

ДВА HMG-ДОМЕНА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БЕЛКА ДРОЖЖЕЙ ABF2P ОБЛАДАЮТ РАЗЛИЧНЫМ СРОДСТВОМ К ДНК

А. В. Курашенко¹, Е. О. Самойлова¹, М. В. Балева¹, И. В. Чичерин¹, Д. Ю. Петров², П. А. Каменский¹✉, С. А. Левицкий¹

¹ Кафедра молекулярной биологии биологического факультета, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

² Кафедра общей хирургии факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Поддержание постоянства митохондриального генома имеет большое значение в обеспечении функционирования организма в целом. Мутации в геноме митохондрий могут быть причиной развития мышечных дистрофий и нейродегенеративных заболеваний, установлена также их связь с процессом старения организма. В данной работе исследована ДНК-связывающая способность отдельных доменов митохондриального белка пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Abf2p, участвующего в процессах гомологичной рекомбинации и репарации. Выявлено, что домен HMG1 неспецифично и слабо связывает линейную ДНК и при этом специфично взаимодействует с разветвленной структурой ДНК с константой диссоциации комплекса 510 нМ. Домен HMG2 сам по себе не обладает способностью связываться с ДНК и, вероятно, предназначен для осуществления других функций либо же проявляет ДНК-связывающую активность в составе полноразмерного белка.

Ключевые слова: митохондрия, митохондриальный геном, Abf2p, рекомбинация

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-31554 мол_а).

✉ **Для корреспонденции:** Петр Андреевич Каменский
119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; piotr.kamenski@gmail.com

Статья поступила: 29.09.2015 Принята к печати: 09.12.2015

TWO HMG DOMAINS OF YEAST MITOCHONDRIAL PROTEIN ABF2P HAVE DIFFERENT AFFINITY TO DNA

Kurashenko AV¹, SamoiloVA EO¹, Baleva MV¹, Chicherin IV¹, Petrov DY², Kamenski PA¹✉, Levitskii SA¹

¹ Faculty of Biology, Department of Molecular Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

² Faculty of Fundamental Medicine, Department of General Surgery, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Maintaining mitochondrial genome integrity is essential for the viability of the whole organism. Mitochondrial genome mutations lead to muscular dystrophies, neurodegenerative diseases, and are associated with aging. In this work a baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) mitochondria model was used to investigate DNA-binding abilities of different domains of a mitochondrial Abf2p protein which participates in homologous recombination and reparation. A weak non-specific HMG1 binding to linear DNA and a specific HMG1 binding to a branched DNA with a dissociation constant of 510 nM have been discovered. The HMG2 domain itself does not bind to any DNA and either has other functions or demonstrates its DNA-binding activity in a full-length protein only.

Keywords: mitochondria, mitochondrial genome, Abf2p, recombination

Funding: this study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 14-04-31554 mol_a).

✉ **Correspondence should be addressed:** Petr Kamenski
Leninskie gory, d. 1, str. 12, Moscow, Russia, 119991; piotr.kamenski@gmail.com

Received: 29.09.2015 Accepted: 09.12.2015

Митохондрии — это внутриклеточные органеллы, играющие ключевую роль в обеспечении большинства эукариотических клеток энергией за счет синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Большую часть соединений, необходимых митохондриям для функционирования, они получают из цитоплазмы, однако обладают собственным аппаратом хранения и передачи генетической информации, а именно — своей ДНК и системой биосинтеза белка.

Митохондриальная ДНК (мтДНК) представлена, как правило, кольцевой замкнутой молекулой ДНК, кодирующей митохондриальные рРНК, митохондриальные тРНК и белки, участвующие в окислительном фосфорилировании.

В силу повышенной частоты повреждений мтДНК по сравнению с ядерной ДНК [1], что обусловлено высокой концентрацией активных форм кислорода в митохондриях, большое значение в поддержании нормального функ-

ционирования этих органелл имеет система репарации митохондриального генома. Одним из наиболее важных путей репарации двунитевых разрывов как ядерной, так и мтДНК является гомологичная рекомбинация. Действительно, процессы митохондриальной гомологичной рекомбинации обнаружены практически у всех основных групп эукариотических организмов (растений [2], грибов [3] и беспозвоночных [4]). Предполагается, что механизмы рекомбинации ДНК в ядре и митохондриях в целом аналогичны [5]. Особенно актуальным изучение гомологичной рекомбинации в митохондриальном геноме стало после получения доказательств существования этого процесса у млекопитающих [5] и связи накопления опосредованных рекомбинацией делеций с развитием ряда заболеваний человека (мышечных дистрофий, нейродегенеративных заболеваний), старением и процессами онкогенеза [6].

Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются чрезвычайно удобным объектом для исследования процессов, проходящих в митохондриях. У данного организма они имеют значительное функциональное сходство с человеческими, при этом дрожжи могут осуществлять жизнедеятельность в отсутствие функционально полноценных митохондрий, что позволяет делетировать гены тех или иных митохондриальных белков и изучать фенотипические проявления подобных мутаций. Митохондриальный геном *S. cerevisiae* представляет собой организованную в пространстве структуру, называемую нуклеоидом, содержащую до 10 копий мтДНК, которые взаимодействуют с различными белками. Митохондриальная ДНК в составе нуклеоида имеет трехмерную организацию, тесно связанную с механизмами репликации, транскрипции и наследования. Укладка в нуклеоид также защищает ДНК от атаки активных форм кислорода, появляющихся в ходе окислительного фосфорилирования [7].

Одним из наиболее широко представленных белков, взаимодействующих с мтДНК в нуклеоидах митохондрий дрожжей, является Abf2p. Впервые в чистом виде он был получен в 1979 г. [8], а наименование Abf2p было присвоено ему в 1991 г. [9]. Этот белок содержит в своем составе два домена — HMG1 (High-Mobility Group 1) и HMG2 (High-Mobility Group 2) — и на сегодняшний день исследован наиболее полно среди прочих белков митохондриального нуклеоида дрожжей.

Abf2p — это уникальный белок с самой высокой основностью среди белков нуклеоида [10]. Он генерирует негативную суперспирализацию ДНК при контакте с кольцевой плазмидой в присутствии топоизомеразы 1 [10]. Дрожжи, мутантные по Abf2p, способны поддерживать мтДНК при росте на среде YPG, содержащей глицерин в качестве источника углерода. Однако при культивировании на средах со сбраживаемыми источниками углерода, например глюкозой, происходит постепенная потеря мтДНК [10]. Доказано также, что при мутации по гену Abf2p значительно снижается количество актов рекомбинации в митохондриях при спаривании со штаммом дикого типа [11]. Кроме того, Abf2p обеспечивает стабилизацию интермедиатов образования структуры Холлидея, что также указывает на важность этого белка в рекомбинации [12].

Несмотря на большое число работ, посвященных исследованию Abf2p, молекулярные механизмы его участия в процессах рекомбинации мтДНК остаются неизученными. Наличие в составе митохондриального ДНК-связывающего белка Abf2p двух HMG-доменов характерно для большинства белков семейства HMGb: известно, что они связываются с малой бороздкой ДНК с ограниченной

специфичностью или же полностью неспецифично [13]. Кроме того, предполагается, что HMG-домены, входящие в состав таких белков, связывают ДНК независимо друг от друга с близкой эффективностью [13]. Однако, по всей видимости, митохондриальные HMG-белки обладают значительно более широкой функциональностью, чем их ядерные гомологи. Так, митохондриальный ДНК-связывающий белок человека, TFAM, помимо функции компактизации нуклеоида, является транскрипционным фактором и, вероятно, участвует в процессах рекомбинации и репарации мтДНК [14]. Своей многофункциональностью, а также характеристиками связывания с ДНК TFAM сходен с бактериальными HU-белками [14]. Предполагается, что Abf2p также обладает мультифункциональными свойствами, поскольку является структурным аналогом TFAM в митохондриях дрожжей.

В данной работе мы получили рекомбинантные белки, соответствующие двум доменам Abf2p — HMG1 и HMG2, и изучили ДНК-связывающую способность этих доменов по отношению к линейному ДНК-дуплексу и структуре, имитирующей поздний интермедиат гомологичной рекомбинации — структуру Холлидея.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование и экспрессия генов

