

УДК 577.29

ИМПОРТ РНК В МИТОХОНДРИИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

**В.А. Лакунина, М.В. Балева, С.А. Левицкий, И.В. Чичерин,
И.А. Крашенинников, Е.О. Самойлова, П.А. Каменский**

(кафедра молекулярной биологии; e-mail: piotr.kamenski@gmail.com)

К биологическим макромолекулам, импортирующимся в митохондрии эукариотических клеток из цитозоля, относятся белки и рибонуклеиновые кислоты. Импорт белков в митохондрии — универсальный процесс, и его механизмы описаны в достаточной степени подробно. Импорт РНК в митохондрии, напротив, показан только для некоторых групп организмов, и в каждом случае механизмы данного процесса обладают большим количеством индивидуальных особенностей. В данном обзоре рассматриваются современные данные о процессе импорта РНК в митохондрии клеток человека и обсуждается возможность использования данного процесса в генной терапии митохондриальных болезней.

Ключевые слова: митохондрии, РНК, импорт РНК в митохондрии, генная терапия, обзор.

Митохондрии — универсальные органеллы эукариотической клетки, обеспечивающие ее энергией и выполняющие множество других важнейших функций. В соответствии с господствующей в настоящее время эндосимбиотической гипотезой митохондрии сформировались из свободноживущих бактерий, в свое время захваченных клеткой-хозяином. В процессе эволюции геном органелл значительно редуцировался — большое количество митохондриальных генов каким-то образом перенеслись в ядро. Тем не менее в митохондриях имеют место все основные молекулярно-биологические процессы. Те макромолекулы, которые необходимы для нормального протекания данных процессов, но не закодированы в геноме органелл, импортируются в митохондрии из цитозоля. К числу таких макромолекул относятся белки и РНК.

В настоящей работе мы сфокусируемся на процессах импорта РНК из цитозоля. В отличие от импорта белков, который имеет место у всех эукариотических организмов, импорт РНК экспериментально показан только для нескольких групп эукариот. Почти все импортируемые РНК — это тРНК, необходимые для митохондриальной трансляции в связи с отсутствием их генов в митохондриальном геноме. Только для млекопитающих был показан импорт некоторых других малых РНК. При этом у разных организмов в митохондрии импортируется разный набор РНК, причем по разным механизмам [1].

Человек (как и другие млекопитающие) стоит особняком в ряду организмов, для которых показан импорт РНК в митохондрии. Дело в том, что во всех остальных случаях в митохондрии импортируются тРНК, необходимые для процессов митохондриальной трансляции, обычно это связано с наличием неполного набора генов тРНК в мито-

хондриальном геноме. В митохондрии же млекопитающих в естественных условиях тРНК не импортируются; вместо них в органеллы могут проникать три других вида РНК. Первые два вида РНК — это РНК-компонент РНКазы MRP, расщепляющей РНК-затравки при репликации митохондриальной ДНК [2, 3], а также РНК-компонент РНКазы Р, участвующей в 5'-концевом процессинге предшественников митохондриальных тРНК [4]. Долгое время механизм импорта данных РНК оставался неизученным, пока в 2010 г. не была опубликована работа, в которой в качестве основного участника данного процесса не была идентифицирована митохондриальная полинуклеотидфосфорилаза (ПНФаза) [5]. Эта 3'-5'-экзорибонуклеаза осуществляет процессинг митохондриальных транскриптов [6]. Она локализована в межмембранном пространстве [5], что само по себе является странным, поскольку субстраты ее ферментативной активности располагаются в матриксе митохондрий. Процесс импорта ПНФазы в митохондрии протекает по несколько нестандартному пути: после пересечения внешней мембраны (посредством ТОМ-комплекса) и связывания с компонентами TIM23-комплекса происходит экспонирование ее MTS в матрикс, где та отрезается канонической протеазой MPP, а затем в дело вступает протеаза внутренней мембраны Yme1, которая каким-то образом опосредует высвобождение зрелой части ПНФазы из комплекса с TIM23-белками и ее выход в межмембранное пространство [7]. Было показано, что ПНФаза является критически важным участником процесса импорта РНК-компонентов РНКаз Р и MRP, а также 5S рРНК (см. ниже) [5]. Любопытно, что при экспрессии гена ПНФазы в клетках дрожжей (которые в норме такого фермента не содержат) все вышеперечис-

ленные РНК, которые в норме опять же не импортируются в дрожжевые митохондрии, начинали подвергаться импорту [5]. В этих РНК была идентифицирована структура типа “стебель—петля”, которая, по всей видимости, определяет возможность их связывания с ПНФазой и импорта в митохондрии. При добавлении нуклеотидной последовательности, формирующей данную структуру, к последовательностям различных неимпортируемых тРНК и мРНК получаемые гибридные молекулы РНК начинали импортироваться в митохондрии клеток человека [8].

