblepharidales	33.949	linear (mon.)	100%	P
<i>Monoblepharella</i> #15 (Mollicone)	Monoblepharidales	60.433	circle	100%	Y/P
<i>Monoblepharis</i> #20 (Mollicone)	Monoblepharidales	~40	circle?	5% PCR	

## ZYGOMYCOTA

<i>Rhizopus stolonifer</i>	Mucorales	54.191	circle	100%	Y/P(partial)
<i>Mucor mucedo</i>	Mucorales	?	circle?	0.6 kbp (PCR)	
<i>Mortierella verticillata</i>	Mortierellales	58.745	circle	100%	Y
<i>Smittium culisetae</i>	Harpellales	58.654	circle	100%	

<i>Aspergillus nidulans</i>	ASCOMYCOTA	32	circle	94% #	
<i>Galiella rufa</i>	ASCOMYCOTA (Pezizales)	30 ? -			
<i>Saitoella complicata</i>	ASCOMYCOTA	43	circle	99%	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ASCOMYCOTA	19.431	circle	100%	P
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	ASCOMYCOTA	44.227	circle	100%	Y/P
<i>Schizosaccharomyces jap.v.jap</i>	ASCOMYCOTA	~86	circle	100%	Y/P
<i>Taphrina deformans</i>	ASCOMYCOTA	55.914	circle	100%	

<i>Cantharellus cibarius</i>	BASIDIOMYCOTA	58.655	circle	100%	
<i>Schizophyllum commune</i>	BASIDIOMYCOTA	49.705	circle	100%	Y/P(partial)

<i>Phytophthora infestans</i>	OOMYCOTA (pseudofungi)	37.957	circle	100%	Y/P
<i>Phytophthora megasperma</i>	OOMYCOTA (pseudofungi)	~38	circle	28% *	

<i>Monosiga brevicollis</i> (Nerad)	CHOANOZOA	76.568	circle	100%	Y/P
-------------------------------------	-----------	--------	--------	------	-----

М



Б

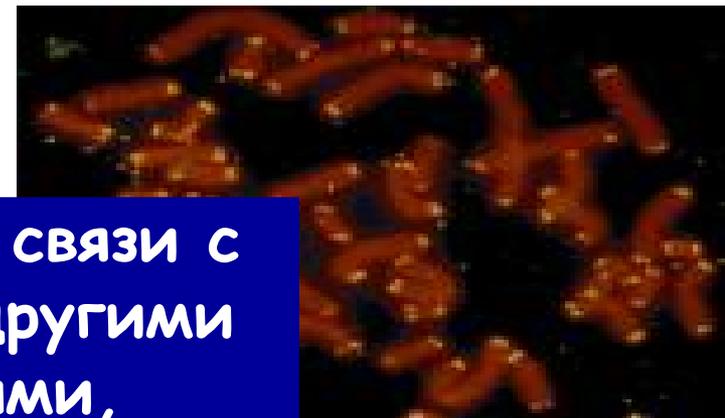
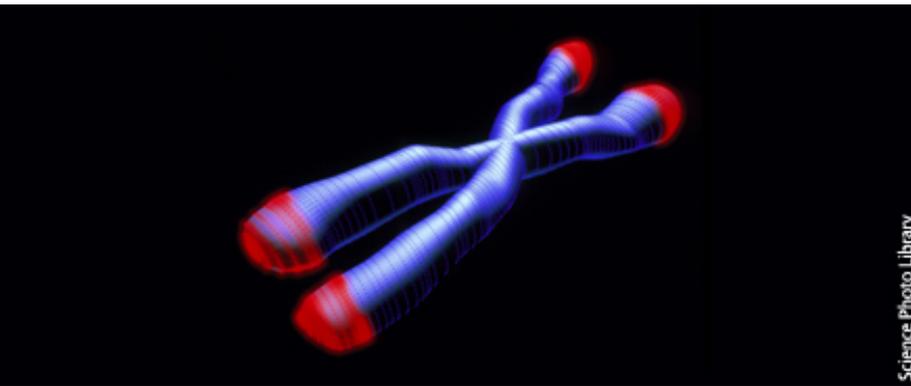


# Организация молекул митохондриальной ДНК грибов

Митохондриальные карты обычно представляют **кольцевыми**, однако **у трети** из изученных видов дрожжей и в других группах грибов выявлены **линейные молекулы**

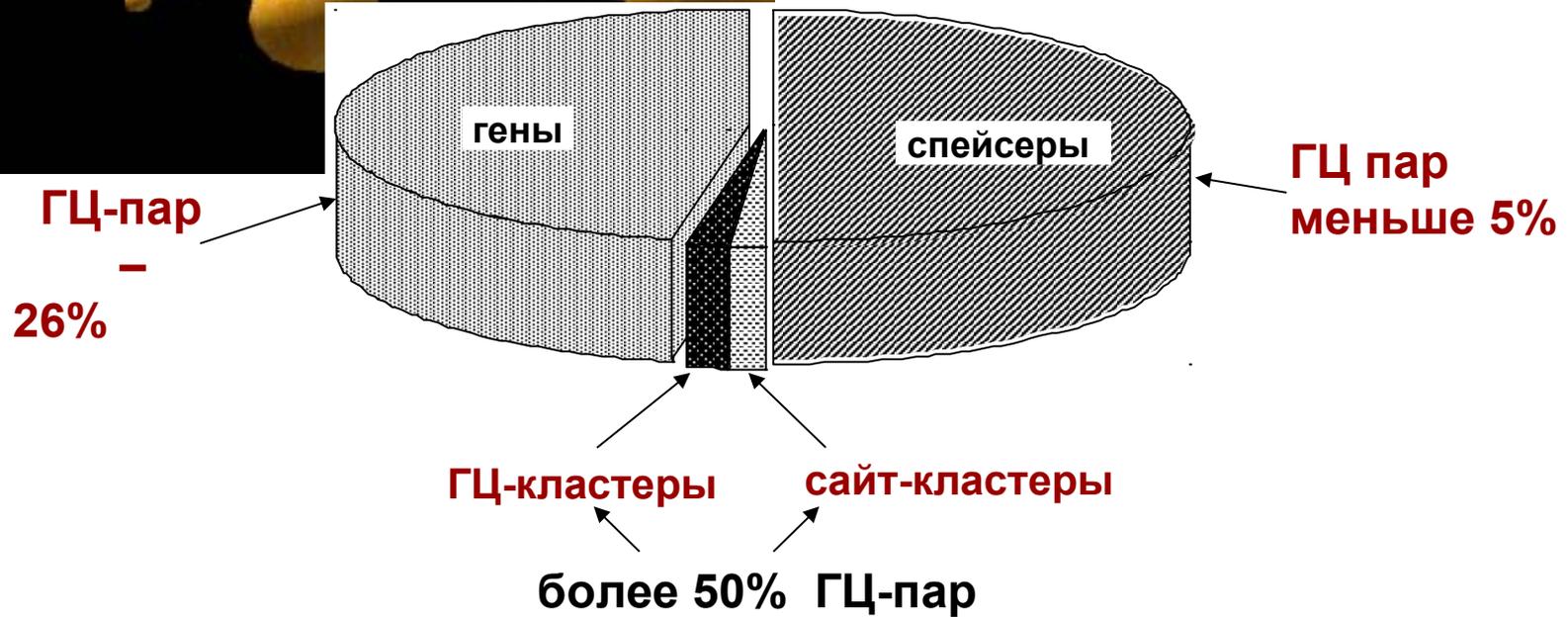
Они имеют терминальные структуры

- «митохондриальные теломеры»



**Теломеры** интенсивно изучаются в связи с репликацией линейных мтДНК и другими явлениями: апоптозом, болезнями, инфекциями, «бессмертием»

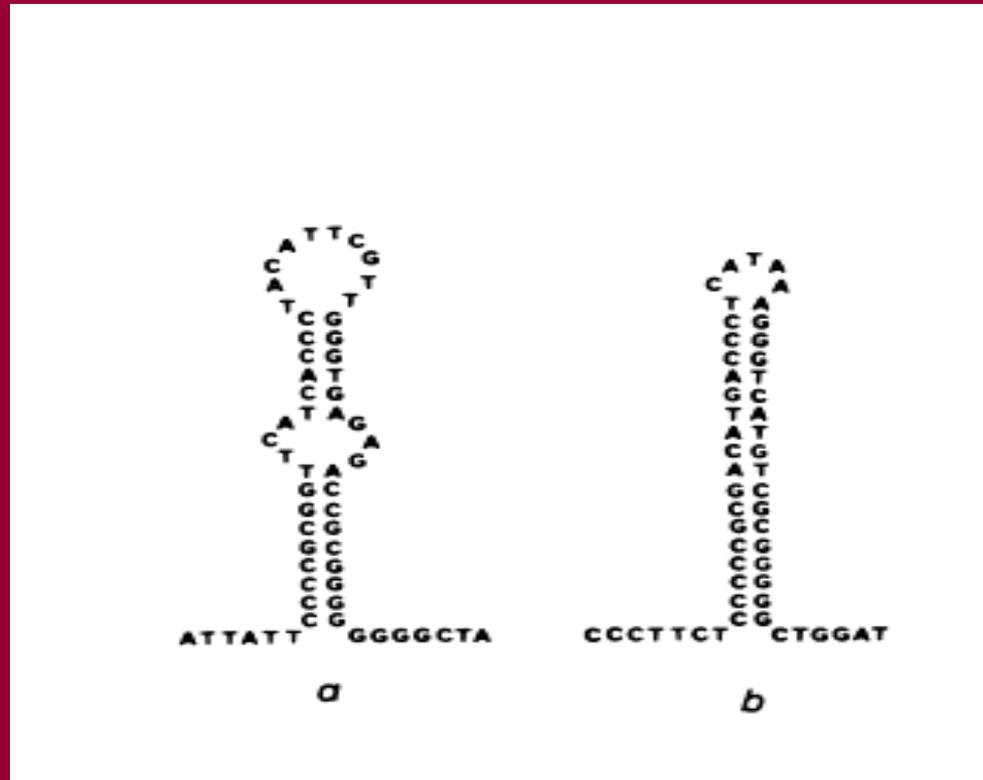
# Митохондриальный геном дрожжей



**ГЦ-содержание в мтДНК дрожжей мало – от 18 до 25%.  
Однако 2-3% генома содержат участки, богатые ГЦ-парами**

**Длина ГЦ-кластеров 30-60 пн, их количество на геном – до 150 и более, расположены они в межгенных участках**

# Примеры ГЦ-кластеров в митохондриальной ДНК грибов



В мт геноме дрожжей очень часто происходят рекомбинации, в которых участвуют ГЦ-кластеры