Участки гена *ABF2*, соответствующие доменам HMG1 (аминокислотные остатки 27–115) и HMG2 (аминокислотные остатки 112–183), амплифицировали с помощью пар праймеров abfhmg1F (GATACATATGGGTCCTAAAAGGCCACATC) / abfhmg1R (CGTCCTCGAGAGGAAGTTTTTCGTCAACTCC) и abfhmg2F (GGCGCATATGGAGTTTGACGAAAACTTCC) / abfhmg2R (GAGGCTCGAGAGCATATTATCTTGGATAGC) соответственно. В качестве матрицы использовали геномную ДНК дрожжей штамма BW303. Полученные продукты амплификации обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, США) и клонировали в составе экспрессионного вектора pET32a (Novagen, США). Таким способом были получены векторы pET32a_HMG1 и pET32a_HMG2. Соответствие клонированных последовательностей референсным подтверждали секвенированием по Сэнгеру в лаборатории постгеномных технологий НИИ физико-химической медицины ФМБА России. Полученными плазмидами трансформировали экспрессионный штамм *Escherichia coli* B834(DE3), отдельные колонии трансформантов переносили в жидкую среду 2xYT с 100 мкг/мл карбенициллина, культивировали при температуре 37 °C при интенсивном перемешивании до OD₆₀₀ ~ 0,6–0,8, после чего индуцировали экспрессию клонированных генов добавлением изопропил-β, D-галактопиранозида (IPTG) до концентрации 0,25 мМ, продолжали культивирование при температуре 30 °C в течение 3 ч. После этого клетки собирали центрифугированием (3000 g, 10 мин) и ресуспендировали в стартовом буфере (25 мМ Na-фосфатный буфер с pH 7,4; 500 мМ NaCl; 20 мМ имидазола). Ресуспендированные клетки разрушали ультразвуком в режиме 4 импульсов по 15 сек каждый при амплитуде 20 %, полученные клеточные лизаты центрифугировали при 17 000 g в течение 20 мин. Супернатанты, содержащие рекомбинантные белки, собирали и проводили дальнейшую очистку целевого продукта с помощью металл-хелатирующей хроматографии на колонке HisTrap объемом 1 мл, заполненной Ni-NTA сефарозой

(GE Healthcare, США), с применением системы высокоэффективной хроматографии белков АКТА Purifier (GE Healthcare, США) согласно рекомендациям производителя. За элюцией целевых белков следили по поглощению при длине волны 280 нм. Фракцию с целевым белком сразу переводили в буфер для хранения (25 мМ Трис-НСl pH 7,4; 150 мМ NaCl; 5 мМ ЭДТА) с использованием колонки HiTrap Desalting объемом 5 мл, содержавшей сефадекс G-25. За эффективным переводом белка в буфер для хранения следили по соотношению пиков поглощения при длине волны 280 нм и проводимости раствора.

Концентрацию белков определяли по поглощению при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoPhotometr (Implen, Германия) по известным коэффициентам молярной экстинкции (12090 М⁻¹ × см⁻¹ для обоих белков) и с учетом точных молекулярных масс: 12632,39 Да для НМГ1 и 10177,58 Да для НМГ2.

Сборка структур ДНК

Использованные в работе структуры (ДНК-дуплекс и структура Холлидея) были собраны из олигонуклеотидов x-FAM (FAM-AGTCTAGACTGCAGTTGAGTCCCTTGCTAGGACGGATCCCT), x-com (AGGGATCCGTCCTAGCAAGGACTCAA CTGCAGTCTAGACT), b (AGGGATCCGTCCTAGCAAGGGGC TGCTACCGGAAGCTTCT), r (AGGAATTCAACCACCGCTCAA CTCAACTGCAGTCTAGACT), h (AGAAGCTTCCGGTAGCAGC CTGAGCGGTGGTTGAATTCCT), аналогичных таковым в исследовании D. R. Duckett и D. M. Lilley [15]. Линейную двуцепочечную ДНК собирали из олигонуклеотидов x-FAM и x-com, структуру Холлидея — из олигонуклеотидов x-FAM, b, r, h. Сборку проводили следующим образом. К 20 мкл двукратного буфера (25 мМ Трис-НСl pH 7,5; 150 мМ NaCl) добавляли по 5 мкл 1 мкМ раствора меченого олигонуклеотида (x-FAM) и по 5 мкл 2 мкМ растворов остальных олигонуклеотидов, при необходимости доводя объем реакционной смеси до 40 мкл деионизованной водой. Реакционные смеси нагревали на водяной бане до температуры 95 °С, после чего пассивно охлаждали в течение 3 ч до 25 °С.

