

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ЗАКИРОВА ЭЛЬВИРА ГАМИЛОВНА

**Модификация системы CRISPR/Cas9 для направленной
элиминации мутантной митохондриальной ДНК**

1.5.22. – клеточная биология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Константин Евгеньевич Орищенко

Новосибирск 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

<u>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....</u>	<u>3</u>
<u>ВВЕДЕНИЕ.....</u>	<u>6</u>
<u>ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</u>	<u>12</u>
1.1 Особенности молекулярной биологии митохондрий	12
1.1.1 Пространственная организация и структура митохондриальной ДНК	12
1.1.2 Матричные процессы в митохондриях	15
1.1.3 Импорт макромолекул в митохондрии	24
1.2 Мутационная нагрузка и гетероплазмия митохондриального генома	30
1.3 Мутации мтДНК и митохондриальные заболевания	33
1.4 Терапевтические методы предотвращения передачи мутантных копий мтДНК в ряду поколений.....	38
1.4.1 Репродуктивные методы элиминации мутантных копий мтДНК	39
1.5 Генно-терапевтические подходы элиминации патогенных копий мтДНК.....	42
1.5.1 Анти-репликативные подходы.....	43
1.5.2 Анти-геномные подходы	45
1.6 Краткое заключение.....	50
<u>ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</u>	<u>53</u>
2.1 Конструирование векторов для экспрессии компонентов системы Mitocrispr/Cas9	53
2.1.1 Дизайн и сборка плазмидных конструкций, экспрессирующих направляющую РНК на мутацию мт.8993Т>G мтДНК.....	53
2.1.2 Дизайн и сборка генетических конструкций, экспрессирующих нуклеазу Cas9.....	53
2.2 Методы работы с клеточными культурами.....	54
2.2.1 Культивирование клеточных линий.....	54
2.2.2 Транфекция клеточных линий	54
2.2.3 Получение стабильных трансгенных клеточных линии	55
2.2.4 Иммуноцитохимия.....	55

2.2.5	ТЕСТ НА КОЛОКАЛИЗАЦИЮ	56
2.2.6	ПРОСВЕЧИВАЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ.....	57
2.2.7	ИММУННОЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	58
2.2.8	МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИЙ	59
2.2.9	КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ	59
2.2.10	ВЫДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ.....	59
2.2.11	ВЕСТЕРН-БЛОТ	60
2.2.12	ЦИФРОВАЯ КАПЕЛЬНАЯ ПЦР.....	61
2.3	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	62
2.3.1	АНАЛИЗ УРОВНЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ	62
2.3.2	ГИДРОЛИЗ ДНК КОМПЛЕКСАМИ gRNA/CAS9 В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	62
2.4	СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ	63
 <u>ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</u>		<u>65</u>
3.1	ДИЗАЙН, СБОРКА И АНАЛИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ	
	MITO-CRISPR/CAS9.....	65
3.1.1	ИМПОРТ МОДИФИЦИРОВАННОЙ НУКЛЕАЗЫ MITO-CAS9 В МИТОХОНДРИИ	66
3.1.1.2	ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСГЕННЫХ ЦИБРИДНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, СО СТАБИЛЬНОЙ	
	ЭКСПРЕССИЕЙ <i>MITO-CAS9</i>	68
3.1.2	ИМПОРТ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК В МИТОХОНДРИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ.....	92
3.2	АНАЛИЗ СДВИГА ГЕТЕРОПЛАЗМИИ В ЛИНИЯХ ЦИБРИДНЫХ КЛЕТОК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СИСТЕМЫ	
	MITO-CRISPR/CAS9.....	103
 <u>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</u>		<u>113</u>
<u>ВЫВОДЫ</u>		<u>115</u>
<u>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</u>		<u>116</u>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная ДНК

ОФ – окислительное фосфорилирование

ПГД – преимплантационная генетическая диагностика

ПНК - пептидо-нуклеиновые кислоты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

TAS – termination-associated sequence-последовательность, ассоциированная с терминирующей

COX I – cytochrome c oxidase I - первая субъединица комплекса цитохром-с-оксидазы

CPEO – chronic progressive external ophthalmoplegia - хроническая прогрессирующая внешняя офтальмоплегия

CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 - регулярно расположенные группами короткие палиндромные повторы

CSBI-III – conserved sequence blocks I-III – последовательность 1-3 консервативных блоков мтДНК

DAPI - 4', 6'-диамидино-2-фенилиндо́л

FBS – fetal bovine serum - фетальная бычья сыворотка

EGFP – enhanced green fluorescent protein - зелёный флуоресцентный белок с усиленной экспрессией

gRNA – guide RNA – направляющая РНК

HSP – heavy strand promoter- промотор тяжелой цепи мтДНК

IMS – intermembrane space of mitochondria - межмембранное пространство митохондрий

ITR – inverted terminal repeat – инвертированная терминальная последовательность

LHON – Leber's hereditary optic neuropathy - наследственная оптическая нейропатия лебера

LSP – light strand promoter- промотор легкой цепи мтДНК

MERRF – myoclonic epilepsy with ragged-red fibers- миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами

MIDD – maternally inherited diabetes and deafness- синдром сахарного диабета и глухоты

MILS – maternally-inherited Leigh's syndrome- Синдром Лея, подострая некротизирующая энцефаломиопатия

MRPL12 – mitochondrial ribosomal protein L12 - митохондриальный рибосомальный белок L12

MRT – mitochondrial replacement therapy- заместительная терапия митохондрий

MST – maternal spindle transfer- перенос веретена деления от донорной (материнской) яйцеклетки

MTERF1 – mitochondrial transcription termination factor 1 – фактор терминации митохондриальной транскрипции 1

MTS – mitochondrial targeting signal- сигнал митохондриальной локализации

mtSSB – mitochondrial single-stranded DNA binding protein- митохондриальный белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК

NARP - neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa - нейрогенная атрофия мышц и пигментный ретинит

OXPPOS – oxidative phosphorylation - окислительное фосфорилирование (ОФ)

PAM – protospacer adjacent motif - мотив, прилегающий к протоспейсеру

PBT – polar body nuclear transfer – перенос ядра полярного тельца

PCC - Pearson correlation coefficient- коэффициент корреляции по Пирсону

PEI – polyethylenimine- полиэтиленимин

PNAs - peptide nucleic acids- пептидо-нуклеиновые кислоты

PNT - pronuclear transfer - пронуклеарный перенос

POLG (γ) – DNA polymerase subunit gamma - каталитическая субъединица фермента, участвующего в репликации митохондриальной ДНК

POLRMT – mitochondrial DNA-directed RNA polymerase - митохондриальная ДНК-зависимая РНК полимераза

scAAV2 – self-complementary adeno-associated virus serotype 2 – самокомплементарные аденоассоциированные вирусы 2-го типа

TALEN – transcription activator like effector nucleases- эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции

TEFM – mitochondrial transcription elongation factor – митохондриальный фактор элонгации транскрипции

TFAM – mitochondrial transcription factor A- митохондриальный фактор транскрипции А

TIM – the translocase of the inner mitochondrial membrane - транслоказа внутренней мембраны митохондрий

TOM – the translocase of the outer mitochondrial membrane- транслоказа внешней мембраны митохондрий

tRNA – transfer RNAs- транспортные РНК

TWINKLE – mtDNA helicase- митохондриальная ДНК геликаза

ZFN – Zinc Finger Nucleases- нуклеазы, содержащие ДНК-связывающий домен типа “Цинковые пальцы”

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Наиболее важная функция митохондрий - это выработка энергии путем окислительного фосфорилирования (ОФ). В отличие от других органелл митохондрии имеют собственную двухцепочечную ДНК (мтДНК), в которой закодирована информация о некоторых субъединицах комплексов дыхательной цепи. О том, что нарушения структуры мтДНК приводят к широкому спектру нейромышечных и нейродегенеративных заболеваний, известно уже давно. Установлено, что от митохондриального заболевания страдает в среднем 1 из 10000 жителей планеты [1]. К настоящему времени митохондриальные заболевания не поддаются излечению. Пациенты получают лишь симптоматическое лечение, которое обычно направлено на частичное восстановление энергетических функций митохондрий, а не на устранение дефекта, тем самым незначительно улучшая качество жизни пациента. Но далеко не всегда мутации, даже если они расположены в кодирующих участках мтДНК, приводят к развитию заболевания. В первую очередь это связано с феноменом гетероплазмии, то есть с одновременным присутствием в одной митохондрии молекул ДНК дикого типа и молекул ДНК, несущих мутации. Именно от уровня гетероплазмии мутации мтДНК зависит тяжесть митохондриальной патологии. Для проявления клинических симптомов конкретного заболевания необходимо, чтобы количество мутантной ДНК превысило пороговый эффект. Так в случае заболевания NARP (невропатия с атаксией) количество мтДНК с мутацией m.8993T>G должно составлять 70%, в то время как для манифестации синдрома Лея (MILS) этого значения недостаточно [2].

Одним из первых подходов направленной элиминации мутантной мтДНК с целью смещения уровня гетероплазмии является метод с применением эндонуклеаз рестрикции, которые узнают уникальные сайты,

возникшие после появления мутации в геноме митохондрий, и специфически разрезают мутантную мтДНК, которая впоследствии деградирует. Следовательно, снижается и негативное влияние мутации, которое компенсируется за счет репликации «здоровой» мтДНК.

Молекулярные технологии редактирования генома на основе эндонуклеаз рестрикции уже адаптированы для внесения двухцепочечных разрывов в митохондриальную ДНК и довольно широко применяются в лабораториях по всему миру. К ним относятся модифицированные мегануклеазы, нуклеазы на основе доменов типа «цинковые пальцы» – ZFNs (Zinc Finger Nucleases) и TALE белков – TALENs (Transcription Activator Like Effector Nucleases).

В связи с этим, разработка подходов для смещения соотношения в сторону мтДНК дикого типа за счет снижения количества мутантной мтДНК в митохондриях является фундаментальной задачей нашей работы. Для достижения данной цели, мы задействуем систему CRISPR/Cas9, адаптируя ее компоненты для направленной элиминации мутантной мтДНК.

Практическая универсальность эндонуклеаз типа «цинковые пальцы» и систем TALEN позволяет осуществлять с их помощью избирательное связывание и расщепление любых участков ДНК путем конструирования определенных ДНК-связывающих доменов. Но именно это и является их основным недостатком, поскольку для каждой мутации требуется отдельно проводить дизайн и синтез ДНК-связывающих белковых компонентов, что является достаточно трудоемкой, длительной и дорогостоящей процедурой. Помимо этого, показано, что использование обеих технологий может сопровождаться неспецифическими эффектами в отношении митохондриальной ДНК, что приводит к значительному уменьшению количества ее немутантных копий в клетке, а также неспецифическом разрезании ядерной ДНК, что может приводить в образованию мутаций в геноме [3].