Следствием аномального рекомбиногенеза являются и мутанты *petite*, несущие крупные делеции мтДНК

## Митохондриальный геном дрожжей необычайно изменчив по размерам

Даже у разных видов одного и того же рода *Saccharomyces* размер молекул мтДНК сильно различается:

85 тпн - «длинный геном»

78 тпн - «короткий» геном»

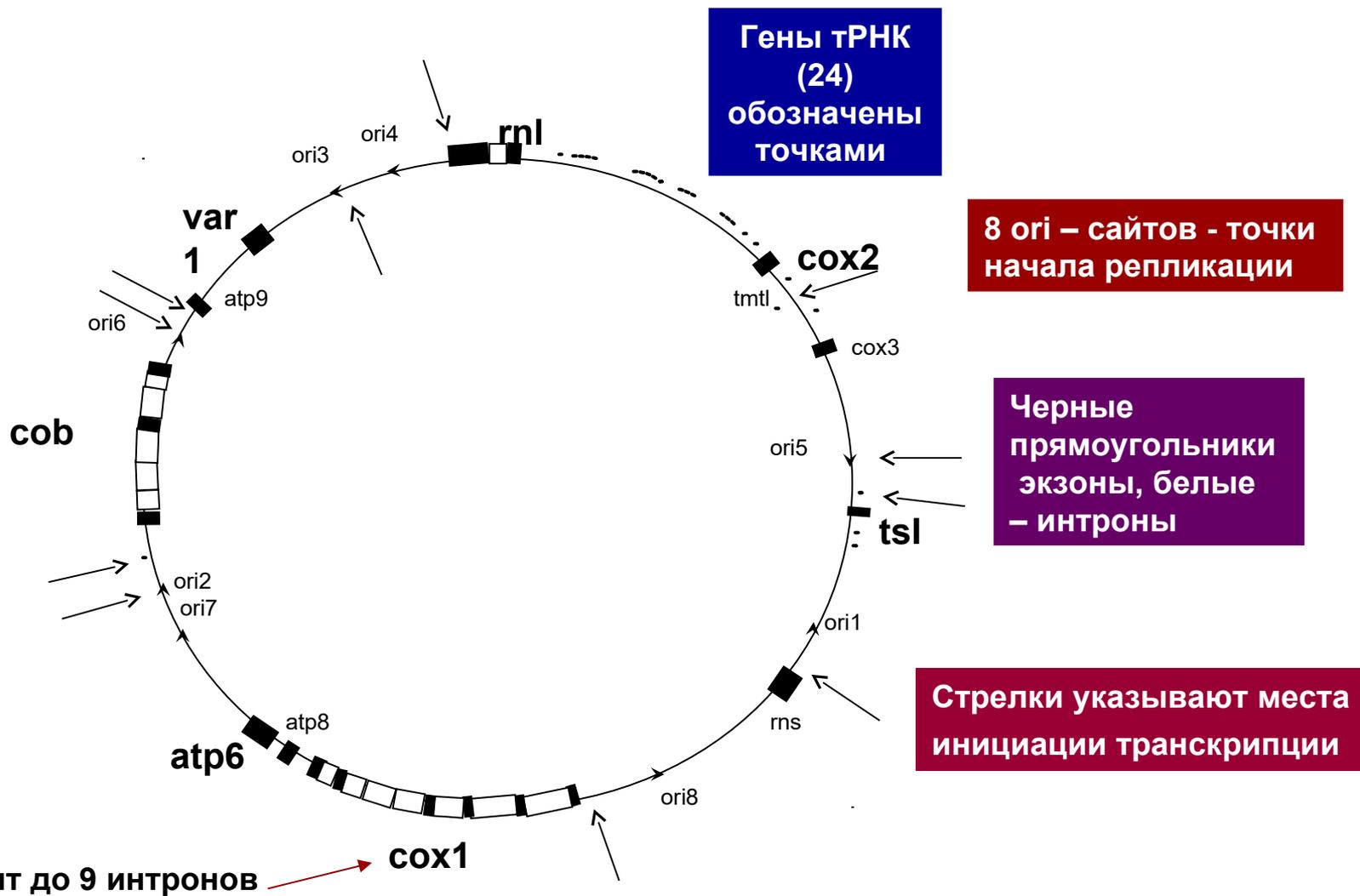
74 тпн - «сверхкороткий» геном»

У примитивного вида дрожжей *S. uvarum* геном мт всего 57 тпн

Но несмотря на разный размер мтДНК, набор кодируемых генов у разных видов рода практически одинаков.

Митохондриальная ДНК дрожжей кодирует значительно меньше генов, чем мтДНК растений

# Карта митохондриального генома *Saccharomyces cerevisiae*



# Гены митохондриальных ДНК дрожжей

Компоненты митохондрий	Гены
рибосомальная РНК	<i>rns (21S) , rnl (15S)</i>
рибосомальные белки: малая субъединица	<i>var1</i>
транспортные РНК РНК-компонент РНКазы-Р подобного фермента	24
цитохром <i>b</i> (компл. III)	<i>cob (или cyb)</i>
цитохром <i>c</i> оксидаза (компл.IV) - 3 субъединицы	<i>coxI, coxII, coxIII</i>
АТФ синтаза - 3 субъединицы	<i>atp6, atp 8, atp 9</i>
<i>Интрон-кодируемые orf :</i> РНК-матуразы эндонуклеазы белки подобные обратной транскриптазе ( <i>orf cox1</i> интр.)	<i>mat</i> ? <i>aI1, aI2</i>
Неидентифицированные рамки считывания	3

# Интроны митохондриальных генов дрожжей

Число интронов варьирует у разных штаммов

Штаммы без интронов так же

жизнеспособны, как и с интронами, но

- если сплайсинг нарушен, штамм становится

**нежизнеспособным.**

**Интроны могут содержать ORF**

**Обычно эти ORF кодируют ферменты:**

**матуразы, эндонуклеазы**

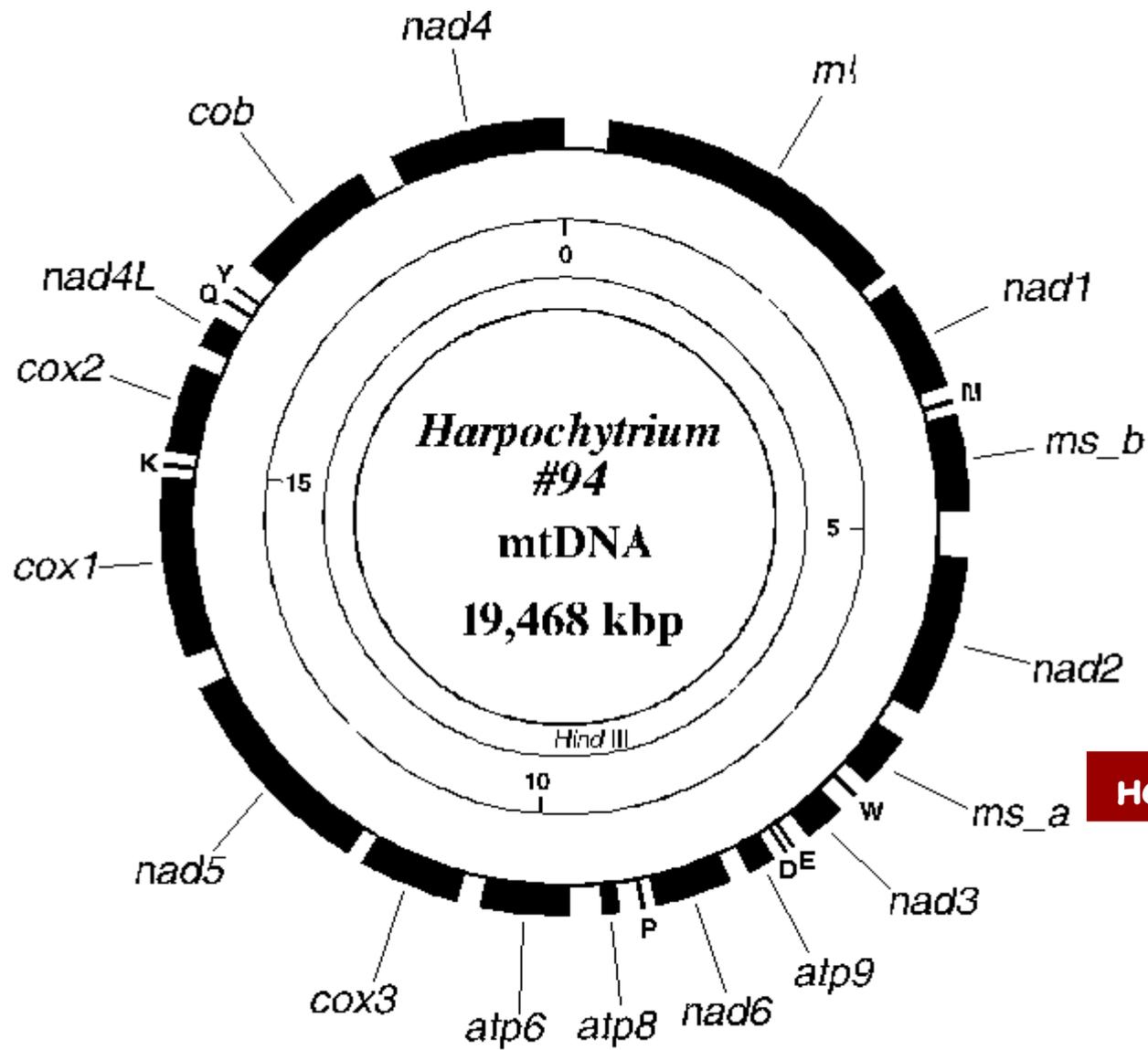
**Сайты узнавания интрон-кодируемыми**

**эндонуклеазами очень длинные - до 18 нуклеотидов,**

**они гораздо специфичнее рестриктаз.**



# Карта митохондриального генома еще одного вида хитридиомицетов



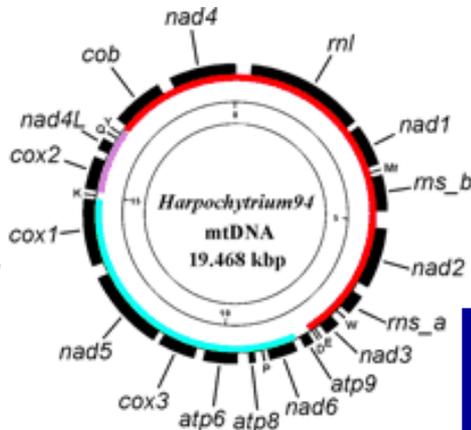
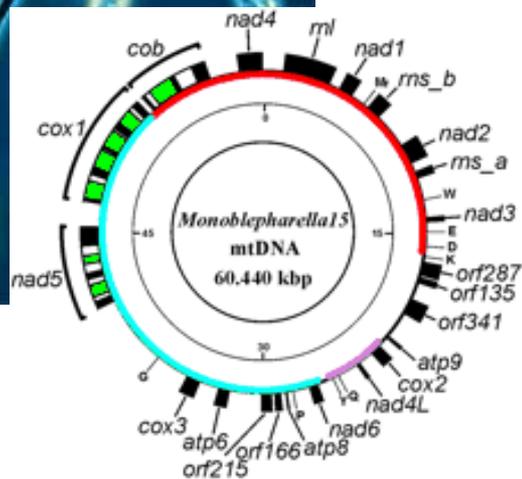
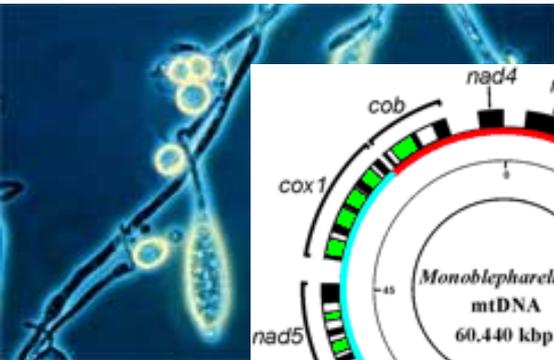
Набор генов -  
типичный для  
грибов