Метод задержки в геле

Каждая из реакционных смесей состояла из 2 мкл 5-кратного EMSA-буфера (100 мМ Трис-НСl pH 8,0; 1 М NaCl; 1 мг/мл BSA; 35 % глицерин), 1 мкл 100 нМ раствора ДНК-структуры и различных концентраций рекомбинантного белка. Общий объем каждой реакционной смеси составлял 10 мкл и при необходимости доводился до конечного с помощью деионизованной воды.

Реакционные смеси инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. После этого их наносили на 6 % полиакриламидный гель (20 × 20 см), приготовленный на буфере TBE (90 мМ Трис-борат, 2 мМ ЭДТА). Гель до нанесения образцов подвергался предварительному электрофорезу при 400 В в течение 40 мин при активном охлаждении до температуры 10 °С. Электрофоретическое разделение образцов проводили в течение 120 мин при тех же условиях. После прохождения электрофореза гель сканировали с помощью сканера Storm 860 (GE Healthcare, США) в режиме флуоресценции с возбуждением в синем канале. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ, определяя для каждой дорожки площадь и интенсивность флуорес-

ценции полос свободной и связанной ДНК. По соотношению интегральных значений интенсивности флуоресценции полосы к сумме площадей полос в треке подсчитывали концентрации свободной и связанной ДНК. Константы диссоциации вычисляли по формуле:

$$K_D = [Df] \times [P_0 - Db] / [Db],$$

где [Df] — концентрация свободной ДНК, [Db] — концентрация связанной ДНК, [P₀] — концентрация белка. Все концентрации выражались в нМ. Для каждой пары ДНК / рекомбинантный белок проводили не менее трех независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение рекомбинантных белков

Для того чтобы выяснить, какую роль играет каждый из НМГ-доменов митохондриального белка Abf2p в осуществлении его функций, мы получили рекомбинантные белки, соответствующие обоим доменам. После выделения и очистки этих белков степень их чистоты оценивали с помощью денатурирующего электрофореза (рис. 1). Полученные препараты белков обладали достаточной степенью чистоты для проведения дальнейших исследований. Выход рекомбинантных белков составил 8 мг/л культуры для НМГ1 и 4,2 мг/л культуры для НМГ2.

Анализ взаимодействия отдельных НМГ-доменов с линейной и крестообразной ДНК

Как уже было отмечено, в настоящее время считается, что НМГ-домены белков семейства НМГВ связывают ДНК независимо друг от друга с близкой эффективностью. Для того чтобы проверить, верно ли это в отношении Abf2p, мы провели анализ связывания линейного дуплекса ДНК длиной 40 пар оснований (п. о.) и синтетической крестообразной структуры, имитирующей структуру Холлидея,

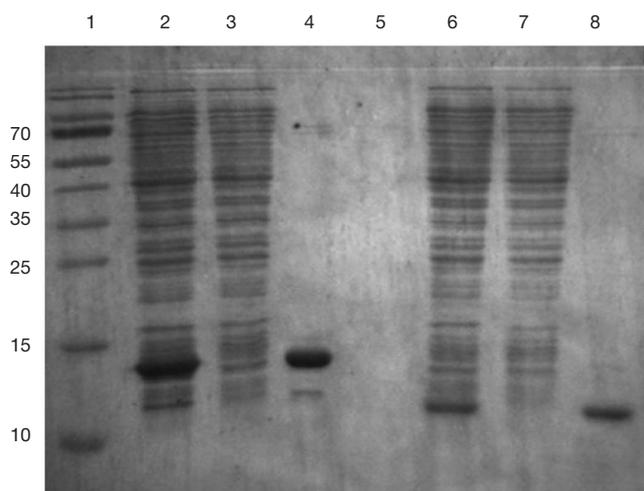


Рис. 1. Выделение и очистка рекомбинантных белков, соответствующих доменам НМГ1 и НМГ2 белка Abf2p

Очистку рекомбинантных белков проводили методом металл-аффинной хроматографии на никель-сефарозе. 1 — маркеры молекулярных масс (слева приведены молекулярные массы маркерных белков); 2, 6 — лизаты разрушенных клеток; 3, 7 — фракции, не связавшиеся с аффинной колонкой; 4, 8 — очищенные препараты рекомбинантных белков НМГ1 и НМГ2 соответственно.