Система CRISPR/Cas9 принципиально отличается от представленных выше систем по простоте использования и высокой эффективности. Для системы CRISPR/Cas9 требуется два компонента – это направляющая РНК (gRNA), 20 нуклеотидов которой комплементарны целевой последовательности, и собственно нуклеаза Cas9, катализирующая двуцепочечное расщепление ДНК-мишени. Начиная с 2013 года технология CRISPR/Cas9 была адаптирована для манипуляции с ядерным геномом млекопитающих, дрожжей, рыб, растений и других организмов. Стоит отметить, что все присущие характеристики и возможности системы CRISPR/Cas9 делают ее перспективным инструментом и в области генетической инженерии митохондрий.

В связи с этим, разработка способов элиминации мутантной мтДНК является актуальной задачей, поскольку данный подход откроет новые возможности для изучения фундаментальных процессов функционирования митохондрий, и будет способствовать развитию новых стратегий лечения митохондриальных заболеваний.

Цель работы разработка универсального подхода направленного смещения уровня гетероплазмы митохондриального генома с применением системы CRISPR/Cas9

1. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:
2. Провести дизайн и сборку генетических конструкций для интеграции гена *MitoCas9* в геном цибридных клеток при помощи системы Sleeping Beauty
3. Получить трансгенные цибридные линии клеток NARP3-1 и NARP3-2 с интеграцией в геном *MitoCas9*.
4. Провести анализ внутриклеточной локализации *MitoCas9* в трансгенных линиях клеток.
5. Осуществить дизайн и сборку генетических конструкций, кодирующих направляющую РНК на мутацию m.8993T>G.

6. Провести анализ импорта модифицированных направляющих РНК в митохондри

7. Оценить сдвиг гетероплазмы в трансгенных линиях цибридных клеток NARP3-1 C1 и NARP3-2 C1 при воздействии системы MitoCRISPR/Cas9.

Научная новизна:

1. Получены трансгенные цибридные клеточные линии NARP3-1-C1 и NARP3-2-C1, моделирующие митохондриальное заболевание вызываемое мутацией m.8993T>G, с конститутивной экспрессией модифицированной нуклеазы Cas9, которая эффективно импортируется в митохондриальный матрикс.

2. Впервые продемонстрировано, что введение модификаций в виде детерминант митохондриального импорта в конститутивную часть gRNA (направляющей РНК) – компонента системы CRISPR/Cas9 – не влияет на функциональную активность и сборку комплекса Cas9/gRNA.

3. Анализ трансгенных клеточных линий NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 с помощью просвечивающей электронной микроскопии позволил выявить ряд неописанных ранее изменений в биогенезе митохондрий трансгенных клеток, при сравнении с исходными цибридными клеточными линиями, что предположительно связано с экспрессией MitoCas9 в геноме NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Созданные трансгенные клеточные линии NARP3-1-MitoCas9 и NARP3-2-MitoCas9 с конститутивной экспрессией нуклеазы MitoCas9 могут стать моделями для дальнейших исследований путей и способов импорта макромолекул в митохондриальный матрикс клеток. Результаты, представленные в данной работе, будут способствовать не только развитию

новых подходов в лечении митохондриальных заболеваний, но и изучению фундаментальных процессов функционирования митохондрий.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия импортируемой в митохондрии нуклеазы MitoCas9 в трансгенных клеточных линиях, полученных на основе цибридных клеток NARP3-1 NARP3-2, моделирующих заболевания NARP и Синдром Лея, не влияет на уровень гетероплазмии мтДНК, но вызывает изменения в морфологии митохондрий

2. Впервые показано, что введение детерминант митохондриального импорта в петли tetraloop и stem loop2 направляющей РНК способствует импорту в митохондрии и не нарушает эффективность сборки и функционирование комплекса gRNA/Cas9 в условиях *in vitro*

3. Система MitoCRISPR/Cas9 вызывает смещение уровня гетероплазмии в трансгенных цибридных клеточных линиях

Структура и объём работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы (292 источника). Объём работы составляет 149 страниц. Работа включает 3 таблицы и 25 рисунков

Апробация работы. Материалы настоящей работы вошли в отчеты по гранту Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 19-34-90087 Аспиранты «Разработка способа адресной доставки и экспрессии гена, кодирующего направляющую РНК (функциональный компонент системы CRISPR/Cas9) в митохондриях с использованием векторов на основе модифицированных аденоассоциированных вирусов 2-го типа». Результаты работы были представлены лично автором на 4 международных научных конференциях в виде 2 устных и 2 стендовых докладов:

1. **Закирова Э. Г.** Адаптация системы CRISPR/Cas9 для направленной элиминации мтДНК с мутациями. - VI международные Фарабиевские чтения. Алматы, Казахстан, 2019;

2. **Zakirova E. G.**, et al. Adaptation of the CRISPR / Cas9 system for targeted manipulations with the human mitochondrial genome.- 11th International Young Scientists School “Systems Biology and Bioinformatics” – SBB-2019. Novosibirsk, Russia, 2019;

3. **Zakirova E. G.**, et al. Method for human mitochondrial DNA repopulation using CRISPR / Cas9-mediated elimination of defect genome copies.- International mini-conference “Chromosome and mitosis”. Novosibirsk, Russia, 2019;

4. **Zakirova, E.**, et al. Adaptation of CRISPR/Cas9 system for directed elimination of mitochondrial DNA copies with mutations. - 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Toward New Horizons. Ljubljana, Slovenia, 2021;

Публикации по теме работы

По материалам диссертации опубликовано 2 научные работы в изданиях, индексируемых в базах данных «Скопус» (Scopus) и «Сеть науки» (Web of Science):

1. **Zakirova E.G.**, Vyatkin Y.V., Verechshagina N.A., Muzyka V.V., Mazunin I.O., Orishchenko K.E. Study of the effect of the introduction of mitochondrial import determinants into the gRNA structure on the activity of the gRNA/SpCas9 complex in vitro. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020; 24(5):512-518. DOI 10.18699/VJ20.643.

2. **Zakirova, E.G.**; Muzyka, V.V.; Mazunin, I.O.; Orishchenko, K.E. Natural and Artificial Mechanisms of Mitochondrial Genome Elimination. Life 2021, 11, 76. <https://doi.org/10.3390/life11020076>.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Особенности молекулярной биологии митохондрий

1.1.1 Пространственная организация и структура митохондриальной ДНК

С момента открытия двойной спирали ДНК прошло чуть больше 10 лет, как Magritt М.К. и Silvan Nass обнаружили при помощи электронной микроскопии чувствительные к ДНК-азе нитевидные структуры внутри митохондрий, выделенных из эмбриональных клеток цыпленка [4]. Немного позже, в 1964 году, с помощью биохимического анализа высокоочищенных митохондриальных фракций было установлено, что митохондрии обладают своей собственной двуцепочечной, кольцевой ДНК, отличной по своей структуре от ядерной [5].

На сегодняшний день известно, что двуцепочечная митохондриальная ДНК (мтДНК) человека кодирует 37 генов, необходимых для осуществления главной функции митохондрий - окислительного фосфорилирования (ОФ) и поддержания стабильной энергетизации клетки [1,6]. По своей структуре мтДНК демонстрирует невероятную компактность и почти не содержит межгенных некодирующих участков [7]. Исключением является лишь контрольный регион мтДНК, который является некодирующим, но содержит регуляторные элементы мтДНК: промоторы тяжелой (HSP) и легкой (LSP) цепей, а также точку инициации репликации тяжелой цепи (OH). Помимо LSP и HSP было высказано предположение, что существует второй промотор H-цепи (HSP2), но его активность *in vivo* остается спорной [8,9]. Открытие второго промотора легкой цепи LSP2 на 3'-конце митохондриальной некодирующей области (NCR) позволило расширить знания о процессах координации репликации и транскрипции митохондриальных генов [10]. Большая часть информации мтДНК кодируется на H-цепи – это гены двух

рибосомальных РНК (16S и 18S), четырнадцать транспортных РНК и двенадцать полипептидов [5]. Легкая цепь кодирует восемь тРНК и один полипептид. В совокупности, все 13 белковых продуктов синтеза митохондриальной ДНК являются составными частями ферментативных комплексов ОФ [11,12]. К ним относятся семь полипептидов комплекса I (MT-ND1-3, MT-ND4L, MT-ND4-6); один из 11 полипептидов комплекса III (цитохром b), три из 13 полипептидов комплекса IV (MT-COI-III) и два из 15 полипептидов комплекса V (MT-ATP6 и 8). Все субъединицы комплекса II вместе с другими субъединицами и факторами сборки, необходимыми для образования полноценной дыхательной цепи (в сумме около 200 белков) и поддержания белкового синтеза в митохондриях кодируются ядерным геномом [13]. Рибосомальные и транспортные РНК митохондрий совместно с рядом импортированных из цитоплазмы белков образуют отдельный трансляционный аппарат митохондрий, который необходим для реализации наследственной информации мтДНК, которая кодируется с использованием генетического кода, отличного от того, который используется ядерными генами [14].

Схема организации митохондриального генома представлена на рисунке 1.