Все гены  
транскрибируются  
с одной нити

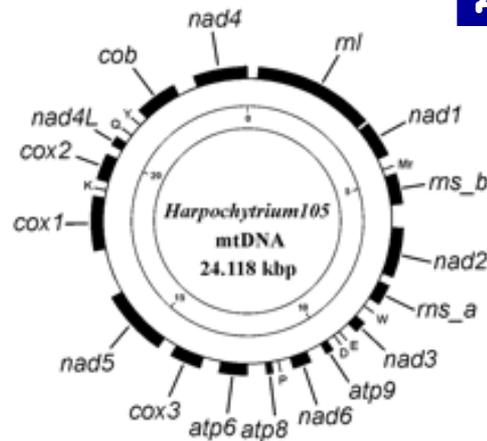
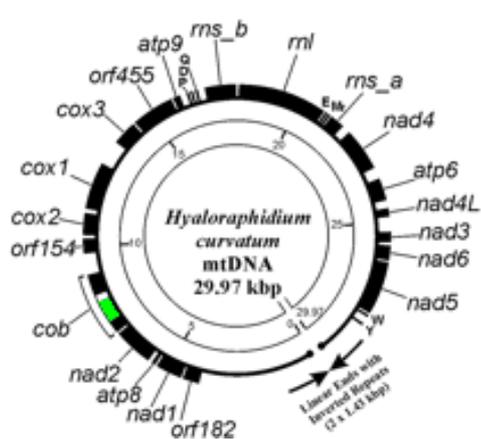
!!!

но тРНК - всего 8 генов

# Митохондриальный геном хитридиомицетов

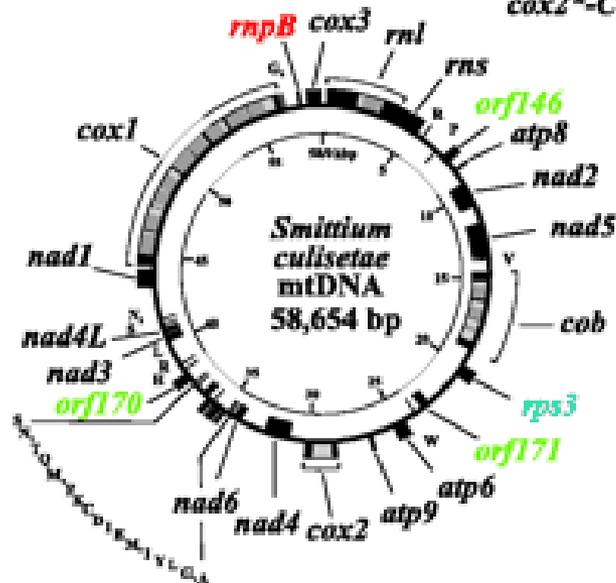
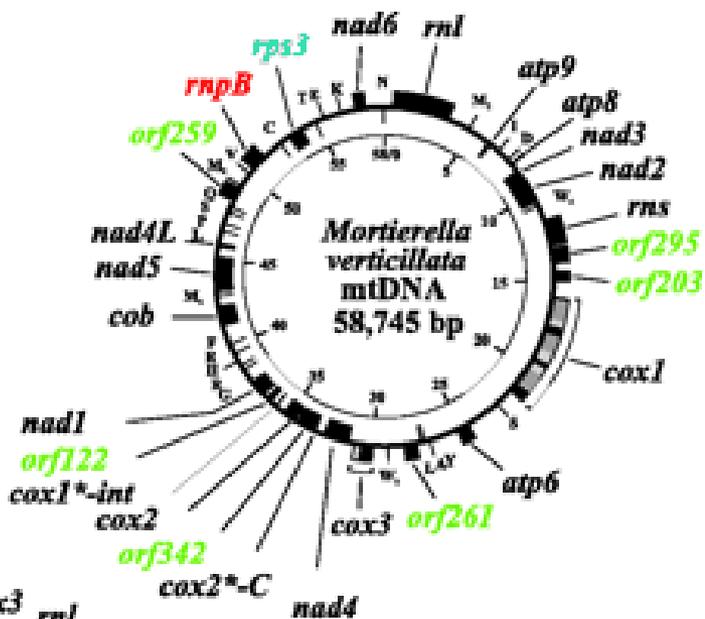
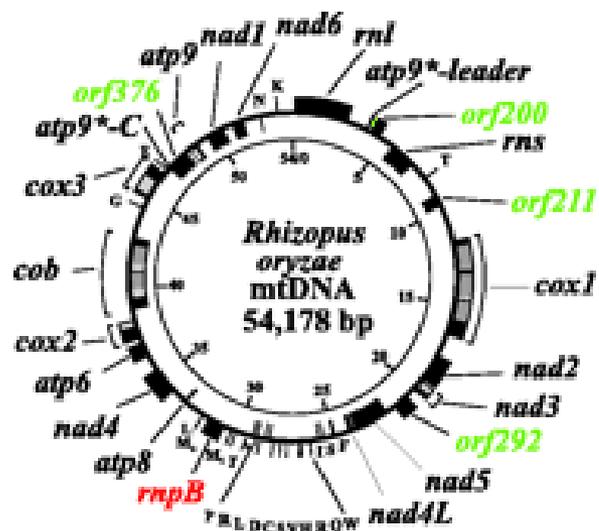


ГЦ состав 36-39% -  
больше, чем в мтДНК  
других грибов



Размер генома очень изменчив: от 19,500 до 60,440 пн  
ТРНК генов очень мало - 7-9, но всегда остаются те же самые

# Митохондриальные карты трех видов зигомицетов



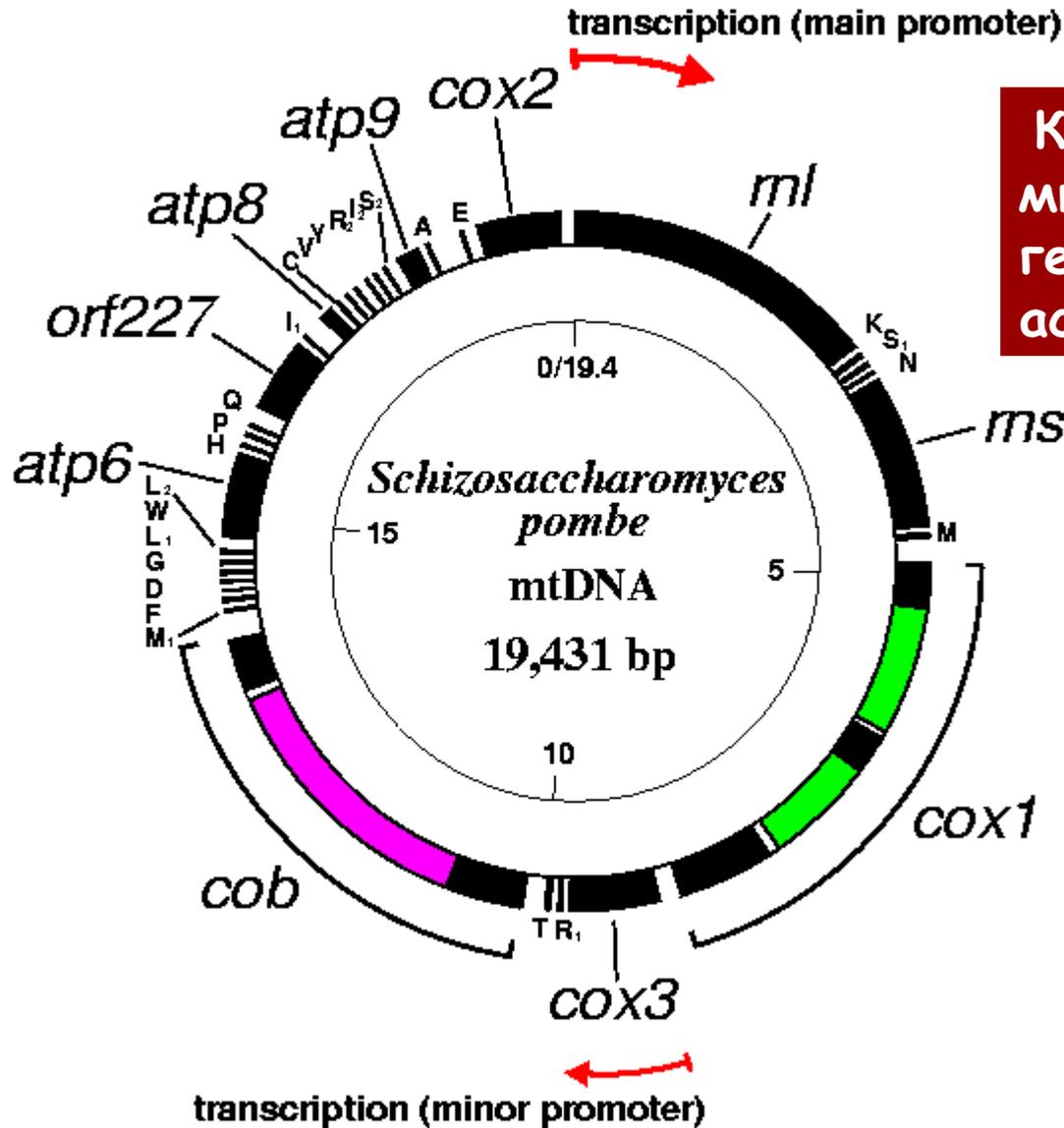
- Гены кодируются на обеих цепочках;
- Кодирующие последовательности занимают 35-43%;
- Порядок генов изменчив;
- У *Rhizopus oryzae* гены *nad2/nad3* и *nad4/nad5* перекрываются на 1 нуклеотид;
- Набор тРНК достаточен.