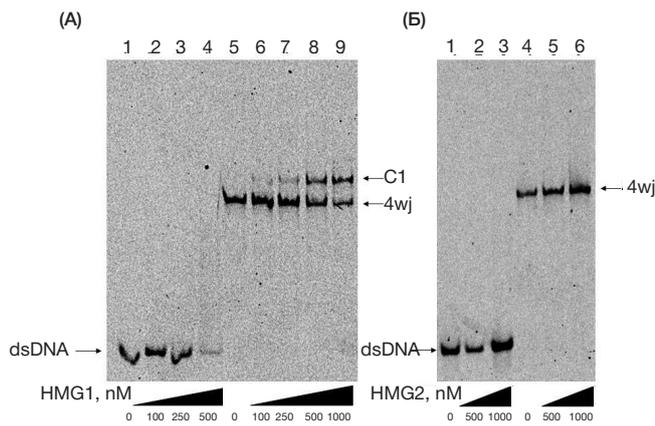


Рис. 2. Анализ связывания рекомбинантных белков, соответствующих доменам HMG1 и HMG2, с ДНК методом задержки в геле

Линейный ДНК-дуплекс (double-stranded DNA — dsDNA) и крестообразную ДНК (4-way junction — 4wj) в концентрации 10 нМ инкубировали с возрастающими концентрациями рекомбинантных белков, после чего реакционные смеси разделяли в 6% полиакриламидном геле. **(А)** Связывание с ДНК домена HMG1; 1–4 — взаимодействие с ДНК-дуплексом, 5–9 — связывание с крестообразной ДНК; С1 — образующийся комплекс. **(Б)** Связывание с ДНК домена HMG2; 1–3 — взаимодействие с ДНК-дуплексом, 4–6 — связывание с крестообразной ДНК. В нижней части рисунка приведены использованные концентрации рекомбинантных белков, нМ.

с полученными рекомбинантными белками методом задержки в геле.

Домен HMG1 в использованных нами условиях практически не взаимодействовал с линейной ДНК (рис. 2А). Лишь при высокой концентрации белка (500 нМ) наблюдалось снижение интенсивности полосы, соответствующей свободной ДНК, однако образования комплекса (который был бы виден как четкая полоса в верхней части геля) не происходило. Исходя из этого, можно заключить, что HMG1 слабо и неспецифично взаимодействует с линейной ДНК, при этом он эффективно связывал крестообразную структуру, комплексы ДНК / белок выявлялись даже при концентрации белка 100 нМ (рис. 2А, С1). По данным трех независимых экспериментов мы вычислили кажущуюся константу диссоциации комплекса HMG1 с крестообразной ДНК, равную $510 \pm 11,78$ нМ. В то же время домен HMG2 не образовывал комплексов ни с линейным дуплексом ДНК, ни с крестообразной структурой. Даже при концентрациях рекомбинантного белка 1 мкМ снижения интенсивности полосы, соответствующей свободной ДНК, не наблюдалось (рис. 2Б).

Согласно различным литературным источникам полноразмерный белок Abf2p образует комплекс с линейной ДНК с константой от 40 до 150 нМ, т. е. значительно меньшей, чем домен HMG1 [11, 15]. Мы предположили, что повышенное сродство полноразмерного белка к ДНК относительно домена HMG1 обусловлено взаимодействием обоих

доменов. Для того чтобы проверить справедливость этого предположения, мы провели эксперимент по задержке ДНК в геле после ее инкубации со смесью двух рекомбинантных белков. В результате выяснилось, что добавление домена HMG2 не влияет на характеристики связывания ДНК доменом HMG1 (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходя из полученных данных, можно заключить следующее. Домен HMG1 вносит основной вклад в осуществление ДНК-связывающей активности белка Abf2p. При этом домен HMG2 прямой ДНК-связывающей активностью в условиях *in vitro* не обладает, однако он важен для осуществления этой функции полноразмерным белком, поскольку константа диссоциации комплекса HMG1 / линейная ДНК, согласно нашим результатам, превышает 1 мкМ, а константа диссоциации аналогичного комплекса с Abf2p ниже на 1–2 порядка. Следует подчеркнуть, что HMG1 способен аналогично полноразмерному белку специфично связывать крестообразную структуру ДНК. Эта особенность характерна для многих HMGВ-белков, участвующих в процессах поддержания целостности ДНК, а именно — в репарации путем рекомбинации [14]. В литературе имеются сведения о том, что Abf2p важен для осуществления гомологичной рекомбинации митохондриальной ДНК дрожжей, и, по всей видимости, непосредственно специфичность связывания полноразмерного белка реализуется за счет HMG1 [11, 12]. Роль домена HMG2 в реализации разнообразных функций Abf2p менее очевидна. Как показывают наши данные, сам по себе HMG2 не связывается ни с линейной, ни с разветвленной ДНК в выбранных условиях эксперимента, что достаточно необычно для HMG-домена. Тем не менее, опираясь на полученные результаты, нельзя однозначно утверждать, что HMG2 в составе полноразмерного белка не будет проявлять ДНК-связывающую активность. По всей видимости, помимо усиления ДНК-связывающих свойств HMG1 второй домен может участвовать в реализации взаимодействия Abf2p с другими белками, например в привлечении ферментов, необходимых для репарации и рекомбинации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования удалось установить, что домен HMG1 митохондриального белка дрожжей Abf2p неспецифично и слабо связывает линейную ДНК, при этом образуя специфичный комплекс с крестообразной ДНК с константой диссоциации 510 нМ. Домен HMG2 сам по себе не обладает способностью связывать с ДНК *in vitro*.