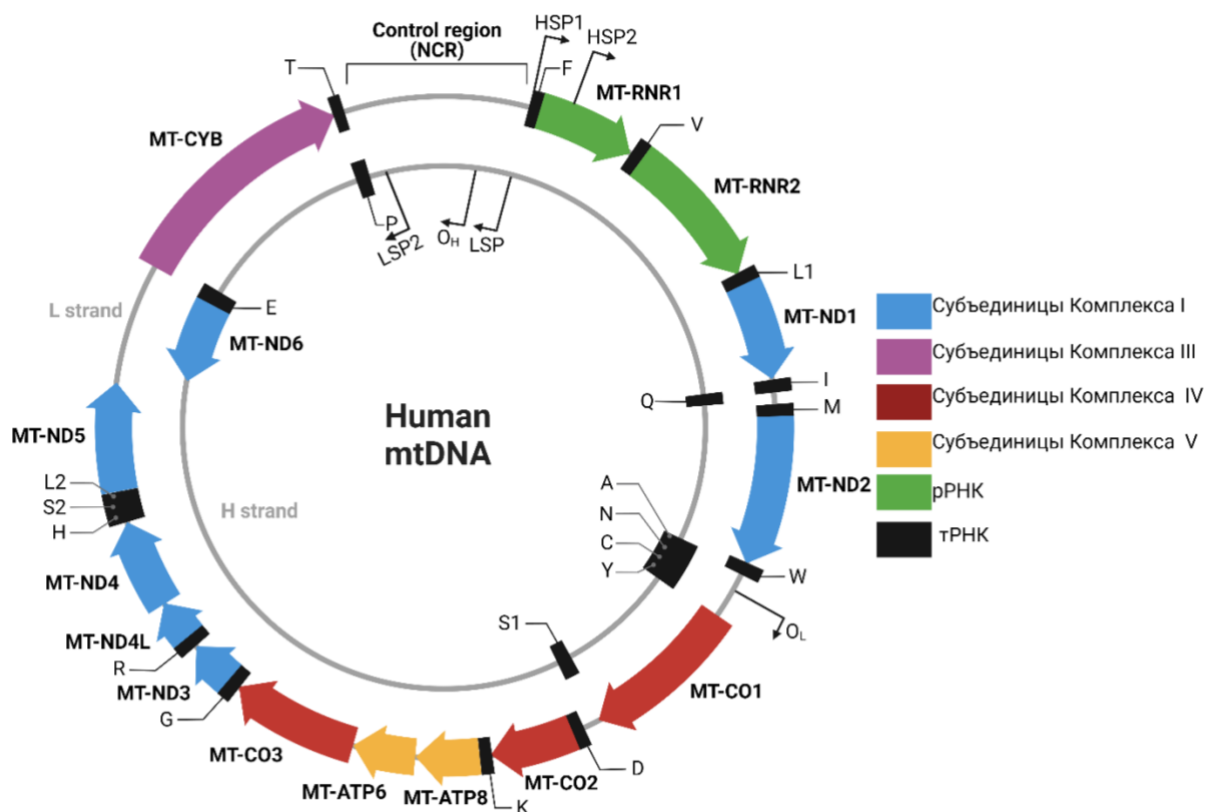


Рисунок 1. Схема организации мтДНК человека. HSP, HSP2, LSP и LSP2 – промоторы тяжелой и легкой цепи. OH и OL – ориджины репликации тяжелой и легкой цепи. Показаны следующие гены: субъединицы NADH-дегидрогеназы (MT-ND1-ND6 и ND4L), цитохром b (MT-CYB), субъединицы цитохрома с-оксидазы (MT-COI-III), субъединицы АТФ-синтазы 8 и 6 (MT-АТР6, MT-АТР8), рРНК 12S (MT-RNR1) и 16S (MT-RNR2) и тРНК (обозначаются однобуквенным кодом соответствующих аминокислот) (Схема создана с помощью BioRender.com с адаптацией по [10]).

Как правило, в каждой митохондрии содержится несколько копий ее генома. Стоит отметить, что многокопийная природа мтДНК зачастую является решающим фактором в фенотипическом проявлении, кодируемых в митохондриальном геноме генов. На одну соматическую клетку приходится от 10^3 до 10^4 копий мтДНК [15,16], распределенных по всей сети митохондрий в виде свободных от гистонов ДНК-белковых комплексов, которые были названы нуклеоидами [17–19]. В среднем на одну органеллу приходится по 3,2 нуклеоида [20]. В состав одного нуклеоида митохондрий млекопитающих входят белки, участвующие в регуляции транскрипции и репликации мтДНК,

основные из которых – mtSSB (ортолог бактериального SSB, связывающегося с одноцепочечной ДНК в ходе репликации), POL γ (митохондриальная ДНК-полимераза гамма), TFAM (фактор транскрипции митохондрий А), POLRMT (митохондриальная РНК-полимераза) и TWINKLE (митохондриальная ДНК геликаза) [21]. Поскольку все перечисленные ферменты участвуют в процессах репликации и транскрипции мтДНК, то пространственно они связаны между собой, организуя кор нуклеоида, вокруг которого обвита мтДНК. Показано, что на один нуклеоид приходится 1.45 молекулы мтДНК [22].

1.1.2 Матричные процессы в митохондриях

Одним из самых ранних матричных процессов, происходящих в митохондриях, является процесс репликации нативной мтДНК. Все белки, участвующие в данном процессе, являются аналогами бактериальных и фаговых ферментов [21].

ДНК-полимераза γ (POL γ) является единственным ферментом, который катализирует репликацию митохондриальной ДНК. В клетках человека, POL γ представлена гетеротримером с одной каталитической α -субъединицей POL γ A (125-140 кД) и двумя дополнительными β -субъединицами POL γ B (35-54 кД) [23]. Как полимеразная, так и экзонуклеазная активности фермента связаны с различными доменами большой субъединицы α . Каталитический домен POL γ A осуществляет собственно высокоточный синтез дочерней цепи [24], а 3'-5' экзонуклеазный домен корректирует вновь синтезированные нити ДНК [25] и производит элиминацию линейных молекул мтДНК, возникающих при образовании двуцепочечного разрыва [26]. Дополнительные β -субъединицы гетеротримера обеспечивают усиленное взаимодействие с ДНК-матрицей и увеличивают как каталитическую активность, так и процессивность полимеразы [27–29].

Об остальных белках репликационного механизма можно вкратце написать по ходу рассмотрения всего процесса, который в целом консервативен для всех млекопитающих. Одним из ключевых участников инициации репликации является белок TFAM. Показано, что если этот белок находится в составе нуклеоида в низких концентрациях, это стимулирует именно инициацию репликации, а если содержание TFAM высоко, то иницируется транскрипция [30]. Будучи разделенной геликазой TWINKLE, одноцепочечная нить матричной мтДНК начинает копироваться ДНК-полимеразой γ , формируя при этом репликационную вилку [31]. Расходящиеся цепи вилки стабилизируются ДНК-связывающими митохондриальными белками mtSSB, которые защищают образовавшиеся одноцепочечные нити мтДНК от воздействия нуклеаз и формирования вторичной структуры [32,33]. Таким образом белки mtSSB, TWINKLE и POL γ являются ключевыми для эффективной репликации мтДНК не только в *in vivo*, но и в моделируемых условиях *in vitro* [31,34,35].

В зависимости от предполагаемой репликационной модели, последовательность и процесс удвоения мтДНК может незначительно меняться. Научным сообществом выдвигается три гипотезы по данному вопросу; первые две – в пользу асинхронной репликации мтДНК, а третья подразумевает параллельное, синхронное копирование нитей [36]. Стратегии репликации мтДНК отображены на рисунке 2.

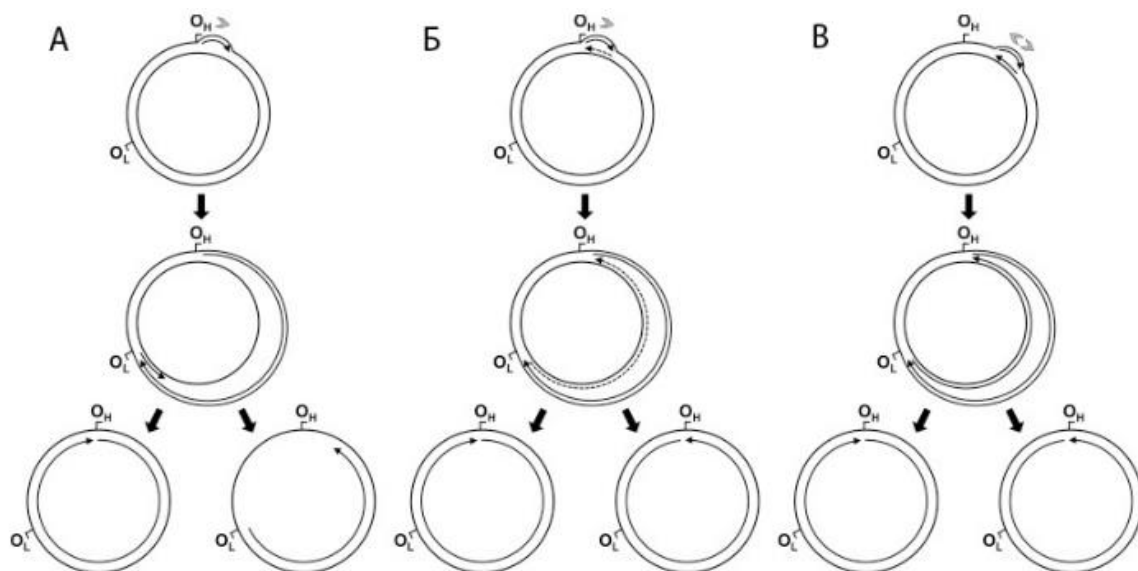


Рисунок 2. Различные модели репликации мтДНК млекопитающих. А – асинхронная модель, Б – RITOLS, В – синхронная модель [37].

Первая модель однонаправленного синтеза дочерней цепи была выдвинута еще 1972 году Vinograd et al. [38]. Механизм, отличный от репликации как бактериальной хромосомы, так и генетического материала ядра клеток млекопитающих, был назван асинхронным смещением цепей [39]. В ходе такого удвоения происходит поочередный синтез цепей с разных ориджинов с последующим вытеснением и сегрегацией легких и тяжелых нитей в новые молекулы мтДНК. Первой, начиная с точки инициации O_H в некодирующем районе, синтезируется тяжелая цепь.

Предполагается, что для начала репликации тяжелой цепи ДНК-полимеразе POL γ РНК-затравка не требуется [40], ДНК-полимераза POL γ начинает синтез сама по себе. Однако более устоявшейся гипотезой является то, что для инициации репликации тяжелой цепи мтДНК необходимы РНК-праймеры, синтезируемые в результате преждевременной терминации транскрипции легкой цепи [41]. По ходу движения репликативного механизма все одноцепочечные нити удерживаются mtSSB белками, предотвращая их от связывания с POLRMT [42]. Когда репликация достигает 2/3 всего генома, локуса O_L , родительская H-цепь складывается в шпилечную структуру,

которая блокирует связывание mtSSB, тем самым оставляя незащищенный участок оцДНК, с которой POLRMT синтезирует короткие праймеры (10-25 нуклеотидов [43]), связывающиеся с Т-богатым участком OL. В результате этого происходит завершение репликации Н-цепи и последующая полная репликация легкой цепи [44]. По окончании репликации каждой из цепей они замыкаются ДНК лигазой III и образуют кольцевую двунитчатую молекулу [45]. Таким образом, в соответствии с данной моделью, митохондриальная репликация является однонаправленной, асимметричной и асинхронной. Остается не совсем понятным, почему POLRMT функционирует при репликации в качестве праймазы только для одной цепи (легкой), и каким образом POLγ способна начинать репликацию тяжелой цепи без затравки, если для инициации синтеза на легкой цепи наличие затравки является необходимым. Помимо этого, данная модель характеризуется отсутствием в ней фрагментов Оказаки – обязательных участников других систем репликации.

По поводу существования второй модели асинхронной репликации ведутся оживленные дискуссии. Данная модель получила название RITOLS (от англ. *ri*bonucleotide *i*ncorporation *t*hroughout the *l*agging *s*trand (RITOLS), ассоциация РНК с отстающей цепью) [46]. Согласно данным двумерного гелевого электрофореза [47], по всей длине отстающей легкой цепи расположены короткие гибридные РНК-ДНК последовательности, которые образовались в результате репликации лидирующей нити. Возникающие гибридные дуплексы являются подобием фрагментов Оказаки, что в принципе не совместимо с асинхронным механизмом репликации. Помимо этого, высокая частота присоединения белков mtSSB к последовательности ДНК (каждые 59 п.о.), снижает вероятность наличия незащищенного участка, что противоречит существованию автономной модели RITOLS в митохондриях. Еще одной проблемой для модели RITOLS является наличие РНКазы H1 в митохондриях. Этот фермент эффективно удаляет гибриды РНК-ДНК, которые стабильно

образуются на длинных участках одноцепочечной ДНК во время репликации мтДНК [48]. Более вероятно, что описанный механизм является промежуточным этапом репликации по типу вытеснения цепей.