# Гены, ORF и интроны в мтДНК зигомицетов

Гены и интроны	<i>R.oryzae</i>	<i>M.verticillata</i>	<i>S.culisetae</i>
<i>rns, rnl</i>	■	■	■
<i>atp 6,8,9</i>	■	■	■
<i>cob, cox1,2,3</i>	■	■	■
<i>nad1-6,4L</i>	■	■	■
<i>trnA-W</i>	24 [ <i>trnI</i> (cau) отсутствует]	26	27
<i>rnpB</i>	■	■	■
<i>rps3</i>	□	■	■
Интроны группы 1	9(5)	4(3)	14(13)
Локализация интронов (количество)	<i>cox1</i> (3), <i>cox2</i> (1) <i>cox3</i> (1), <i>cob</i> (2) <i>nad3</i> (1), <i>atp9</i> (1)	<i>cox1</i> (3), <i>cox3</i> (1)	<i>rnl</i> (1), <i>cox1</i> (9) <i>cox2</i> (1), <i>cob</i> (3)
Другие ORFs	4	7	3

**Общее число генов - более 40**

- genes & exons
- introns/orfs, group I
- introns/orfs, group II



**Карта  
митохондриального  
генама одного из  
аскомицетов**

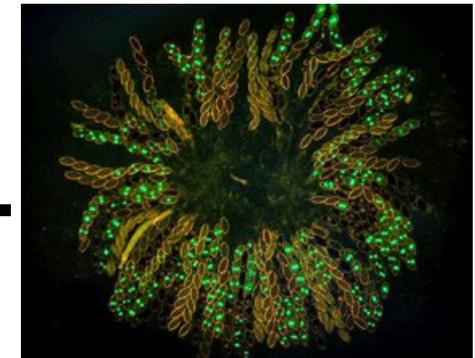
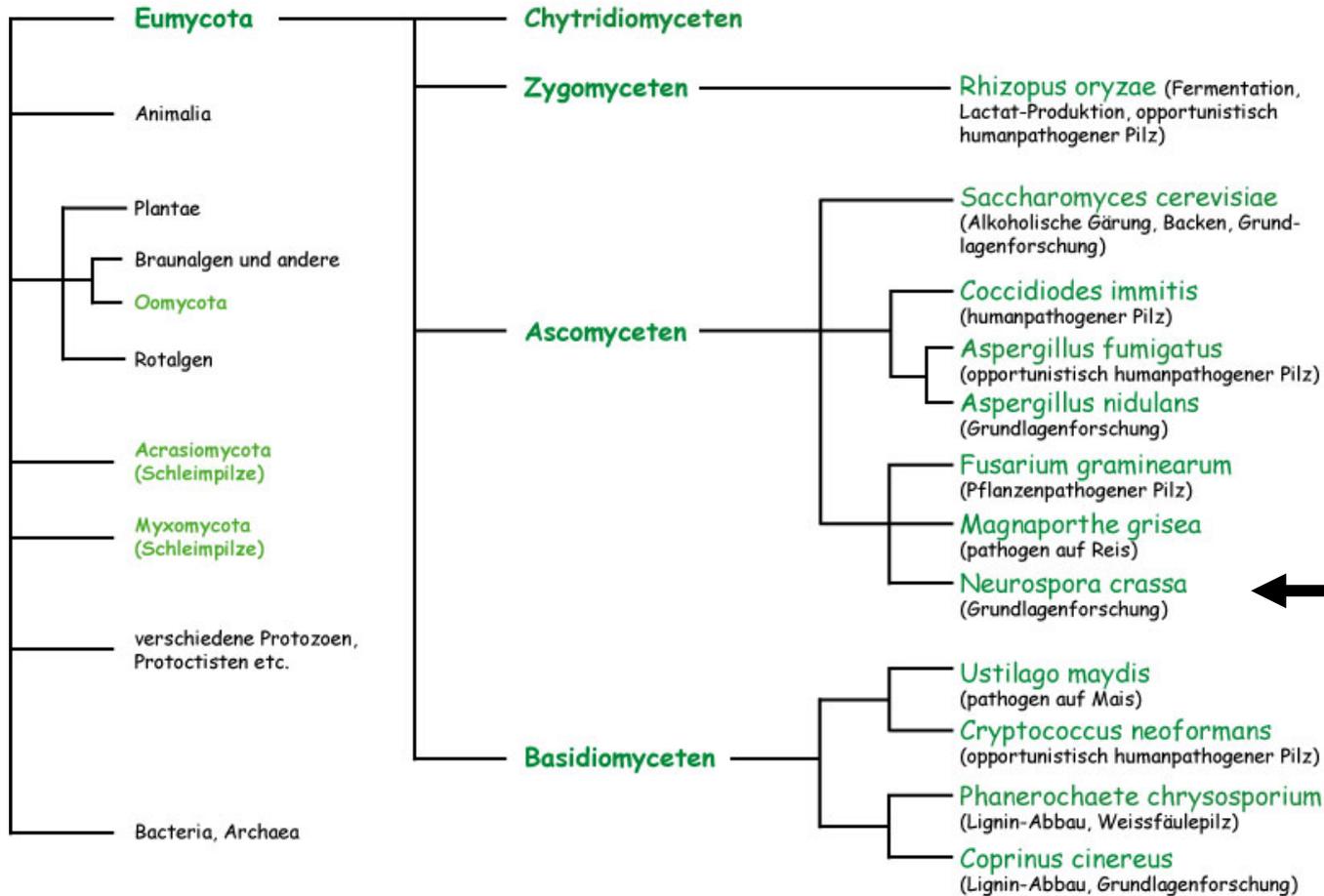
**Геном очень  
плотно «упакован»**