Третий тип РНК, импортирующейся в митохондрии млекопитающих, — это 5S рРНК [9, 10]. Эта РНК обычно является структурной составляющей большой рибосомной субъединицы. Она состоит из трех четко выделенных доменов; общая длина молекулы составляет около 120 нуклеотидов [11]. Было показано, что элементы, важные для импорта в митохондрии, располагаются лишь в двух из этих доменов; при этом любые мутации (и даже большие вставки) в третьем домене никак не влияли на эффективность импорта [12]. В разработанной для изучения механизмов импорта 5S рРНК системе *in vitro* было показано, что данный процесс зависит от АТФ и мембранного потенциала митохондрий, а также требует присутствия растворимых цитозольных белков [13]. Впоследствии была реконструирована минимальная система импорта 5S рРНК в изолированные митохондрии клеток человека, состоящая из двух таких белков — митохондриальной тиосульфатсульфотрансферазы, или роданезы [14], и предшественника митохондриального рибосомного белка L18 [15]. Функциональные эксперименты позволили установить цепочку событий, происходящих с 5S рРНК до ее проникновения через митохондриальные мембраны. Транспортируясь из ядра в цитозоль после транскрипции, 5S рРНК почти сразу же связывается с рибосомным белком L5 и встраивается в состав вновь собираемых цитозольных рибосом [11]. Однако небольшая часть молекул 5S рРНК вместо этого может связываться с предшественником митохондриального рибосомного белка L18. Далее такая 5S рРНК передается на роданезу, причем формирование данного комплекса происходит котрансляционно (т.е. комплекс с роданезой образуется непосредственно в процессе рибосомного синтеза последней). Роданеза в данном комплексе ферментативно неактивна; структура 5S рРНК в этом комплексе также отличается от канонической [14, 15]. После этого 5S рРНК импортируется в митохондрии; данный процесс, как уже упоминалось выше, зависит от фермента межмембранного пространства ПНПазы [5]. Таким образом, импорт 5S рРНК в митохондрии клеток человека в части событий, происходящих с РНК в цитозоле, напоминает аналогичные процессы в ходе импорта тРНК в митохондрии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*:

в данном случае также имеет место последовательное связывание РНК с двумя цитозольными белковыми факторами, непосредственно предшествующее импорту [16, 17].

Абсолютно неясным остается вопрос о функции 5S рРНК в матриксе митохондрий. Как только стало ясно, что данная молекула присутствует в митохондриях, было высказано предположение о том, что она входит в состав митохондриальных рибосом и принимает, таким образом, участие в биосинтезе белка в органеллах. Тому были получены косвенные подтверждения. Во-первых, количество молекул 5S рРНК в митохондриях чрезвычайно близко к количеству митохондриальных рибосом [13]. Во-вторых, подавление экспрессии гена роданезы методом РНК-интерференции приводило к значительному уменьшению количества 5S рРНК в митохондриях и одновременно к пропорциональному ослаблению митохондриальной трансляции [14]. В-третьих, методом коиммунопреципитации было показано, что 5S рРНК ассоциирована с митохондриальными рибосомами [15]. Однако структурные исследования, проведенные методом криоэлектронной микроскопии [18, 19], показали, что в том участке, где должна присутствовать 5S рРНК, в митохондриальных рибосомах млекопитающих находится та или иная митохондриальная тРНК. Тем не менее это не является окончательным ответом на вопрос о присутствии 5S рРНК в составе митохондриальных рибосом. Возможна ситуация, когда тРНК связывается с ними для предотвращения ассоциации субъединиц в целую рибосому, а в составе полноразмерных функциональных рибосом присутствует именно 5S рРНК. К сожалению, в настоящее время проверить эту гипотезу представляется затруднительным, поскольку для этого требуется система митохондриальной трансляции *in vitro*, которая, несмотря на все усилия исследователей, так и не была разработана — никакими методами не удавалось выделить из митохондрий рибосомы, которые были бы активны в отношении природных митохондриальных мРНК.