Согласно синхронной модели репликации, третьей из выдвинутых гипотез, репликация мтДНК идет одновременно, начиная с широкой зоны инициации (12 337 п.н. – 15 887 п.н.), с образованием тета-структуры, аналогичной бактериальной хромосоме [49]. Такая модель получила экспериментальное подтверждение [50]; наличие в митохондриях белкового аппарата, обеспечивающего функцию фрагментов Оказаки, также говорит в пользу существования данной модели.

Высказывается мнение, что репликация в митохондриях может происходить по любому из трех вышеописанных механизмов, а то, какой именно механизм реализуется в данный момент времени, определяется текущими задачами клетки. По всей видимости, асинхронная репликация происходит быстрее синхронной; таким образом, можно предположить, что в ситуации, когда требуется получить большое количество копий мтДНК (например, при активном клеточном делении), используется асинхронный механизм, а в других случаях, когда увеличение количества мтДНК не столь важно – синхронный [51].

Транскрипция митохондриального генома инициализируется в основной некодирующей области, содержащей промоторы L-цепи (LSP) и H-цепи (HSP). Так транскрипция легкой цепи идет с двух промоторов, которые контролируют транскрипцию восьми тРНК и гена *MT-ND6*. Что касается тяжелой цепи, то в ее составе имеется два промотора, которые располагаются приблизительно на 100 п.н друг от друга (561 п.н. и 646 п.н.). Несмотря на существующие споры об отсутствии второго промотора тяжелой цепи, имеются данные в пользу его присутствия. Так, предполагается, что транскрипция с промоторов тяжелой цепи происходит однонаправленно и приводит к образованию длинных полицистронных РНК. С промотора HSP1

продуцируется транскрипт, содержащий tRNA^{Phe}, tRNA^{Val} и две рРНК (12S и 16S), тогда как транскрипция с HSP2 приводит к образованию транскрипта, который охватывает почти весь геном [41,52,53]: в его состав входит как вышеописанный короткий HSP1-транскрипт, так и все остальные РНК, закодированные в тяжелой цепи, а именно 11 тРНК и 12 мРНК. В обоих транскриптах тяжелой цепи каждая рРНК и мРНК хотя бы с одной стороны (а чаще всего с обеих) фланкированы тРНК. Такая организация транскриптов получила название тРНК-пунктуации [12].

Как и в случае репликации, транскрипция в митохондриях человека, обеспечивается белками, закодированными в ядерном геноме. Транскрипция мтДНК осуществляется ДНК-зависимой РНК-полимеразой POLRMT, которая структурно схожа с РНК-полимеразой бактериофагов T3 и T7 [7,8]. В отличие от полимераз бактериофага, которые могут распознавать промоторные области без вспомогательных белков, для транскрипции митохондриального генома необходимы дополнительные факторы транскрипции. Так, иницирование транскрипции требует ассоциации POLRMT с митохондриальным транскрипционным фактором А (TFAM) и митохондриальным транскрипционным фактором В2 (TFB2M). Поначалу, TFAM связывается с мтДНК на 12-39 пар оснований выше сайтов инициации транскрипции и вызывает резкий изгиб мтДНК на 180° [54], что важно для правильного позиционирования транскрипционного белкового аппарата относительно сайта старта транскрипции. После присоединения TFAM к мтДНК к промоторной области привлекается фактор транскрипции TFB2M, который взаимодействует с С-концевым участком TFAM [55], вызывая плавление двуцепочечной мтДНК [56,57]. После сборки инициаторного комплекса и частичного расплетения ДНК, к промотору привлекается POLRMT, и начинается собственно транскрипция. Основные компоненты транскрипции мтДНК указаны на рисунке 3.

Помимо трех вышеупомянутых белков, в митохондриальной транскрипции принимают участие еще несколько важных белковых факторов. Поскольку POLRMT не может непрерывно транскрибировать весь митохондриальный геном [58], для продолжительного синтеза РНК на матрице ДНК ей необходим дополнительный фактор, подобный тем, что способствуют элонгации транскрипции у прокариот и элонгации в ядре эукариот [59]. Было установлено, что митохондриальный фактор элонгации транскрипции (TEFM) увеличивает процессивность фермента, взаимодействуя с С-концевым доменом POLRMT и вновь синтезированной мРНК [60]. Другой фактор, митохондриальный рибосомальный белок L12 (MRPL12), был идентифицирован как партнер в работе POLRMT [61]. Этот белок также регулирует метаболизм РНК [62], однако детальные механизмы его работы остаются неясными.

Механизм терминации транскрипции мтДНК до сих пор остается не до конца изученным. Ранее предполагалось, что митохондриальный фактор терминации 1 (MTERF1) связывается вдоль большой бороздки мтДНК в области гена лейциновой тРНК, изгибая ее на 25° и частично разматывая, в результате чего в сайте связывания MTERF1-мтДНК происходит «выворачивание» трех нуклеотидов [63], тем самым индуцируется терминация транскрипции лишь тяжелой цепи. Но недавние исследования выявили, что фактор терминации прекращает двунаправленную транскрипцию как HSP- так и LSP-иницированных транскриптов [63], причем большее сродство белок проявляет именно к легкой цепи мтДНК.

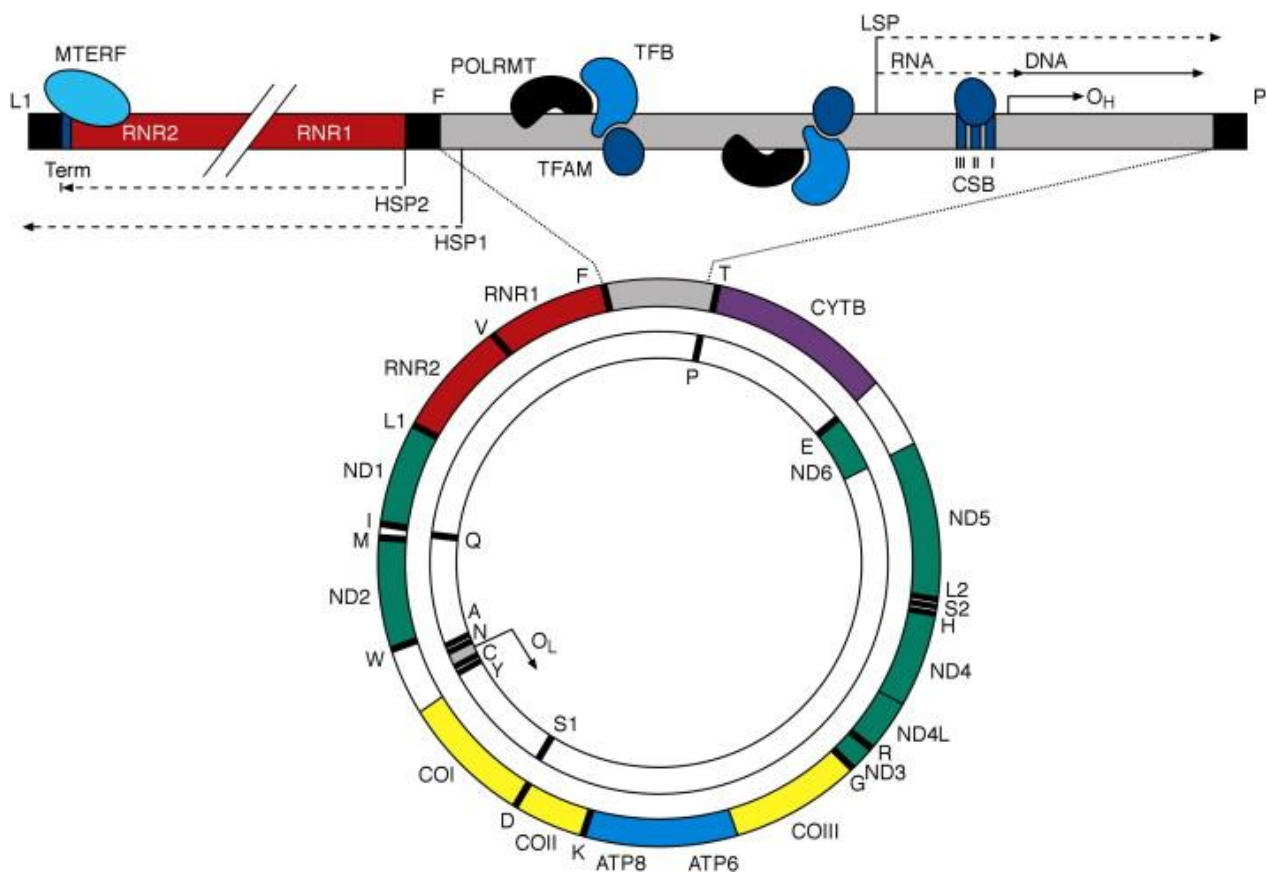


Рисунок 3. Регуляция транскрипции мтДНК. Транскрипция тяжелой цепи мтДНК инициируется либо с первого промотора тяжелой цепи (HSP1), синтезируя полицистронный продукт, включающий две рРНК, 12 мРНК и 14тРНК, либо со второго (HSP2) промотора, синтезируя при этом короткий транскрипт, который заканчивается в 16S рРНК (RNR2). С промоторов легкой цепи (LSP и LSP2) транскрибируется мРНК ND6 гена и 8 тРНК. Транскрипционный комплекс мтДНК состоит из фактора активатора транскрипции (TFAM), который связывается выше промоторов с РНК-полимеразой (POLRMT), образуя гетеродимерный комплекс с одним из двух факторов транскрипции (TFB1M или TFB2M). Предполагается, что консервативные блоки контрольного региона 1-3 (CSB1-3) и участок связывания митохондриального фактора терминации 1 (MTERF1) ответственны за терминацию транскрипции легкой и тяжелой цепи соответственно. (Адаптировано из Gorman et al. [64]).

Помимо терминации в области связывания MTERF1, в немногочисленных экспериментальных работах утверждается о механизмах преждевременной терминации транскрипции мДНК. Так, выявленные палиндромные последовательности coreTAS (16087-16101п.н) и CSBI-III (219-

367п.н), расположенные в контрольном регионе мтДНК, вероятнее всего являются также белок-связывающими мотивами [65]. Транскрипция LSP-цепи, остановленная в области консервативного блока 1 генерирует РНК-праймеры для инициации репликации мтДНК в оН [41]. Более 95% всех репликационных событий, инициированных с оН преждевременно прекращается в области coreTAS. Изучая события, происходящие в D-петле, сайт coreTAS был в дальнейшем определён в качестве терминатора как репликации, так транскрипции полноразмерных HSP-транскриптов [65]. Детальный молекулярный механизм данного процесса до конца неясен.