**25 генов тРНК**

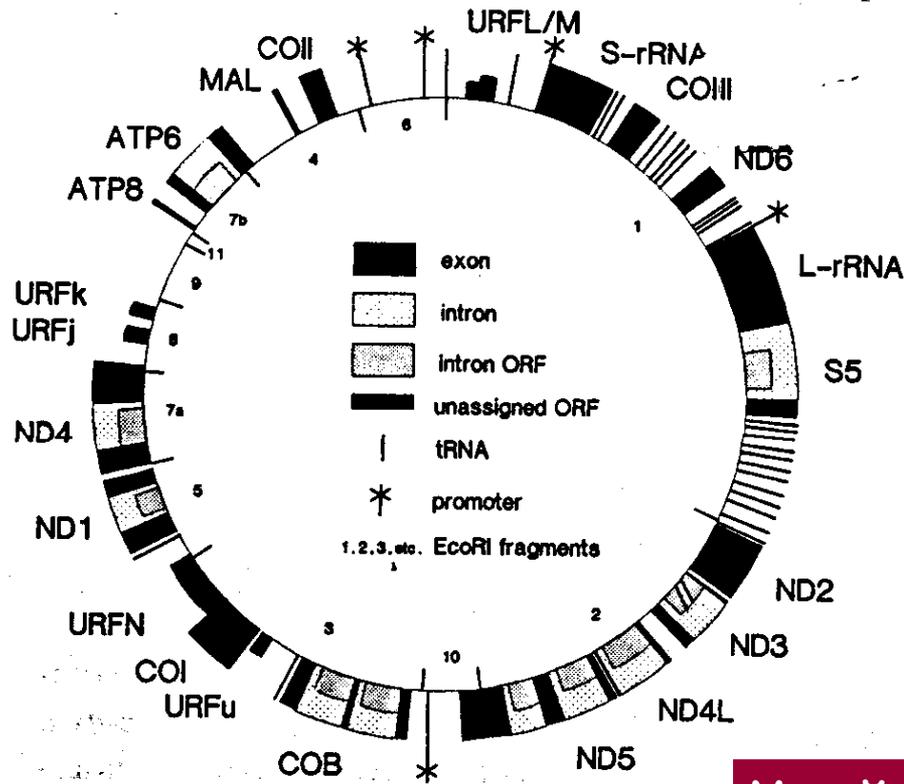
**10 других генов**

**2 промотора**

# Нейроспора – представитель высших грибов аскомицетов



# Митохондриальный геном *Neurospora* - кольцевая молекула размером 62 тпн



тРНК генов - 27

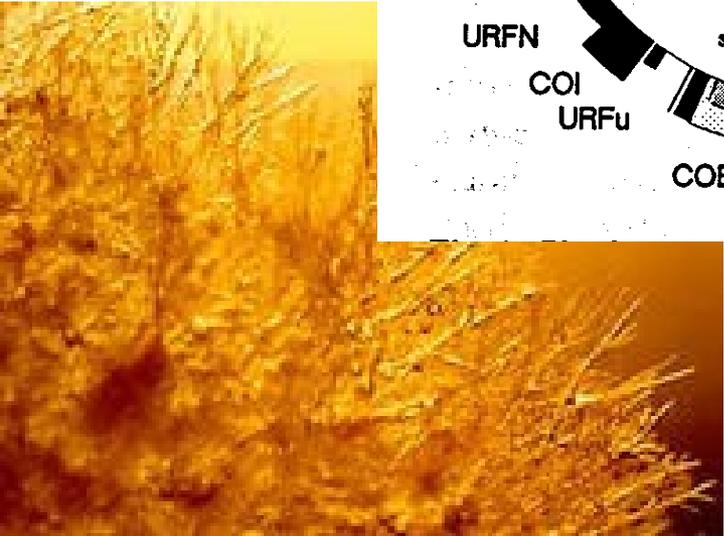
3 рРНК гена

7 генов ND

12 других генов

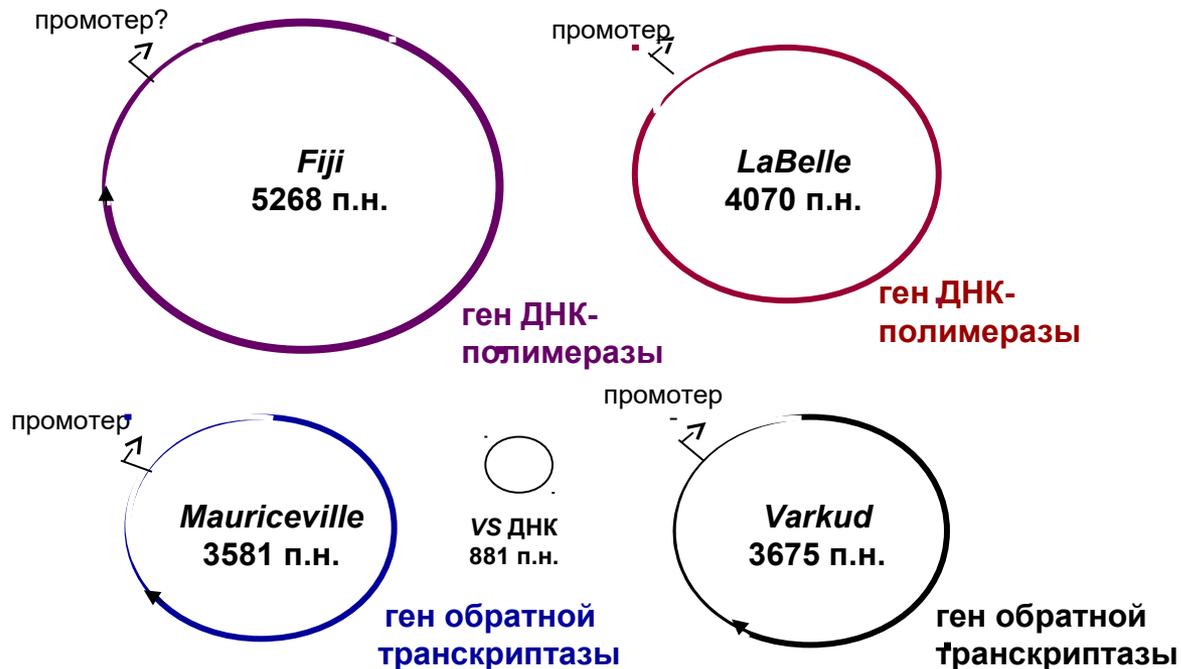
**Всего 49 генов**

У нейроспоры генов мтДНК  
больше, чем у дрожжей



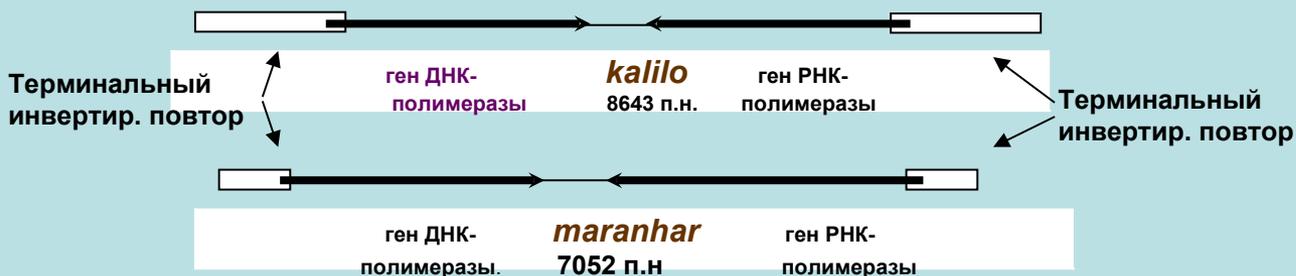
# Митохондриальные плазмиды *Neurospora*

найлены в природных штаммах

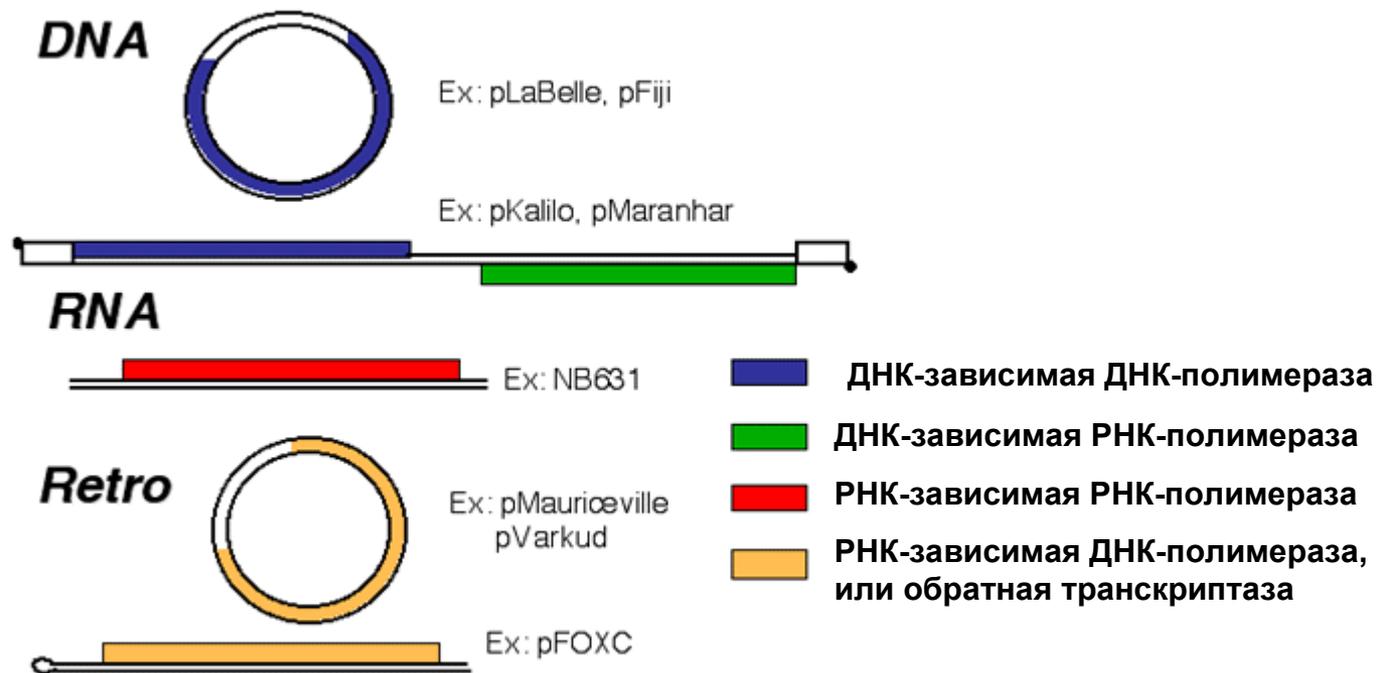


**Гипотеза:**

плазмиды грибов родственны интронам мтДНК и мобильным генетическим элементам



# Разнообразие типов плазмид у грибов и кодируемых ими генов



К настоящему времени плазмиды в митохондриях найдены у 16 видов живых организмов, из них 9 - грибы

# Большинство штаммов нейроспоры и других грибов не стареют и кажутся бессмертными

Однако описано несколько случаев старения, связанных с линейными плазмидами

Штамм *N.intermedia*

*Ювенильная стадия:*

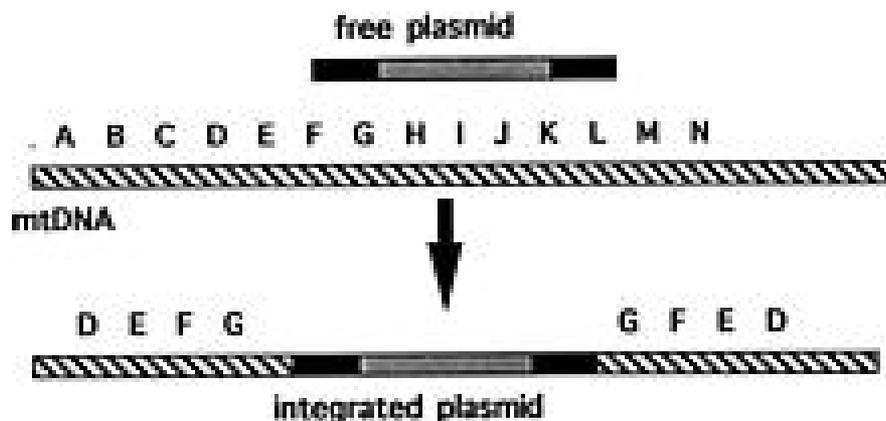
плазмиды существуют в митохондриях в большом количестве копий

*Начало старения:*

молекулы ДНК плазмиды *kalilo* внедряются в мтДНК нейроспоры

Механизмом такого старения является, возможно, инактивация генов, связанная с интеграцией плазмид в геном митохондрий

# Схема встраивания плазмиды в молекулу митохондриальной ДНК нейроспоры



Молекула мтДНК имеет структуру: **A-B-C- - -L-M-N**

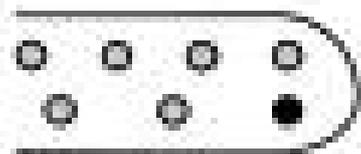
Молекула мтДНК со встроенной плазмидой имеет структуру:

**D-E-F-G-kal- G-F-E-D**

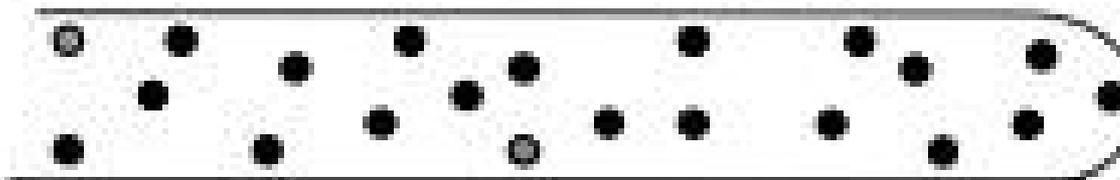
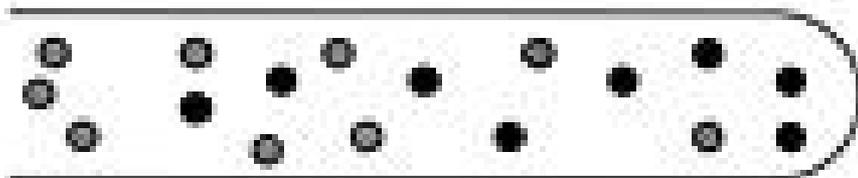
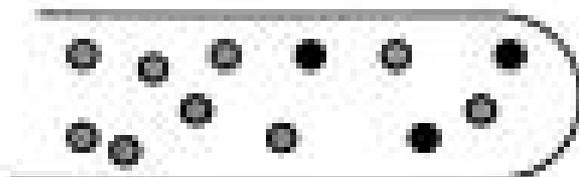
и, возможно,

**L-M-N-kal-N-M-K.**

По такому же принципу внедряются в мтДНК плазмиды *maranhar*, вызывая нарушение работы мтДНК и старение штамма



Молодой  
штамм



Старый  
штамм

Модель подавления митохондрий после встраивания плазмиды в мтДНК нейроспор. Темными кружками отмечены митохондрии, содержащие встроившиеся плазмиды