Несмотря на то что *in vivo* тРНК в митохондриях млекопитающих не проникают, было показано, что импортируемая дрожжевая тРНК проникает в изолированные митохондрии клеток человека, причем этот процесс может обеспечиваться как дрожжевым, так и человеческим клеточным белковым экстрактом [13]. Таким образом, в клетках человека содержатся все необходимые для импорта тРНК факторы, а тот факт, что человеческие тРНК не импортируются в митохондрии, объясняется значительным отличием их структур от структуры импортируемой дрожжевой тРНК. Это подтверждается тем, что человеческие белки — ортологи дрожжевых факторов импорта тРНК в митохондрии — участвуют в направлении дрожжевой тРНК в митохондрии клеток человека [20].

Интересно, что помимо импортируемой дрожжевой тРНК в митохондриях человека импортируются также ее мутантные версии и некоторые другие дрожжевые тРНК [13]. Экспрессируясь в клетках человека, эти тРНК эффективно аминоацилируются лизином и проникают в митохондрии [21]. Более того, при помощи такого “искусственного” импорта удалось достигнуть существенного прогресса в разработке генно-терапевтических подходов к лечению так называемых митохондриальных болезней. Мутации в митохондриальном геноме человека встречаются с достаточно высокой частотой (около 1:250 в общечеловеческой популяции) и часто приводят к развитию тяжелых наследственных заболеваний (обычно — различных типов нейромускулярных дистрофий) [22]. Больше половины описанных на сегодняшний день патогенных митохондриальных мутаций — это точечные мутации в генах митохондриальных тРНК. Используя импорт производных дрожжевых тРНК в митохондрии мутантных клеток человека в культуре, удалось достичь супрессии мутаций в генах лизиновой [21, 23] и лейциновой [24] тРНК (двух самых распространенных мутаций в митохондриальном геноме). Импортируемые тРНК включались в митохондриальную трансляцию вместо мутантных молекул, что приводило к нормализации данного процесса и как следствие — к общему восстановлению митохондриальной функции мутантных клеток и к исчезновению мутантного фенотипа.

Далеко не все мутации в митохондриальном геноме патогенны. Дело в том, что факт фенотипического проявления таких мутаций зависит от количественного соотношения нормальных и мутантных копий митохондриальной ДНК в клетке. При этом в большинстве случаев доля мутантных молекул (называемая также гетероплазмией) не превышает нескольких процентов, а соответствующие симптомы проявляются у пациентов начиная с уровня гетероплазмии 65—70%. Таким образом, направленный сдвиг уровня гетероплазмии в сторону уменьшения доли мутантных молекул мог бы привести к исчезновению симптомов заболеваний. Модуляция уровня гетероплазмии в мутантных клетках человека также возможна при помощи процессов импорта РНК в митохондрии. Фундаментальные основы этого подхода были заложены в 2010 г., когда при помощи метода *in vitro* селекции на основе дрожжевой импортируемой тРНК были созданы молекулы РНК, обладающие чрезвычайно высокой эффективностью импорта в митохондрии (в сотни раз выше, чем импортируемая дрожжевая тРНК) [25]. Затем было показано, что такие РНК импортируются и в митохондрии клеток человека, причем также с очень высокой эффективностью. Был идентифицирован структурный элемент таких молекул (особая шпилька), который определяет высокую эффективность импорта

в митохондрии. Наконец, удалось показать, что другие части молекул РНК, помимо этой шпильки, не оказывают существенного влияния на эффективность процесса транспорта в митохондрии [25]. Таким образом, подобные молекулы РНК можно использовать в качестве “векторов” для направленной доставки нуклеиновых кислот в митохондрии. Данный подход был впервые апробирован на клетках человека, чей митохондриальный геном содержит протяженную делецию (около трети всего генома митохондрий). В результате данной делеции в молекулах митохондриальной ДНК появляется уникальный участок, которого нет в немутантных молекулах. Была сконструирована химерная РНК, содержащая вышеописанный сигнал высокоэффективного импорта в митохондрии и слитую с ней последовательность нуклеотидов, комплементарную уникальному участку мутантной митохондриальной ДНК. Дальнейшие исследования показали, что такая РНК после трансфекции эффективно импортируется в митохондрии и избирательно связывается именно с мутантными молекулами митохондриального генома. Это приводит к ингибированию их репликации и уменьшению уровня гетероплазмии [26]. Как следствие — восстанавливается нормальный фенотип.