Кроме упомянутых выше особенностей матричных процессов митохондриального генома, трансляция также обладает рядом специфических черт. Первой из них является модификация стандартного генетического кода. Так, в митохондриях позвоночных животных кодон UGA, обычно являющийся стоп-кодоном, кодирует триптофан, а кодон AUA кодирует метионин, тогда как в стандартном генетическом коде он кодирует изолейцин. У млекопитающих в митохондриях используется большое количество нестандартных стартовых кодонов: AUA, AUU, AUC, GUG [66]. Что касается стоп-кодонов, то в митохондриях большинства организмов в дополнение к стандартным имеется еще два таких кодона – AGA и AGG. Впрочем, показано, что в митохондриях человека при трансляции именно тех мРНК, которые содержат данные нестандартные стоп-кодоны, перед терминацией имеет место сдвиг рамки считывания на один нуклеотид назад, в результате чего собственно терминация происходит на стандартных стоп-кодонах – UAA и UAG [67].

Для правильной и эффективной интеграции гидрофобных белков во внутреннюю мембрану трансляция должна идти непосредственно на внутренней мембране митохондрий. Такая гипотеза была выдвинута на основании, во-первых, результатов электронной микроскопии, которые свидетельствуют о том, что активно транслирующие митохондриальные

рибосомы располагаются вблизи от внутренней мембраны [68]. Во-вторых, эксперименты по биохимическому фракционированию показали, что трансляция и интеграция в мембрану митохондриальных генов происходят скоординировано [69]. Помимо этого, нужно отметить, что до сих пор не удалось воссоздать митохондриальную систему трансляции, причиной чему, вероятно, служит необходимость связи рибосом со внутренней мембраной.

Как было отмечено ранее, все мРНК, находящиеся в полицистронном транскрипте, как минимум, с одной стороны, фланкированы последовательностями тРНК. Именно по 5'- и 3'-границам этих генов происходит расщепление первичных транскриптов. Очевидно, этому способствует специфическая вторичная структура тРНК, которая узнается РНКазой Р [6]. Далее все молекулы РНК, кроме 12S и тРНК, подвергаются 3'-полиаденилированию с помощью митохондриальной поли-А-полимеразы (mtPAP) [70,71]. Если для бактерий, полиаденилирование является меткой для направленной дегградации транскриптов, то для РНК митохондрий подобный процесс непосредственно влияет на конечный уровень транслируемых белков. Например, деаденилирование снижает количество мт-мРНК комплекса IV, но увеличивает уровень мт-мРНК комплекса I [70,72].

1.1.3 Импорт макромолекул в митохондрии

Согласно теории симбиогенеза митохондрии — это потомки свободноживущих одноклеточных организмов, поселившихся некогда в предковой эукариотической клетке и «научившимися» жить в ней в качестве симбионтов. С одной стороны, своему бактериальному происхождению митохондрии обязаны наличию у них природной компетентности к поглощению чужеродной ДНК. С другой стороны, в ходе эволюции большая часть митохондриальных генов была перенесена в ядро, в результате чего продукты этих генов, необходимые для нормального функционирования органелл импортируются из цитозоля [73].

1.1.3.1 Импорт белков

Ввиду того, что подавляющее большинство белков, необходимых для поддержания целостности митохондрий, кодируются в ядерном геноме, внутри клетки должен быть слаженный механизм белкового обмена между органеллой и цитозолем. Белки ядерного происхождения синтезируются в цитозоле и транспортируются в митохондрии в виде белков-предшественников. Белки-предшественники, как правило, содержат N-концевые сигнальные последовательности (отщепляемые препоследовательности) и внутренние сигналы импорта для успешной интернализации в органеллах. Данные сигналы локализации в матриксе (MTS – mitochondrial targeting sequence) представляют собой аминокислотные последовательности небольшой длины, распознаваемые рецепторами на поверхности митохондрий, и обеспечивающие доставку белков в различные митохондриальные субкомпарменты.

На первом этапе транспорта белки-предшественники преодолевают внешнюю мембрану митохондрий (рисунок 4). Данную функцию выполняет транслокационный комплекс внешней митохондриальной мембраны – ТОМ-комплекс (от англ. translocase of the outer mitochondrial membrane) [74]. Далее, в зависимости от того в какой митохондриальный субкомпармент должен попасть данный конкретный белок, он передаётся на другие транслокационные комплексы митохондрии. Белки Tom70, Tom20 и Tom22 выступают в качестве рецепторов, обеспечивающих первичное узнавание сигнальных последовательностей. Они состоят из большого цитозольного и трансмембранного доменов. Помимо этого, Tom22 содержит С-концевой домен, который обращен в межмембранное пространство [75]. Tom20 взаимодействует с N-концевыми сигнальными последовательностями белков-предшественников, связывая гидрофобную поверхность амфифильной α -спирали [76]. Белки-предшественники с внутренними сигналами импорта узнаются рецептором Tom70 [77].

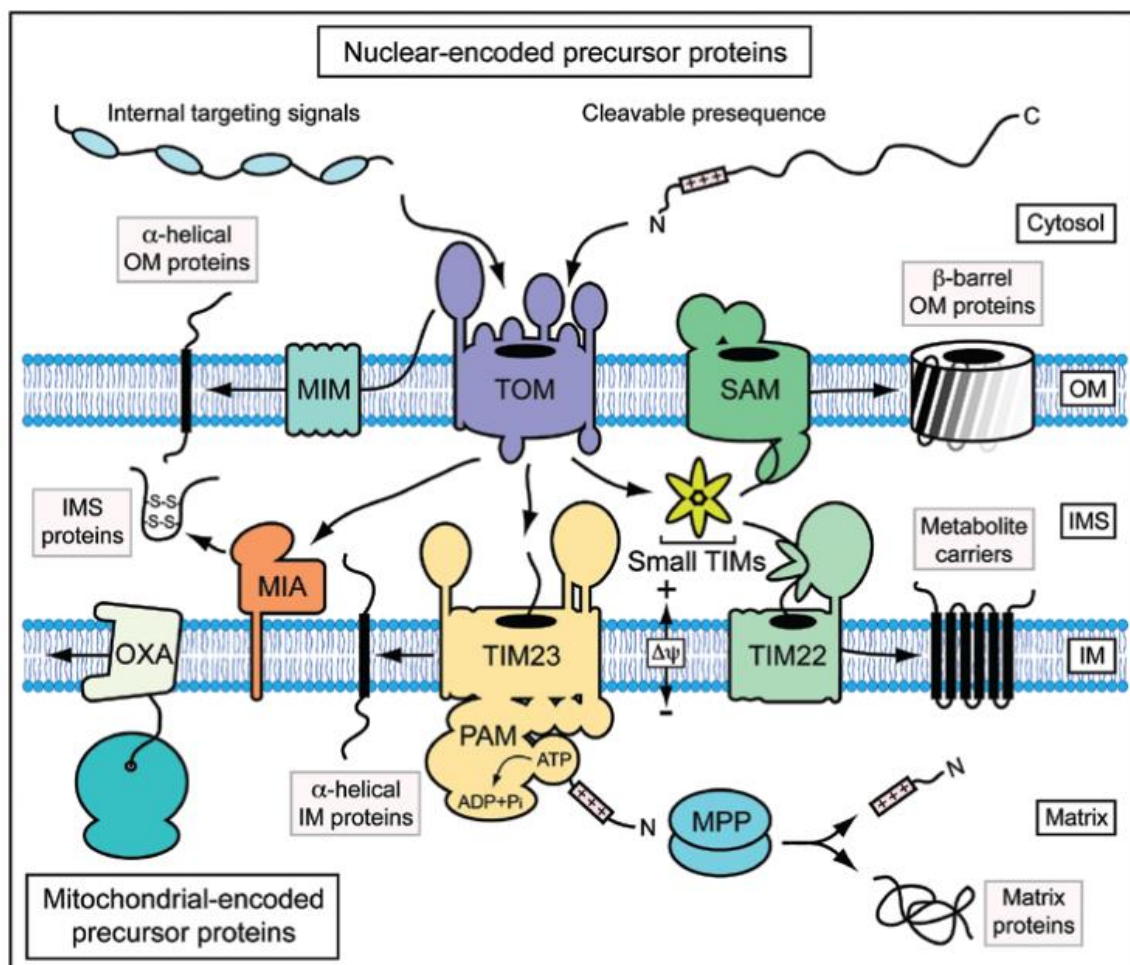


Рисунок 4. Аппарат импорта белков в митохондрию (по [78]). Подавляющее большинство митохондриальных белков синтезируются в цитозоле и импортируются транслокационным комплексом внешней мембраны (ТОМ). Сортировка белков-предшественников происходит в межмембранном пространстве (ИМС). Транслокационный комплекс внутренней мембраны (ТИМ) транспортирует белки-предшественники в матрикс митохондрий, при этом митохондриальная процессинговая пептидаза (МРР) отщепляет сигнальные аминокислотные последовательности.

Все белки-предшественники, несущие в своем составе N-концевые сигнальные последовательности, поступающие от ТОМ комплекса наружной мембраны, транспортируются через внутреннюю мембрану митохондрий благодаря ТИМ23 комплексу. При этом на определенное время происходит образование суперкомплекса ТОМ-ТИМ23, в котором N-конец белка-

предшественника связан с комплексом TIM23, а С-конец все еще связан с комплексом TOM [79]. Достигнув внутренней мембраны, белок-предшественник либо импортируется в матрикс митохондрий, либо встраивается в ее липидный бислой при условии наличия специальных гидрофобных сигналов импорта. Транслокация через внутреннюю мембрану требует наличия мембранного потенциала ($\Delta\psi$) и транслокационного АТФ-зависимого мотора, способствующего проникновению белков в матрикс [73]. Необходимо отметить, что во внутренней мембране митохондрий существует ещё один белок – Oxa1, который ответственен за встраивание в эту мембрану полипептидов, синтезируемых в матриксе [80].

1.1.3.2 Импорт нуклеиновых кислот

Механизм импорта рибонуклеиновых кислот в митохондрии наблюдается лишь у простейших и дрожжей. Первые экспериментальные доказательства импорта РНК в митохондрии были получены еще в 70-х годах прошлого века в экспериментах по гибридизации различных тРНК простейших рода *Tetrahymena* с ядерной и митохондриальной ДНК [95]. Впоследствии было показано, что митохондриальный геном этих организмов кодирует всего 10 тРНК, а остальные, следовательно, импортируются из цитозоля. Процесс импорта тРНК в митохондрии *Tetrahymena* изучался не очень интенсивно, и все, что известно об этом к настоящему моменту, сводится к идентификации нуклеотидов антикодона тРНК как детерминант импорта в митохондрии [96].

На сегодняшний день известно, что в митохондрии млекопитающих в естественных условиях импортируются три вида РНК. Первые два — это РНК-компонент РНКазы MRP, расщепляющей РНК-затравки при репликации митохондриальной ДНК [81,82] а также РНК-компонент РНКазы P, участвующей в 5'-концевом процессинге предшественников митохондриальных тРНК [83]. Третий тип РНК, импортирующейся в митохондрии млекопитающих, — это 5S рРНК [84,85], которая

предположительно является структурной составляющей большой рибосомной субъединицы.