**Итак, митохондриальные ДНК грибов отличаются от митохондриальных ДНК растений**

- **низким процентом ГЦ-пар**
- **меньшим размером**
- **меньшим числом генов**
- **чрезвычайным разнообразием размера молекулы**
- **число кодируемых генов варьирует примерно от 25 до 50**

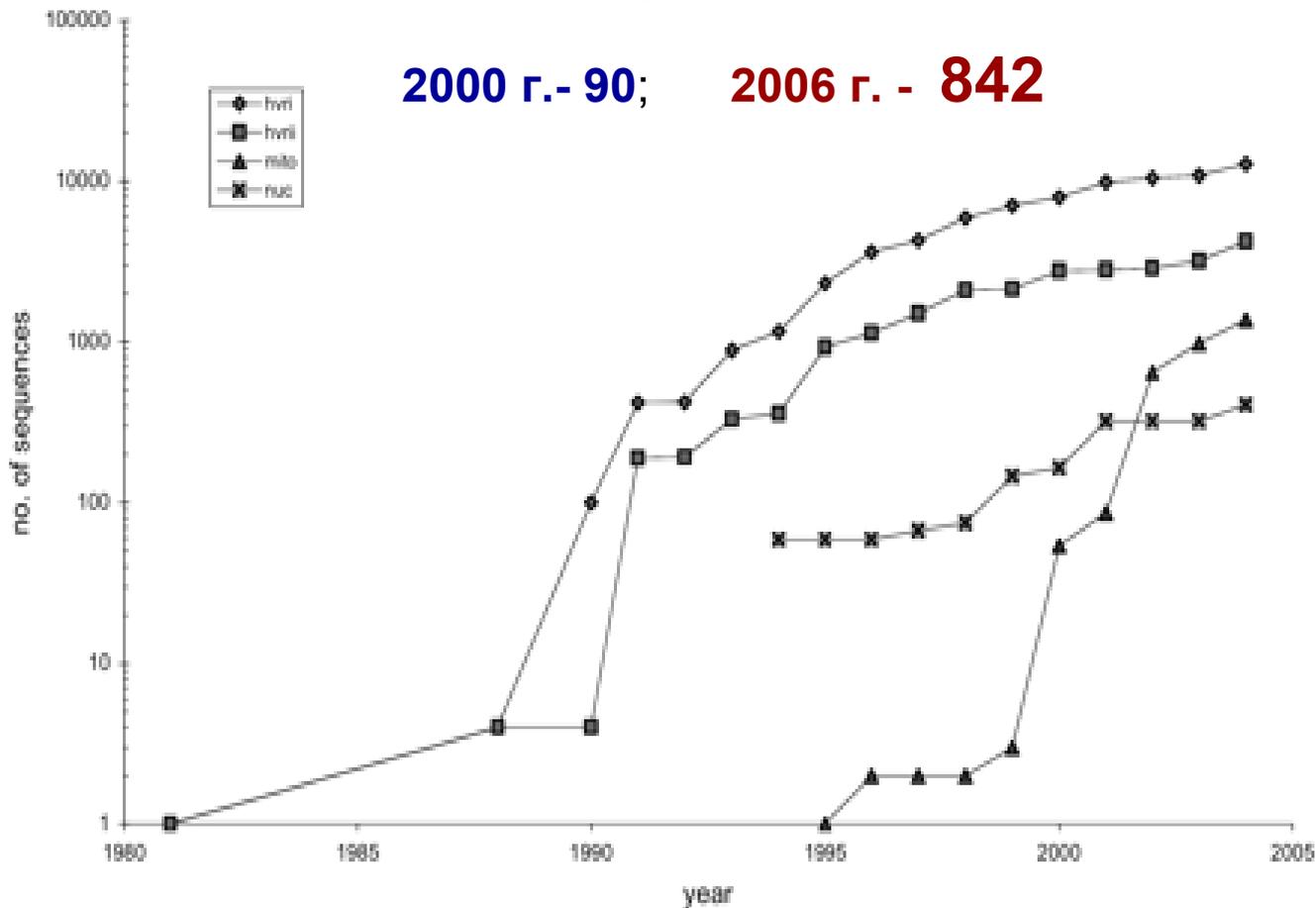
# Из 1283 полностью секвенированных геномов митохондрий более 1100 – митохондриальные ДНК животных



# Накопление данных по секвенированным геномам за последние 25 лет

Митохондриальные сиквенсы:

2000 г.- 90;    2006 г. - 842



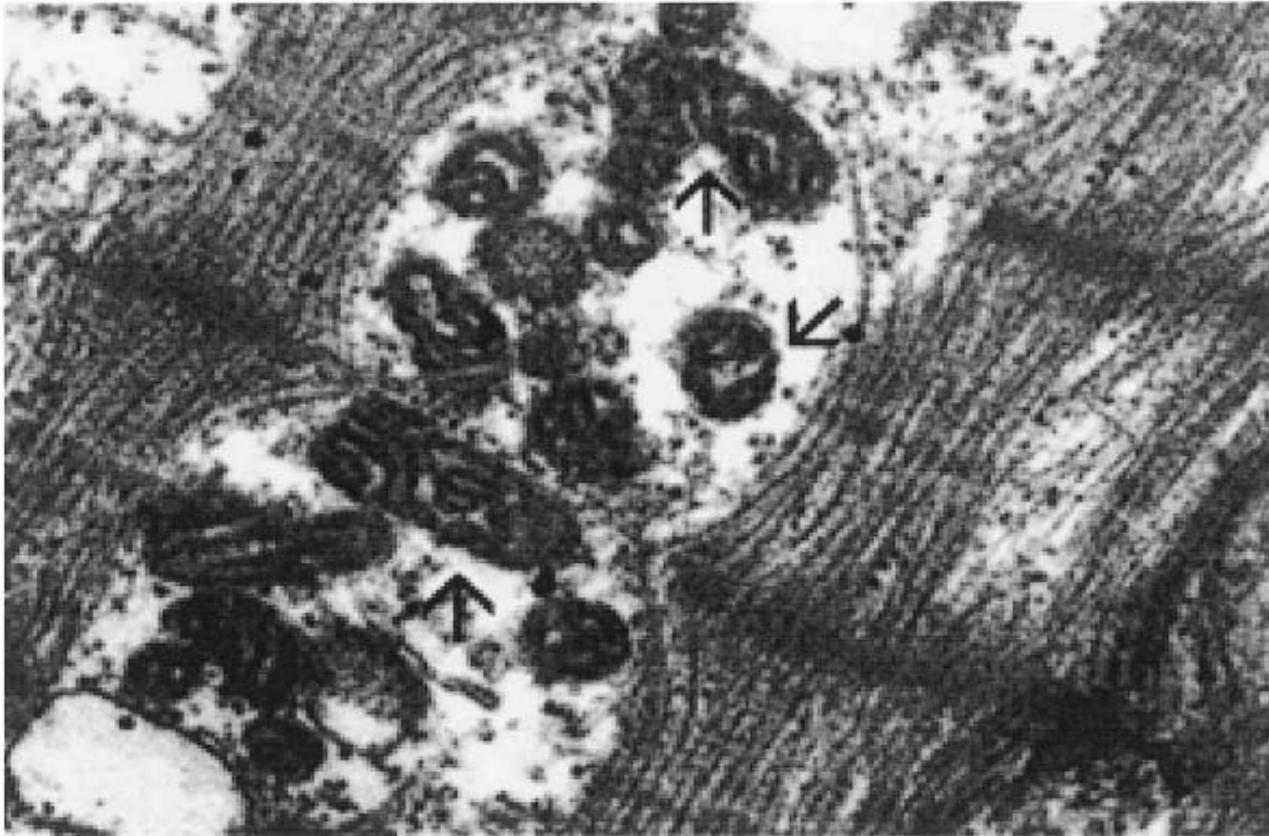
# Митохондриальные ДНК животных

	Тип / класс	Размер генома, т.п.н.
<i>Sarcophyton glaucum</i>	Cnidaria/Anthozoa (коралл)	18.400
<i>Ascaris suum</i>	нематоды	14.284
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	иглокожие	15.560
<i>Drosophila melanogaster</i>	членистоногие/ насекомые	15.900
<i>Xenopus laevis</i>	хордовые/ земноводные	17.200
<i>Cnemidophorus exsanguis</i>	хордовые/ пресмыкающ.	17.400 (22.2)
<i>Gallus gallus domest.</i>	хордовые / птицы	16.775
<i>Mus musculus</i>	хордовые /млекопитающие	16.295
<i>Homo sapiens</i>	хордовые /млекопитающие	16.569

## Mammalia мтДНК

- *Bos taurus* 16338п.н.
- *Mus musculus* 16303
- *Rattus norvegicus* 16298
- *Balaenoptera physalus* 16398
- *Balaenoptera musculus* 16402
- *Phoca vitulina* 16826
- *Halichoerus grypus* 16797
- *Equus caballus* 16660
- *Didelphis virginiana* 17084
- *Homo sapiens* 16569п.н.

## Митохондрии кардиомиоцитов человека



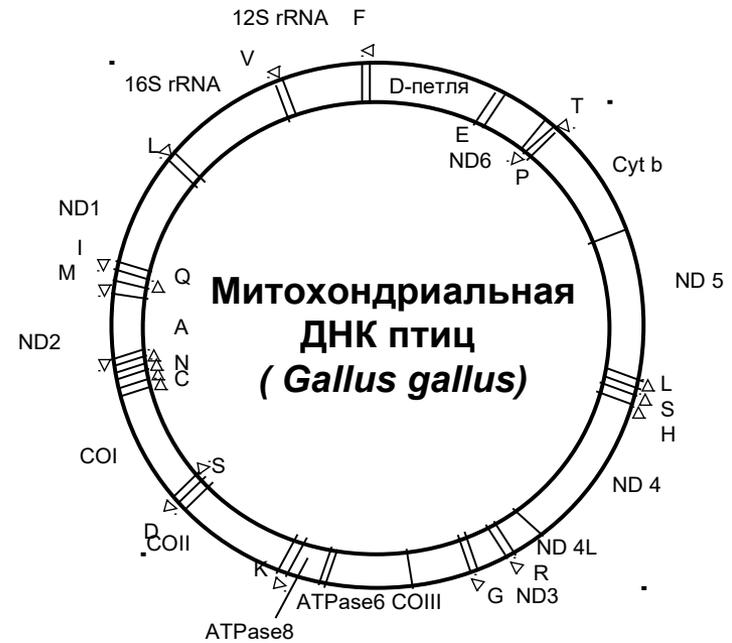
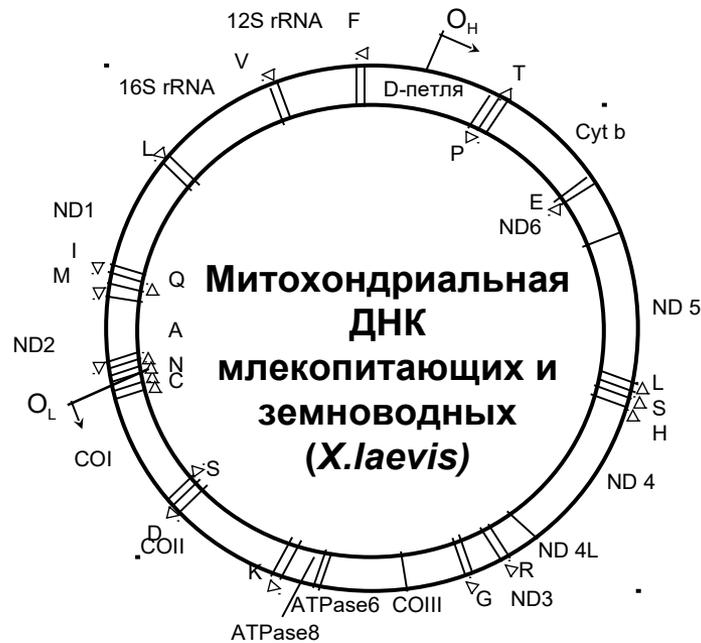
Митохондрии различной формы (указаны стрелками) распределяются среди миофибрилл