Как это ни удивительно, подобный “антигеномный” подход к супрессии мутаций в митохондриальном геноме применим не только для протяженных делеций, но и для точечных мутаций. Было со всей определенностью показано, что при правильно подобранной структуре “терапевтического” участка импортируемой РНК после ее импорта в митохондрии происходит селективное связывание именно с мутантными молекулами ДНК оргanelл (хотя в данном случае эти молекулы отличались от немутантных всего одним нуклеотидом). Такое связывание также приводит к ингибированию репликации мутантных ДНК и к уменьшению их доли относительно общего количества молекул митохондриального генома [27].

Таким образом, за последние годы исследователями достигнут значительный прогресс в разработке методов лечения наследственных болезней человека, связанных с мутациями в митохондриальном геноме. Тем не менее дальнейшие работы в этом направлении необходимы, так как существующие способы характеризуются рядом существенных недостатков, прежде всего отсутствием универсальности.

* * *

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Федеральная целевая программа “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 годы”, соглашение № 14.604.21.0113, идентификатор RFMEFI60414X0113).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schneider A.* Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. Vol. 80. P. 1033–1053.
2. *Chang D.D., Clayton D.A.* A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA // *Science.* 1987. Vol. 235. N 4793. P. 1178–1184.
3. *Li K., Smagula C.S., Parsons W.J., Richardson J.A., Gonzalez M., Hagler H.K., Williams R.S.* Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis // *J. Cell Biol.* 1994. Vol. 124. N 6. P. 871–882.
4. *Doersen C.J., Guerrier-Takada C., Altman S., Attardi G.* Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. N 10. P. 5942–5949.
5. *Wang G., Chen H.W., Oktay Y., Zhang J., Allen E.L., Smith G.M., Fan K.C., Hong J.S., French S.W., McCaffery J.M., Lightowlers R.N., Morse H.C. III, Koehler C.M., Teitell M.A.* PNPase regulates RNA import into mitochondria // *Cell.* 2010. Vol. 142. N 3. P. 456–467.
6. *Wang G., Shimada E., Koehler C.M., Teitell M.A.* PNPase and RNA trafficking into mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. Vol. 1819. N 9–10. P. 998–1007.
7. *Rainey R.N., Glavin J.D., Chen H.W., French S.W., Teitell M.A., Koehler C.M.* A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease Yme1: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space // *Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 26. N 22. P. 8488–8497.
8. *Wang G., Shimada E., Zhang J., Hong J.S., Smith G.M., Teitell M.A., Koehler C.M.* Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. N 13. P. 4840–4845.
9. *Yoshionari S., Koike T., Yokogawa T., Nishikawa K., Ueda T., Miura K., Watanabe K.* Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 338. N 2. P. 137–142.
10. *Magalhaes P.J., Andreu A.L., Schon E.A.* Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria // *Mol. Biol. Cell.* 1998. Vol. 9. N 9. P. 2375–2382.
11. *Smirnov A.V., Entelis N.S., Krashennikov I.A., Martin R., Tarassov I.A.* Specific features of 5S rRNA structure — its interactions with macromolecules and possible functions // *Biochemistry (Mosc.).* 2008. Vol. 73. N 13. P. 1418–1437.
12. *Smirnov A., Tarassov I., Mager-Heckel A.M., Letzelter M., Martin R.P., Krashennikov I.A., Entelis N.* Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria // *RNA.* 2008. Vol. 14. N 4. P. 749–759.
13. *Entelis N.S., Kolesnikova O.A., Dogan S., Martin R.P., Tarassov I.A.* 5S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 49. P. 45642–45653.
14. *Smirnov A., Comte C., Mager-Heckel A.M., Addis V., Krashennikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I.* Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5S ribosomal RNA import into human mitochondria // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. N 40. P. 30792–30803.
15. *Smirnov A., Entelis N., Martin R.P., Tarassov I.* Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18 // *Genes Dev.* 2011. Vol. 25. N 12. P. 1289–1305.
16. *Entelis N., Brandina I., Kamenski P., Krashennikov I.A., Martin R.P., Tarassov I.* A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20. N 12. P. 1609–1620.
17. *Kamenski P., Smirnova E., Kolesnikova O., Krashennikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I.* tRNA mitochondrial import in yeast: Mapping of the import determinants in the carrier protein, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase // *Mitochondrion.* 2010. Vol. 10. N 3. P. 284–293.
18. *Brown A., Amunts A., Bai X. C., Sugimoto Y., Edwards P.C., Murshudov G., Scheres S.H., Ramakrishnan V.* Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria // *Science.* 2014. Vol. 346. N 6210. P. 718–722.
19. *Greber B.J., Boehringer D., Leibundgut M., Bieri P., Leitner A., Schmitz N., Aebersold R., Ban N.* The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome // *Nature.* 2014. Vol. 515. N 7526. P. 283–286.
20. *Gowher A., Smirnov A., Tarassov I., Entelis N.* Induced tRNA import into human mitochondria: implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 6. P. e66228.
21. *Kolesnikova O.A., Entelis N.S., Jacquin-Becker C., Goltzene F., Chrzanowska-Lightowlers Z.M., Lightowlers R.N., Martin R.P., Tarassov I.* Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells // *Hum. Mol. Genet.* 2004. Vol. 13. N 20. P. 2519–2534.
22. *Patrushev M.V., Kamenski P.A., Mazunin I.O.* Mutations in mitochondrial DNA and approaches for their correction // *Biochemistry (Mosc.).* 2014. Vol. 79. N 11. P. 1151–1160.
23. *Kolesnikova O.A., Entelis N.S., Mireau H., Fox T.D., Martin R.P., Tarassov I.A.* Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm // *Science.* 2000. Vol. 289. N 5486. P. 1931–1933.
24. *Karicheva O.Z., Kolesnikova O.A., Schirtz T., Vysokikh M.Y., Mager-Heckel A.M., Lombes A., Boucheham A., Krashennikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I.* Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 18. P. 8173–8186.
25. *Kolesnikova O., Kazakova H., Comte C., Steinberg S., Kamenski P., Martin R.P., Tarassov I., Entelis N.* Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria // *RNA.* 2010. Vol. 16. N 5. P. 926–941.
26. *Comte C., Tonin Y., Heckel-Mager A.M., Boucheham A., Smirnov A., Aure K., Lombes A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I.* Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. N 1. P. 418–433.
27. *Tonin Y., Heckel A.M., Vysokikh M., Dovydenko I., Meschaninova M., Rotig A., Munnich A., Venyaminova A., Tarassov I., Entelis N.* Modeling of antigenomic

therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mi-

tochondrial DNA // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289. N 19. P. 13323—13334.

Поступила в редакцию
01.12.2014

RNA IMPORT INTO MITOCHONDRIA AND ITS USE IN THE GENE THERAPY

*V.A. Lakunina, M.V. Baleva, S.A. Levitskii, I.V. Chicherin, I.A. Krashennnikov,
E.O. Samoylova, P.A. Kamenski*

Among biological macromolecules imported into the eukaryotic cells mitochondria, there are proteins and ribonucleic acids. Protein import into mitochondria is a universal process, and its mechanisms are currently well described. RNA import into mitochondria, on the contrary, is known only for several eukaryotic species, and the mechanisms of this process are largely species-specific. In this review, we summarize existing data about RNA import into mitochondria of human cells and discuss the possibilities of its implication for the gene therapy of mitochondrial diseases.

Key words: *mitochondria, RNA, RNA import into mitochondria, gene therapy, review.*

Сведения об авторах

Лакунина Валентина Александровна — аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-85; e-mail: carrie8@yandex.ru

Балева Мария Вячеславовна — аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-85; e-mail: mary-bw@mail.ru

Левицкий Сергей Алексеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-85; e-mail: krolick@yandex.ru

Чичерин Иван Владимирович — аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-85; e-mail: i.v.chicherin@gmail.com

Крашенинников Игорь Александрович — канд биол. наук, проф. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-85; e-mail: igor@protrn.bio.msu.ru

Самойлова Елена Олеговна — мл. науч. сотр. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-85; e-mail: elen.samoylova@yandex.ru

Каменский Пётр Андреевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-85; e-mail: piotr.kamenski@gmail.com