В исследовании Wang G. 2012 года, экспериментально было доказано, что добавление MRP и RP детерминант в последовательность как мРНК, так и тРНК способствует их успешному импорту в митохондриальный матрикс [86]. Чуть позже, в другой работе, было выявлено, что домены F и D-петли тРНК дрожжей также являются эффективными импортерами молекул РНК в митохондрии млекопитающих [87]. Механизм импорта 5S рРНК основан на взаимодействии α -, γ -доменов, и дистальной части β -домена с такими белковыми факторами как роданеза и предшественником митохондриального рибосомального белка MRP-L18. Добавление данных доменов также позволило цитозольным РНК транспортироваться внутрь органеллы [88].

В работе Jeandard et. al. [89] было продемонстрировано наличие ряда малых и длинных некодирующих РНК, импортируемых при различных условиях, в митохондрии млекопитающих. SAMMSON – является длинной некодирующей РНК (днРНК), которая преимущественно экспрессируется более чем в 90% образцах меланомы [90]. При этом установлено, что SAMMSON напрямую взаимодействует с белком p32, а нокдаун SAMMSON приводит к снижению митохондриальной фракции p32. Это, в свою очередь, приводит к нарушению синтеза белков дыхательной цепи митохондрий, снижению потенциала мембраны митохондрий и апоптозу. Кроме того, снижение количества p32 в митохондриях приводит к накоплению «токсичных» предшественников митохондрий, что также индуцирует гибель клеток [91]. Поскольку было обнаружено, что SAMMSON колокализируется с митохондриями, было высказано предположение, что его участие в трафике p32 может сопровождаться его собственным импортом в митохондрии [90], что все еще требует подтверждения с помощью альтернативных методов.

Малые некодирующие РНК (микроРНК) представляют собой молекулы РНК, длиной 18-25 нуклеотидов, принимающие участие в транскрипционной

и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции [92]. Изначально микроРНК транскрибируются как первичные микроРНК, которые затем процессируются в ядре комплексом DROSHA/DGCR8 в предшественники пре-микроРНК, экспортируются в цитоплазму и далее разрезаются ферментом DICER1 до зрелых микроРНК. Образовавшиеся микроРНК взаимодействуют с РНК-связывающим белком Argonaute 2 (AGO2), компонентом RISC-комплекса, и переносят комплекс miRISC (RISC, содержащий микроРНК) на мРНК-мишень, обычно путем отжига с определенной областью в 3'UTR мРНК. Количество обнаруженных микроРНК, локализованных в митохондриях, за последнее время резко возросло, во-первых, благодаря RT-qPCR и анализу на основе микроскопии, во-вторых, за счет растущего числа методов секвенирования нового поколения. В то время как большинство митохондриальных miRNAs, по-видимому, кодируются ядром и импортируются внутрь митохондрий или связаны с внешней митохондриальной мембраной, предполагается, что некоторые miRNAs продуцируются с самой мтДНК [93–95]. Посредством *in silico* анализа было выявлено множество предполагаемых сайтов связывания miRNA на митохондриальной ДНК [93]. Однако механизм действия микроРНК во внутреннем компартменте митохондрий неясен, поскольку митохондриальные мРНК не содержат 3'UTR и только один компонент RISC - AGO2 - предположительно локализуется в митохондриальной матрице [95–97]. В самом деле, было обнаружено, что некоторые микроРНК, локализованные в митохондриях, усиливают синтез избранных митохондриальных белков вместо его ингибирования. Например, miR-1 может стимулировать трансляцию мРНК *mtND1* и *mtCOXI* AGO2-зависимым образом, что является крайне важным для дифференцировки мышц у мышей [97]. Напротив, предполагается, что miR-181c подавляет экспрессию *mtCOXI* в сердце крысы, [96,98], а miR-378 подавляет экспрессию *mtATP6* в клетках HL-1 мыши [99]. Можно ожидать другие неканонические функции

митохондриальных микроРНК, однако убедительная демонстрация соответствующих молекулярных механизмов, трудна. Учитывая то, что микроРНК могут влиять на экспрессию ядерных генов, участвующих в биогенезе и функционировании митохондрий, исключить такие косвенные эффекты, вызванные их каноническим действием в цитозоле, совсем непросто.

1.2 Мутационная нагрузка и гетероплазмия митохондриального генома

Принято считать, что близость комплексов ОФ и отсутствие гистонов на мтДНК делает геном митохондрий чрезвычайно уязвимым к воздействию активных форм кислорода (АФК) и увеличивает скорость образования мутаций в 10-100 раз выше по сравнению с ядерным геномом [100–103]. Однако в исследовании Larsson et.al [104], рассуждая о природе возникновения митохондриальных мутаций, было продемонстрировано, что увеличение уровня АФК в органеллах не повлияло на количество *de novo* возникших мутаций в митохондриальном геноме. Более того, изученные точечные мутации мтДНК в большинстве случаев были по типу транзиции, что является явным результатом ошибки POLG полимеразы в процессе репликации. Исходя из этого можно предполагать, что основным фактором, индуцирующим мутагенез мтДНК, является некорректная работа репликативного аппарата митохондрий. Но несмотря на убедительность полученных данных, они не исключают влияния активных форм кислорода, незначительной межмолекулярной рекомбинации и рудиментарного механизма репарации мтДНК на возникновение мутаций в митохондриальном геноме [103].

Независимо от причины возникновения мутаций, дефектные копии мтДНК могут сосуществовать с молекулами мтДНК дикого типа в одной клетке. Подобный феномен смеси различных типов мтДНК в пределах одной митохондрии получил название гетероплазмия. Считается что в зависимости от мутации, типа клеток и ткани критическим значением для манифестации

митохондриального заболевания является от 60-90% копий мтДНК с мутацией [105]. Данное значение было названо пороговым эффектом гетероплазмии. Наиболее значимым фактором, определяющим, каким будет пороговый эффект, является дифференциальная чувствительность различных органов к физиологическим изменениям митохондрий. Пороги в высокоаэробных тканях, таких как мышцы, сердце и ЦНС, обычно ниже, чем в других тканях [106]. Помимо тканеспецифического порогового уровня гетероплазмии, описаны данные утверждающие, что порог для точечных мутаций мтДНК (> 80%) значительно выше, чем пороговый эффект для делеций мтДНК (> 60%) [107,108].

До недавних пор предполагалось, что гетероплазмия митохондриального генома встречается крайне редко, и, соответственно, пороговый уровень достигается за счет клональной экспансии, приобретенных в ходе индивидуального развития, мутантных молекул мтДНК [109]. Однако с помощью метода ультра-глубокого ресеквенирования было выявлено, что у большинства людей, независимо от возраста, присутствует низкочастотная гетероплазмия во многих тканях [110,111]. Универсальность и распространенность гетероплазмии невозможно объяснить только событиями спонтанного мутагенеза в раннем возрасте. Часть гетерогенной мтДНК наследуется, о чем свидетельствует то, что некоторые из низкочастотных аллелей, обнаруженных у потомства, присутствуют также и у матери [112]. Однажды возникнув, соматические или наследственные мутации могут либо достичь порогового уровня в течении жизни [113], либо передаваться из поколения в поколение, оставаясь при этом на низком уровне, либо вовсе элиминироваться в какой-то момент. Это говорит о том, что уровень гетероплазмии динамичен, а характер сегрегации гетероплазматических генотипов мтДНК весьма непредсказуем.

Впервые феномен сдвига гетероплазмии в течение одного поколения был обнаружен у коров голштинской породы [114]. Подобное явление чаще всего связывают с эффектом бутылочного горлышка, которое проходят клетки зародышевого пути. Так, снижение пула мтДНК от 100 000 копий в оплодотворенном ооците до 200 в примордиальной зародышевой клетке [115–118], способствует сегрегации избранных молекул мтДНК. В настоящее время теория бутылочного горлышка получила свое подтверждение на многих модельных организмах, в том числе и на примере ранней стадии развития эмбриона человека [103,117]. Математическое и статистическое моделирование показало, что снижение содержания мтДНК внутри клеток зародышевой линии достаточно, для серьезного сдвига уровня гетероплазмии между матерью и потомством [119–121]. При этом модель бутылочного горлышка предсказывает лишь стохастическую сегрегацию мтДНК, во время эмбриогенеза, не учитывая то, что уровень гетероплазмии может значительно модулироваться иными внутриклеточными механизмами в ходе индивидуального развития.

На скорость генетического дрейфа мтДНК может влиять вегетативная сегрегация митотических клеток, преимущественная репликация определенных субпопуляций мтДНК, субкомпартиментализация мтДНК в отдельные гомоплазматические кластеры и ряд иных, не изученных факторов и процессов [115,122,123]. Более того, не исключено влияние внутриклеточного контроля качества митохондрий на дальнейшую клональную экспансию определенных вариантов мтДНК. Хотя точно выяснить, какой из механизмов является наиболее значимым пока не представляется возможным, очевидно, что вместе эти процессы могут приводить к изменениям внутриклеточного уровня гетероплазмии в ходе онтогенеза, и, возможно, к манифестации митохондриального заболевания.

митохондрий (гены рибосомальных и транспортных РНК). Красным показаны заболевания человека, возникающие в результате мутаций в белок-кодирующих генах мтДНК. ЕСМ - энцефаломиопатия; FBSN - семейный билатеральный стриарный некроз; LHON - наследственная оптическая нейропатия Лебера; LS – синдром Лея; MILS – синдром Лея с наследованием по материнской линии; MELAS - митохондриальная энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультоподобные эпизоды; MERRF - миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами; NARP-нейропатия, атаксия и пигментный ретинит; PEO - прогрессирующая внешняя офтальмоплегия; PPK - ладонно-подошвенные кератодермии; SIDS - синдром внезапной детской смерти.

С появлением методов секвенирования, поиск полиморфизмов в мтДНК заметно упростился, но определение фенотипа обнаруженной мутации остается сложной комплексной задачей по сей день. Встречаются случаи, когда проявление определенного клинического синдрома обусловлено не одним, а сразу несколькими точечными мутациями в разных положениях мтДНК. Так, более 95% случаев наследственной оптической нейропатии Лебера (LHON) являются результатом миссенс-мутаций в генах, кодирующих первую субъединицу дыхательной цепи, в позициях mt.3460 G> A, mt.3697G> A, mt.4171C>A (*mtND1*), mt.11778G> A (*mtND4*), mt.14484T> C (*mtND6*) в мтДНК [126–128]. Большая часть полиморфизмов, ассоциированных с нейропатией Лебера приводят к манифестации синдрома лишь в состоянии гомоплазмии, однако замена mt.14459G> A обнаруженная в гаплогруппе D мтДНК у коренных американцев [129] может также фенотипически проявляться при превышении порога в 80% [130]. Клинически LHON характеризуется дегенерацией ганглиозного слоя сетчатки и атрофией зрительного нерва [131]. Неожиданной особенностью LHON является ее гендерная предрасположенность в популяции, т.е. при равновероятном наличии патогенной мутации большая часть пациентов, страдающих от двусторонней потери остроты зрения, будут являться мужчинами (~50%) и только 10% от всего числа носителей мутации- женщинами [126]. Подобная неполная пенетрантность и гендерная предрасположенность вероятнее всего

подразумевает дополнительные митохондриальные и/или ядерные генетические факторы, модулирующие фенотипическое проявление LHON.