**Митохондриальная ДНК животных представляет собой замкнутую кольцевую молекулу размером от 14 до 42 тысяч пар нуклеотидов, чаще всего 16-17 т.п.н.**

**Митохондриальные геномы животных значительно уступают по размерам митохондриальной ДНК большинства грибов и особенно мтДНК растений**

**Митохондриальные геномы животных даже самых отдаленных филогенетических групп весьма сходны**

# Сравнительная организация митохондриального генома различных классов позвоночных



Гены мтДНК животных имеют «уплотненную» организацию

Межгенные спейсеры – 1-9 нуклеотидов

Многие гены расположены встык

Гены могут перекрываться на 2-9 нуклеотидов

## Гены митохондриальных ДНК животных

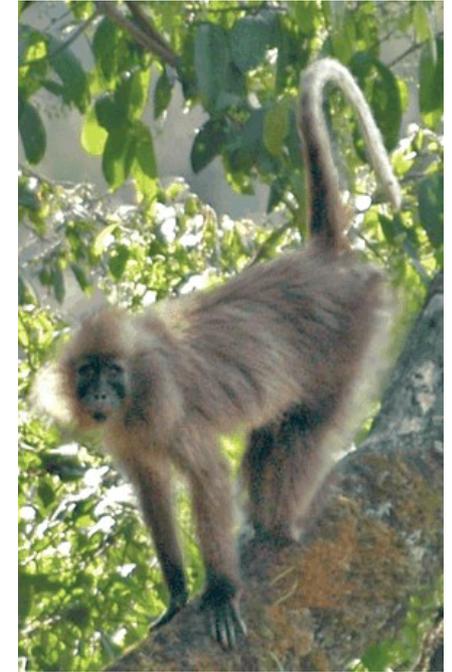
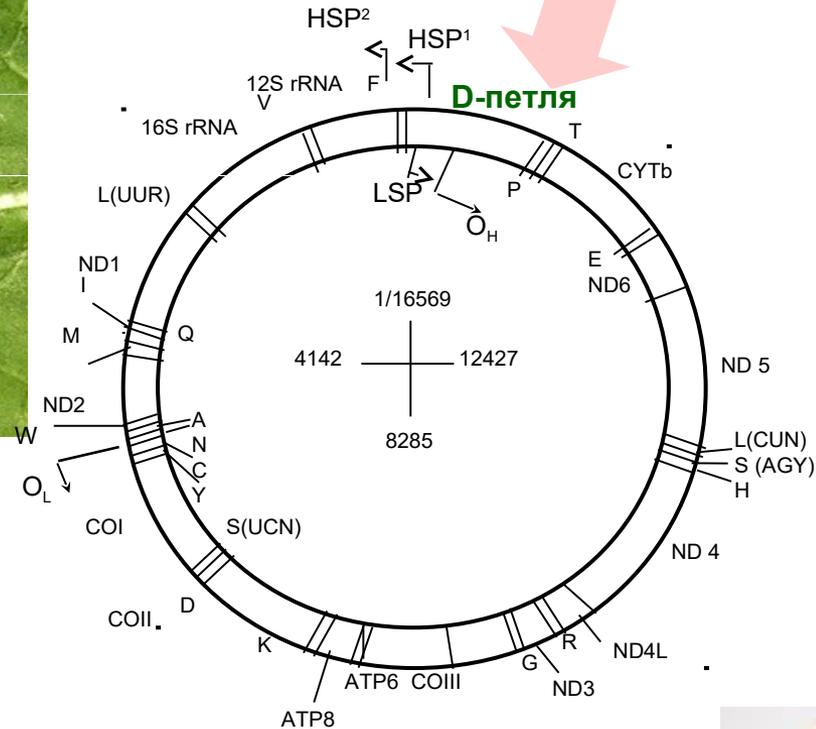
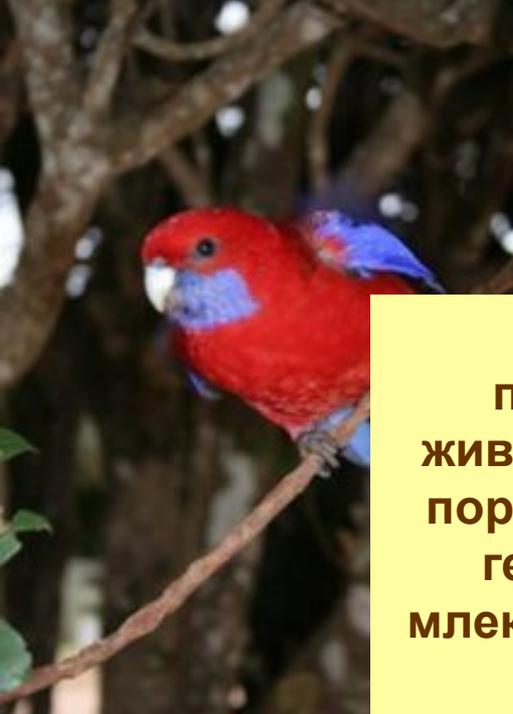
<i>Компоненты митохондрий</i>	Гены
рибосомальная РНК	<i>rns (16S) , rnl (12S)</i>
транспортные РНК	22
цитохром <i>b</i> (компл. III)	<i>cyt b</i>
цитохром <i>c</i> оксидаза (компл. IV)	<i>coxI, coxII, coxIII</i>
АТФ-синтаза	<i>atp6, atp 8</i>
дыхательная цепь NADH дегидрогеназы	<i>nd1, nd2, nd3, nd4l, nd4, nd5, nd6</i>

**ИТОГО - 37 генов**

Увеличение размеров митохондриальных геномов некоторых животных обычно происходит за счет некодирующих повторяющихся последовательностей, почти всегда в контрольной области



Batrachoseps gavilanensis



Даже у весьма далеких от позвоночных полухордовых животных *Balanoglossus carnosus* порядок взаимного расположения генов в целом такой же, как у млекопитающих, т.е. сохраняется в течение 600 млн. лет



# Ribosomal RNAs

- |            | Prokaryotes    | Eukaryotes (mammalian) | Mitochondria   |
|------------|----------------|------------------------|----------------|
| Large rRNA | 2900 nt / 23 S | 4800 nt / 28 S         | 1600 nt / 16 S |
| Small rRNA | 1540 nt / 16 S | 1900 nt / 18 S         | 950 nt / 12 S  |
| 5.8 S      | —              | 160 nt / 5.8 S         | —              |
| 5 S        | 120 nt / 5 S   | 120 nt / 5 S           | 120 nt / 5 S   |

# Особенности организации митохондриальной ДНК ЖИВОТНЫХ

2 гена рибосомальной РНК в мтДНК животных: 12S и 16S –  
расположены всегда рядом, между ними – ген лейциновой  
тРНК

22 гена тРНК - достаточно для синтеза всех белков

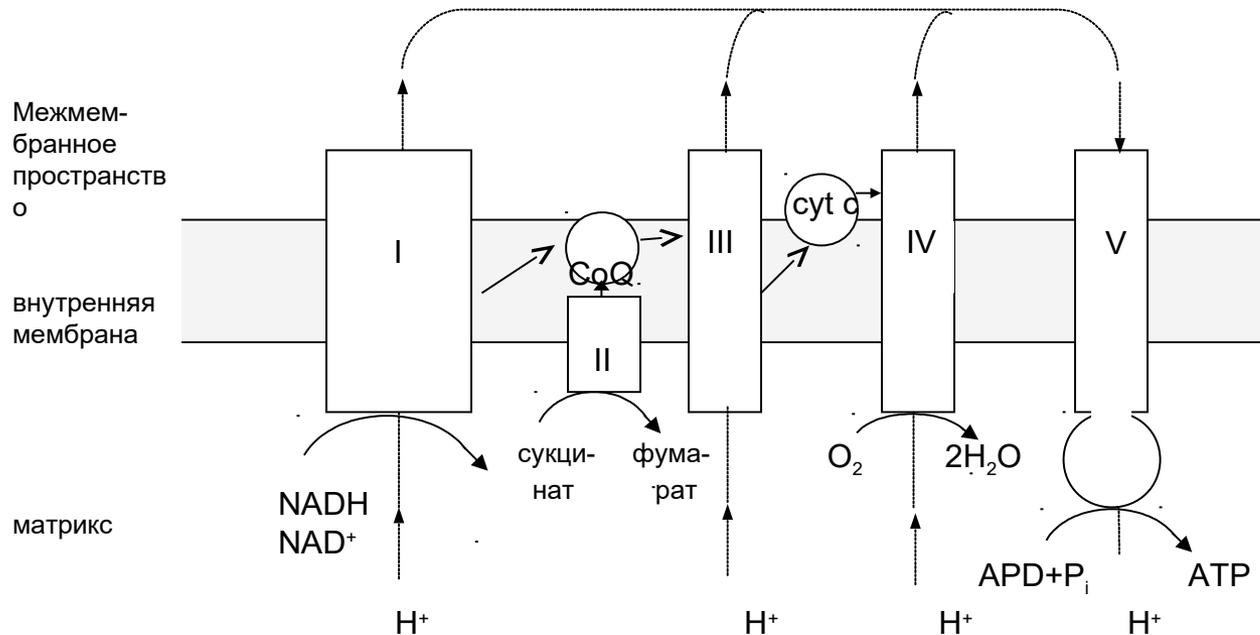
Некоторые тРНК гены образуют кластеры, но основная  
часть – по одному между белок-кодирующими генами