Литература

1. Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76 (4): 1967–71.
2. Arrieta-Montiel MP, Shedge V, Davila J, Christensen AC, Mackenzie SA. Diversity of the Arabidopsis mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity. *Genetics*. 2009; 183: 1261–8.
3. Dujon B, Slonimski PP, Weill L. Mitochondrial genetics IX: a model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1974; 78: 415.
4. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science*. 1999; 283: 1476–81.
5. Chen XJ. Mechanism of homologous recombination and implications for aging-related deletions in mitochondrial DNA. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013; 77: 476–96.
6. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012; 13: 878–90.
7. Kauppila JH, Stewart JB. Mitochondrial DNA: radically free of free-radical driven mutations. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1847 (11): 1354–61.
8. Caron F, Jacq C, Rouvireaniv J. Characterization of a histonelike protein extracted from yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4265–9.
9. Diffley JFX, Stillman B. A close relative of the nuclear, chromosomal highmobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7864–8.
10. Friddle RW, Klare JE, Martin SS, Corzett M, Balhorn R, Baldwin EP et al. Mechanism of DNA compaction by yeast mitochondrial protein Abf2p. *Biophys J*. 2004; 86 (3): 1632–9.
11. Zelenaya-Troitskaya O, Newman SM, Okamoto K, Perlman PS, Butow RA. Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998; 148 (4): 1763–76.
12. MacAlpine DM, Perlman PS, Butow RA. The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6739–43.
13. Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26: 167.
14. Ngo HB, Kaiser JT, Chan DC. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2011; 18: 1290–6.
15. Duckett DR, Lilley DM. The three-way DNA junction is a Y-shaped molecule in which there is no helix-helix stacking. *EMBO J*. 1990; 9 (5): 1659–64.

References

1. Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76 (4): 1967–71.
2. Arrieta-Montiel MP, Shedge V, Davila J, Christensen AC, Mackenzie SA. Diversity of the Arabidopsis mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity. *Genetics*. 2009; 183: 1261–8.
3. Dujon B, Slonimski PP, Weill L. Mitochondrial genetics IX: a model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1974; 78: 415.
4. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science*. 1999; 283: 1476–81.
5. Chen XJ. Mechanism of homologous recombination and implications for aging-related deletions in mitochondrial DNA. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013; 77: 476–96.
6. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012; 13: 878–90.
7. Kauppila JH, Stewart JB. Mitochondrial DNA: radically free of free-radical driven mutations. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1847 (11): 1354–61.
8. Caron F, Jacq C, Rouvireaniv J. Characterization of a histonelike protein extracted from yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4265–9.
9. Diffley JFX, Stillman B. A close relative of the nuclear, chromosomal highmobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7864–8.
10. Friddle RW, Klare JE, Martin SS, Corzett M, Balhorn R, Baldwin EP et al. Mechanism of DNA compaction by yeast mitochondrial protein Abf2p. *Biophys J*. 2004; 86 (3): 1632–9.
11. Zelenaya-Troitskaya O, Newman SM, Okamoto K, Perlman PS, Butow RA. Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998; 148 (4): 1763–76.
12. MacAlpine DM, Perlman PS, Butow RA. The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6739–43.
13. Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26: 167.
14. Ngo HB, Kaiser JT, Chan DC. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2011; 18: 1290–6.
15. Duckett DR, Lilley DM. The three-way DNA junction is a Y-shaped molecule in which there is no helix-helix stacking. *EMBO J*. 1990; 9 (5): 1659–64.