Другой пример миссенс-мутации, затрагивающий структурный ген мтДНК, представлен заменой mt.8993T> G, реже mt.8993T> C, в гене 6-ой субъединицы АТФ-синтазы [132]. Замена аминокислоты, кодирующей лейцин на аргинин в 156 положении F1F0-АТФ-синтазы вызывает снижение тока протонов через АТФ-синтазу митохондрий и разобщение дыхательной цепи [133,134]. Фенотипически мутация проявляется в виде невропатии, атаксии и пигментной ретинопатии, известной как синдром NARP. Помимо NARP, замены в позиции 8993 мтДНК приводят к тяжелому нейрометаболическому синдрому Лея, поражающему ЦНС [135,136]. Решающим фактором характера манифестации мутации является уровень гетероплазмии: при содержании мутантных копий мтДНК выше 78% клинически проявляются неврологические нарушения и расстройство зрения, характерное для NARP, при повышении количества дефектных копий мтДНК до 90-95% развивается Болезнь Лея. Другие мутации мтДНК, такие как mt.4296G> A (*mPHK^{lle}*) [137], mt. 5523T> G и mt.5559A> G (*mPHK^{Trp}*) [138], mt.13513G> A (*mtND5*) [139], mt.13514A> G (*mtND5*) [140], mt.9191T> C (*mtATP6*) [141] и mt.9478T> C (*mtCOIII*) [138], согласно литературным данным, также ассоциированы с синдромом Лея [142]. Подобные варианты встречаются в популяции гораздо реже, по сравнению с полиморфизмом mt.8993T> G, пенетрантность которого равна от 1 до 9 пациентов с синдромом NARP на 100 000 человек (по данным базы данных Orphanet).

Нуклеотидные замены в генах, участвующих в биосинтезе белка митохондрий, являются распространенной причиной миопатий и нейродегенеративных патологий человека. Замена mt.8344A> G в гене, кодирующем транспортную РНК лизина, является главной причиной миоклонической эпилепсии с рваными мышечными волокнами (синдром

MERRF) [143], а также вызывает наследуемый по материнской линии синдром сахарного диабета и глухоты (MIDD), и прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию (PEO) [144]. Клиническая манифестация патологических симптомов представленных заболеваний происходит при количественном преобладании копий мтДНК, несущих мутацию, более 60% над молекулами дикого типа [102,145].

В основе патогенеза синдрома MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультоподобные эпизоды) лежат точечные мутации мтДНК, преимущественно затрагивающие транспортные РНК: тРНК^{Leu} (mt.3243A>G и mt.3271T>C) и тРНК^{Val} (mt.1642G>A) [146]. По данным исследования V. Nesbitt et al. (2013), точечная мутация mt.3243A>G вызывает широкий спектр клинических фенотипов. Так, в когорте из 129 пациентов с митохондриальными заболеваниями у 10 % был выявлен классический фенотип MELAS, у 30 % — MIDD, у 6 % — сочетание симптомокомплексов MELAS / MIDD, у 2 % — MELAS / CPEO, у 5 % — MIDD / CPEO, у 6 % — PEO и другие митохондриальные фенотипы, не соответствующие известным синдромам. У 3 % пациентов наблюдалась изолированная нейросенсорная глухота, у 8% — клинические признаки, не соответствующие какому-либо из классических митохондриальных синдромов, у 9 % — симптоматика полностью отсутствовала [147,148]. Подобная переменная пенетрантность и вариабельность синдромов, вызываемых одним и тем же полиморфизмом, обусловлена не только уровнем гетероплазмии для каждого конкретного случая, но и иными генетическими, экологическими и эпигенетическими факторами, влияющими на определение клинического фенотипа мутации [149].

Делеции мтДНК были первыми описанными дефектами митохондриального генома [150] и по сей день являются наиболее распространенными мутациями мтДНК, составляя приблизительно четверть

от всех заболеваний человека, вызванных изменениями в структуре митохондрий [151,152]. Обычно делеции мтДНК могут быть размером от 1.8 до 8 кб и возникать в любом месте митохондриального генома, независимо от функции и структуры гена [149,153,154]. В некоторых исследованиях была продемонстрирована предрасположенность определенных участков мтДНК к возникновению делеций [143,155–157]. Помимо этого, возникновение делеций в мтДНК может быть связано с наследственными мутациями в ядерных генах, чьи продукты участвуют в поддержании и репликации мтДНК (например, POLG и Twinkle) и в переносе АТФ через мембраны митохондрий (например, SLC25A4) [107,158–160].

В отличие от точечных мутаций, патогенные делеции мтДНК зачастую возникают спорадически [153], и не передаются от поколения к поколению. За редким исключением встречаются случаи, когда одна и та же структурная перестройка мтДНК встречалась как у родителей, так и у одного из родившихся детей. Так, по данным анализа 226 семей, среди которых хотя бы один из членов семьи страдал от хронической прогрессирующей наружной офтальмоплегии, синдрома Кернса-Сейра либо синдрома Пирсона, было выявлено, что риск передачи дефектных копий мтДНК потомству в среднем составляет 1 случай из 24 родившихся детей [161]. Вполне возможно, что имеется некая закономерность в передаче пула дефектных молекул мтДНК потомству, но из-за отсутствия единой гипотезы селективного отбора митохондриального генома, понять данную закономерность пока не представляется возможным.

Среди синдромов, вызванных делециями мтДНК, часто встречаются синдром Кернса-Сейра (KSS), синдром Пирсона (PS) и прогрессирующая внешняя офтальмоплегия (сокращенно СРЕО) [150]. Считается, что наиболее распространенная делеция размером 4977 п.н (8488-13460 п.н.) мтДНК может вызывать любой из трех представленных клинических синдромов [107,162].

Чаще всего при синдроме Пирсона высокий уровень мутантной мтДНК обнаруживается во всех тканях, особенно в крови, в первый период жизни ребенка и зачастую приводит к летальному исходу пациента [163]. Если же пороговое значение гетероплазмии было преодолено в подростковый период (до 20 лет) фенотипически развивается мультисистемный синдром Кернса-Сейра, характеризующийся прогрессирующей миопатией и офтальмоплегией [154]. Для хронической прогрессирующей внешней офтальмоплегии нет конкретного возраста начала заболевания поскольку точные первичные симптомы СРЕО трудно отличить от других митохондриальных патологий. До сих пор не установлено, что определяет клиническое течение митохондриальных заболеваний, ассоциированных с делециями [161], но предполагается, что есть корреляция между возрастом манифестации заболевания и клональной экспансией делетированных молекул [164,165].

1.4 Терапевтические методы предотвращения передачи мутантных копий мтДНК в ряду поколений

Прогрессирующие с возрастом митохондриальные заболевания, на сегодняшний день не имеют единого определения и относятся к разным группам в классификации заболеваний человека согласно международной классификации заболеваний человека всемирной организации здравоохранения (ICD-11). Отсутствие единой этиологии и патогенеза митохондриальных патологий создаёт определенные сложности в постановке правильного диагноза и выборе стратегии лечения пациента. Современное клиническое диагностирование митохондриальных патологий с применением традиционных гистохимических, иммуногистохимических и биохимических анализов в комбинации с высокопроизводительным скринингом мтДНК и яДНК заметно усовершенствовало раннюю диагностику заболеваний [149]. Однако не всегда, определив тип митохондриальной патологии, врачу-клиницисту удастся подобрать адекватную стратегию лечения пациента. По

большой части это связано с отсутствием в клинической практике эффективной терапии, останавливающей прогрессирование болезни. Пациенты проходят нейротрофическую и метаболическую терапии, направленные на временное купирование симптомов заболевания [149,166–168]. Между тем современные репродуктивные и генно-терапевтические методы позволяют не только снижать уровень гетероплазмы в соматических клетках пациента, но и предотвращать передачу патогенных копий мтДНК будущему поколению.

1.4.1 Репродуктивные методы элиминации мутантных копий мтДНК

Женщины с высоким уровнем гетероплазмы в ооцитах часто сталкиваются с проблемой бесплодия, поскольку пониженная активность комплексов окислительного фосфорилирования приводит к угнетению развития эмбриона на ранних стадиях [169,170]. Экстракорпоральное оплодотворение с предимплантационной генетической диагностикой (PGD) эмбрионов на мутационную нагрузку мтДНК успешно вошло в клиническую практику терапии митохондриальных заболеваний. В ходе данной процедуры после *in vitro* оплодотворения ооцитов с патогенной мтДНК, на ранних стадиях эмбрионального развития забирается несколько клеток эмбриона. Анализ уровня гетероплазмы в этих клетках позволяет сделать прогноз относительно риска развития митохондриального заболевания. Для рождения здорового ребенка прежде всего необходимо отобрать эмбрион, уровень гетероплазмы которого будет меньше 5% [171]. При этом предполагается, что уровень гетероплазмы мтДНК во всех клетках эмбриона является одинаковым и стабилен в ходе эмбрионального развития. Учитывая, что механизмы сегрегации мтДНК в ходе эмбрионального развития изучены не полностью, нельзя исключать возврата к исходному уровню гетероплазмы в эмбрионе в целом или отдельных тканях эмбриона. Кроме этого, некоторым женщинам PGD не подходит из-за большого количества мутантных молекул

мтДНК во всех исходных ооцитах [172]. В подобных случаях, с целью предотвращения передачи мутаций мтДНК потомству были разработаны методы митохондриальной заместительной терапии (MRT) или методы митохондриального донорства [173–175]. Испытанные изначально на животных [176–178], технологии донации митохондрий со временем стали применять для реконструкции зигот человека. Данные процедуры заключаются в переносе веретена деления (MST) [177,179] или пронуклеуса (PNT) [108] в энуклеированные ооциты или зиготы здорового донора в зависимости от используемой технологии (рисунок 6). В результате у детей, рожденных после применения митохондриальной заместительной терапии, ядерная ДНК будет от обоих родителей, но митохондрии от женщины-донора. Несмотря на ряд сообщений о рождении нескольких детей от “трех родителей” [180,181], широкое применение митохондриального донорства во многих странах до сих пор остается незаконным и связано со множеством нерешенных по сей день этических и технических проблем [182–184].