Наиболее консервативен у позвоночных ген  
тРНК<sup>Met</sup>, наименее – ген тРНК<sup>Ser(AGY)</sup>, который у  
млекопитающих, птиц и земноводных имеет  
необычную структуру с очень короткой DHU петлей

Рекомбинации мтДНК животных либо не  
происходят вообще, либо происходят  
исключительно редко

# Гены белков митохондрий

13 генов мтДНК животных кодируют некоторые субъединичные белки пяти компонентов дыхательного комплекса



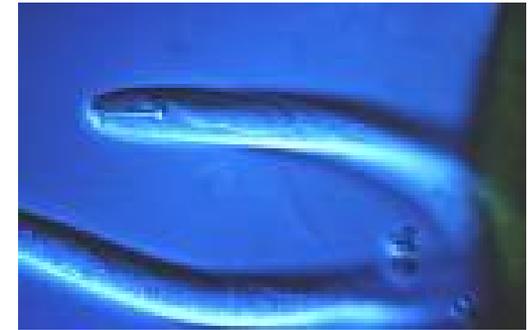
В исключительно редких случаях отсутствует какой-то из генов в мтДНК некоторых видов или, наоборот, имеются дополнительные гены или генные копии

## Митохондриальный геном резко редуцирован у паразитических животных

Значительно отличаются по организации митохондриальные геномы нематод:

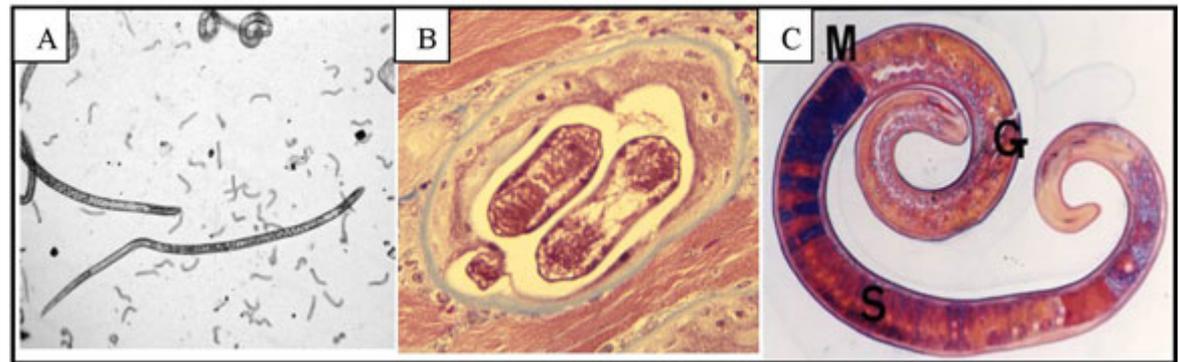
- ген *atp8* отсутствует,
- гены меньше по размерам,
- изменен порядок расположения генов,
- тРНК имеют необычную структуру

**Самый необычный геном** - у  
картофельной нематоды *Globodera pallida*:  
мтДНК - **отдельные малые кольцевые  
молекулы** различного размера и с разным  
набором генов, что является **уникальным**  
для **многоклеточных животных**.



*Globodera pallida*

Митохондриальный геном  
другого класса нематод -  
**трихинелл** -  
является **промежуточным**  
по организации между  
обычным  
мт геномом  
и мтДНК *Globodera*.



*Trichinella spiralis*

Итак,

митохондриальные ДНК животных - это **кольцевые** молекулы, которые отличаются **чрезвычайно малым размером (16-17 тпн)**, практически **постоянным числом и набором генов - 37**, порядок расположения которых относительно друг друга тоже достаточно **консервативен**.

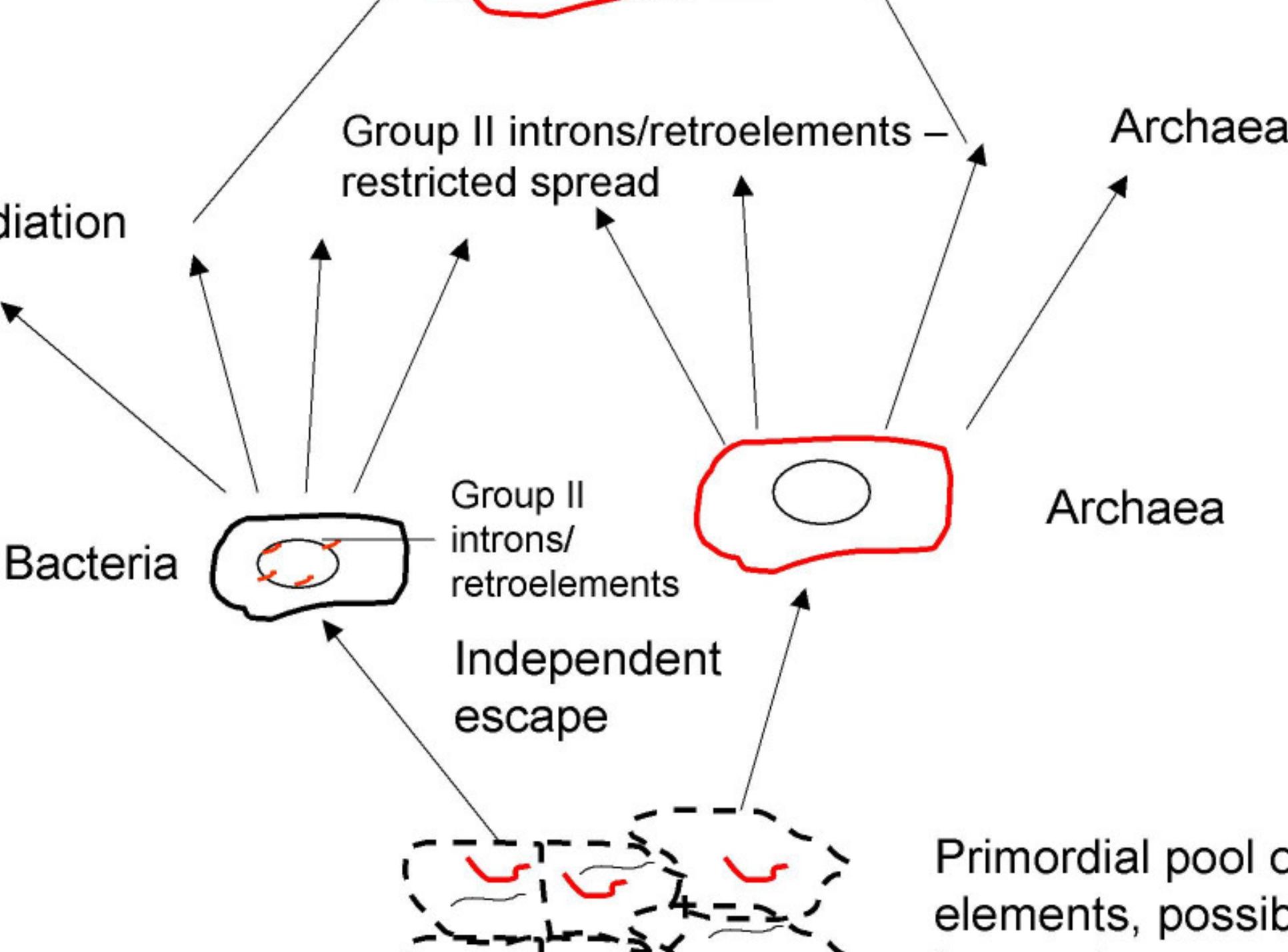
Гены кодируются на **обеих цепочках**, нередко **перекрываясь**

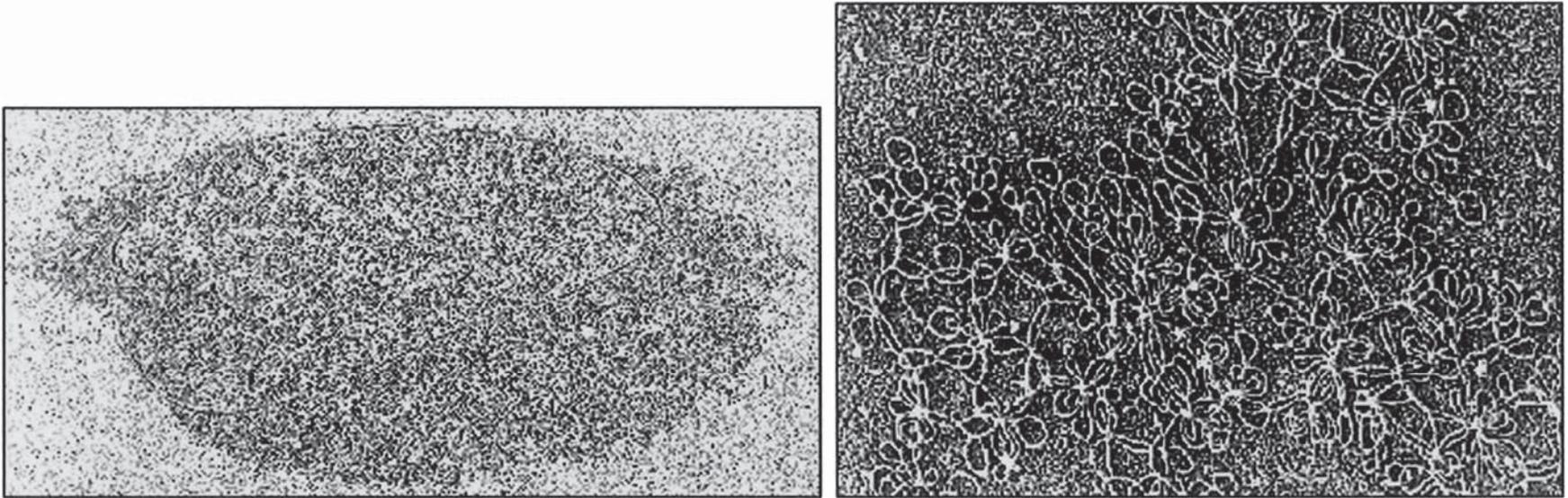
Единственная некодирующая область генома, так называемая **D-петля**, содержит точки начала **репликации и транскрипции** ДНК-молекулы



КОНЕЦ ЛЕКЦИИ 4







**Figure 4.4** (A) Electron micrograph showing a thin section through *Leishmania tarentolae*. The basal body and axoneme extend to the left. (B) Kinetoplast DNA. The maxicircle and many minicircles appear associated in an aggregate. (C) Higher magnification view of many minicircles in various topological linkages. (Photographs provided by L. Simpson, UCLA.)