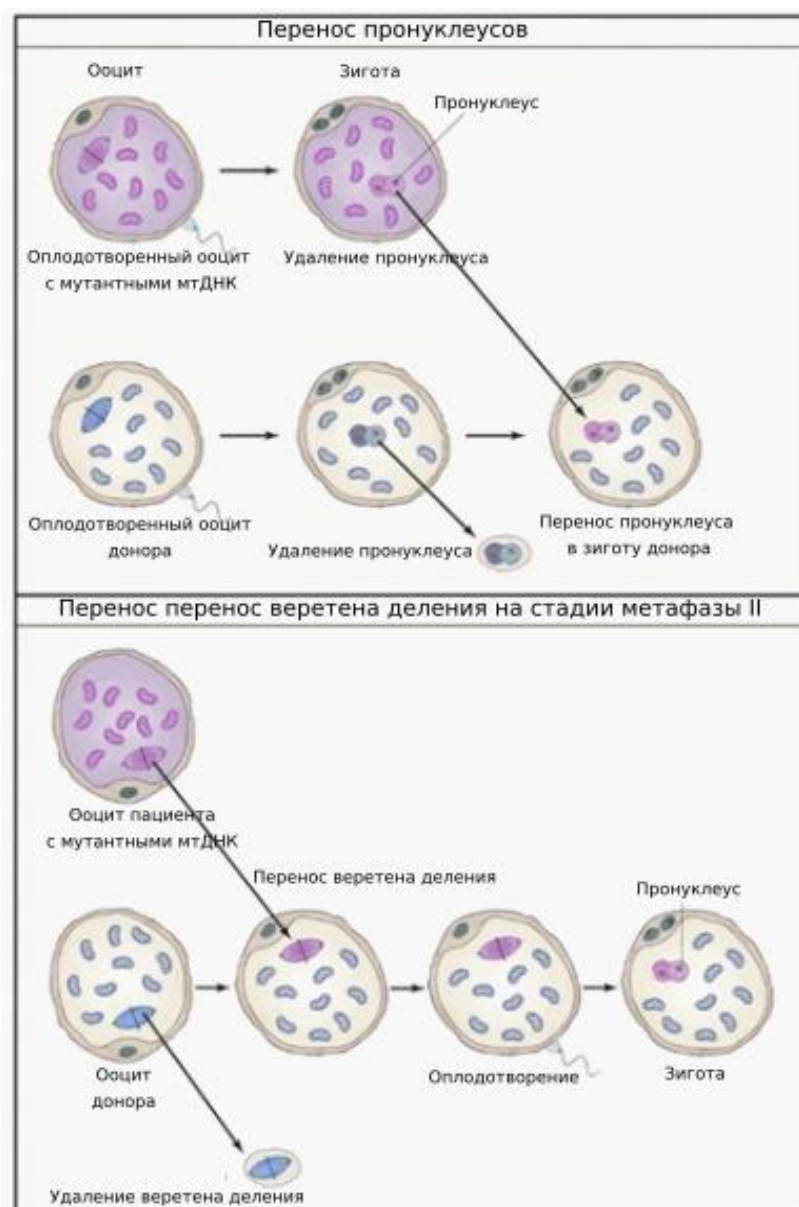


Рисунок 6. Методы митохондриальной заместительной терапии. Замена пронуклеусов (вверху) включает оплодотворение как материнских, так и донорских ооцитов и перенос мужских и женских пронуклеусов из материнского ооцита в донорский ооцит. Перенос веретена деления на стадии метафазы II (внизу) включает удаление веретена из донорского ооцита и замену веретена из материнского ооцита с последующим оплодотворением [170].

Одной из таких проблем является возврат эмбриона к патогенному типу митохондрий. Поскольку в процессе MRT с цитоплазмой захватывается менее

3% материнской мтДНК, то возврат эмбриона к патогенному типу митохондрий считается маловероятным [172,177]. Однако было показано, что около 15% эмбриональных стволовых клеток, полученных из эмбрионов после MRT в условиях *in vitro*, демонстрируют полный возврат к исходному мутантному варианту мтДНК [185–188]. Данный феномен может объясняться реципрокным взаимодействием между ядерным и митохондриальным геномом [189]. Помимо возможности возврата уровня гетероплазии мтДНК в эмбрионах после проведения митохондриальной донации, ключевым недостатком этого подхода является то, что он позволяет лишь снизить уровень гетероплазии в следующем поколении, а не предотвратить передачу мутантной мтДНК в принципе. Решением этой проблемы может быть использование технологий митохондриальной донации совместно с инструментами генной терапии [125,190].

1.5 Генно-терапевтические подходы элиминации патогенных копий мтДНК

Помимо описанных ранее особенностей митохондриального генома, еще одним важным свойством является наличие естественного механизма поддержания количества копий мтДНК в клетке. Ввиду различных причин гаплотипы мтДНК могут деградировать, приводя к снижению общего пула мтДНК в митохондриях. Преодоление критического порога влечет за собой гибель не только митохондрий, но и всей клетки [191]. Поэтому чтобы не допустить гибели клетки, гаплотипы мтДНК, не затронутые факторами деградации, активно реплицируются, тем самым восстанавливая общее количество мтДНК. Как было показано, существует большое количество факторов, инициирующих деградацию мтДНК. И если направить естественные механизмы элиминации против патогенных молекул мтДНК, то можно добиться репопуляции митохондриального генома дикого типа и соответственно восстановления нарушенных функций митохондрий. Взяв за

основу данный механизм, активно разрабатываются генно-терапевтические инструменты для смещения уровня гетероплазии. Данные инструменты могут применяться как на яйцеклетках, для предотвращения передачи патогенной мтДНК следующему поколению, так и на соматических клетках пациента для лечения митохондриальных заболеваний.

1.5.1 Анти-репликативные подходы

Одним из возможных подходов для смещения уровня гетероплазии в сторону дикого типа является селективное подавление репликации мутантной мтДНК. Впервые данный подход был протестирован *in vitro* с использованием пептид-нуклеиновых кислот (PNAs) [192]. Пептид-нуклеиновые кислоты представляют собой искусственные аналоги олигонуклеотидов, в которых сахаро-фосфатный остов заменен на псевдопептидный, состоящий из N-(2-аминоэтил)-глицина. Такая структура PNAs делает их более устойчивыми к расщеплению нуклеазами и протеазами [193], дает возможность внесения модификаций, обеспечивающих направленный импорт PNAs в матрикс митохондрий [194,195]. Также PNAs связываются с комплементарной одноцепочечной ДНК с большей афинностью по сравнению с аналогичной ДНК [196] и дуплексы PNA:ДНК с однонуклеотидными мисматчами более стабильны по сравнению с ДНК:ДНК дуплексами [197]. Используя подход *in vitro* репликации в физиологических условиях было показано, что PNAs могут селективно ингибировать репликацию одноцепочечных матриц соответствующих мтДНК с делецией или однонуклеотидной мутацией [192]. Однако ни на культуре клеток, ни на изолированных митохондриях впечатляющих результатов добиться не удалось. Несмотря на довольно эффективный импорт PNAs в матрикс митохондрий, ингибирования репликации мутантной мтДНК не происходило [194,195]. Это может объясняться неэффективностью или полным отсутствием связывания PNAs с мтДНК в матриксе митохондрий или же вытеснением связавшихся с мтДНК

PNA_s в процессе ее транскрипции или репликации. В любом случае в настоящее время PNA_s не могут быть использованы для сдвига уровня гетероплазмии. Дальнейшие исследования необходимы для поиска модификаций в структуре PNA, которые позволят повысить их эффективность связывания с целевой последовательностью ДНК в живых клетках.

Аналогичный подход для сдвига уровня гетероплазмии был разработан другой группой исследователей. Для селективного ингибирования репликации мутантной мтДНК были использованы короткие молекулы РНК, имеющие участок комплементарный целевой последовательности мтДНК. Также в структуру антирепликативных РНК встраивали F и D шпилечные структуры из транспортной РНК дрожжей (tRNA^{Lys}_{CUU}) или α и γ домены 5S рибосомальной РНК человека, которые как было показано ранее способны обеспечивать эффективный импорт РНК в митохондрии [85,198,199]. Предполагаемый механизм действия антирепликативных РНК связан с неспособностью геликазы в составе митохондриальной реплисомы смещать РНК в коротких РНК-ДНК дуплексах [50]. Было показано, что применение данного подхода на культурах цибридных клеток приводило к снижению уровня гетероплазмии по большой делеции ассоциированной с синдромом Кернса–Сейра и патогенной точечной мутации mt.13514A> G в гене *mtND5*. Необходимо отметить, что подавление репликации мутантных вариантов мтДНК вызывали лишь некоторые из протестированных РНК [200–202]. Аналогично PNA в случае применения данного подхода возникают вопросы относительно доступности одноцепочечной мтДНК в процессе репликации для связывания с антирепликативными РНК и эффективности подобного связывания.

Несмотря на большое количество работ в которых продемонстрирован импорт различных РНК в митохондрии [89], в настоящее время отсутствует единое мнение относительно молекулярных механизмов импорта

нуклеиновых кислот и того, какие функции в митохондриях они могут выполнять [203].

1.5.2 Анти-геномные подходы

Альтернативным подходом снижения уровня гетероплазии в сторону мтДНК дикого типа является специфическая элиминация патогенных вариантов мтДНК. Учитывая многокопийную природу митохондриального генома, существование механизмов поддержания количества копий мтДНК и отсутствие эффективных механизмов репарации двухцепочечных разрывов мтДНК в митохондриях [204], перспективным подходом для снижения уровня гетероплазии является направленное внесение двухцепочечных разрывов в мутантную мтДНК. После внесения двухцепочечного разрыва линейные молекулы мтДНК быстро деградируют посредством компонентов репликативной машины митохондрий (мтДНК полимеразы γ , ДНК геликазы Twinkle, и экзонуклеазы MGME1) [205], что приводит к сдвигу гетероплазии. Для внесения двухцепочечного разрыва в ДНК могут быть использованы различные нуклеазы. Так как большая часть белков необходимых для функционирования митохондрий кодируются ядерной ДНК, в процессе эволюции сформировались эффективные механизмы импорта белков через внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий посредством TIM/TOM комплекса. Присутствие пептида соответствующего последовательности митохондриального таргетинга (MTS) на N-конце белка обеспечивает его импорт в митохондрии [206]. Таким образом, добавив MTS к ферменту способному специфически узнавать мутантную мтДНК и вносить в нее двухцепочечный разрыв, можно снизить уровень гетероплазии. Этот принцип используется практически во всех работах связанных с разработкой инструментов для направленной элиминации патогенной мтДНК и именно анти-геномные подходы в настоящее время являются наиболее

перспективными для лечения заболеваний возникающих в результате мутаций в мтДНК.

Впервые данный подход был использован для манипуляции уровнем гетероплазии в работе Srivastava и Moraes et al. [207]. В этой работе использовалась эндонуклеаза рестрикции PstI с сигналом митохондриальной локализации COX8A. На примере цибридной клеточной линии содержащей мтДНК крысы и мыши, которые отличаются по количеству сайтов PstI, было показано, что применение модифицированной эндонуклеазы рестрикции (mitoER) приводило к значительному сдвигу уровня гетероплазии. Мутация mt.8993T>G в гене *mtATP6* приводит к появлению сайта узнавания эндонуклеазы SmaI. Эта особенность была использована для специфической деградации мутантной мтДНК при помощи эндонуклеазы рестрикции SmaI с сигналом митохондриальной локализации [208]. Транзientная экспрессия модифицированной эндонуклеазы SmaI в цибридных клетках приводила к снижению уровня гетероплазии по мутации mt.8993T>G, а также восстановлению продукции АТФ и мембранного потенциала. Таким образом в этих работах были представлены данные, подтверждающие эффективность использования подхода на основе модифицированных эндонуклеаз для снижения уровня гетероплазии и возможность потенциального использования данного подхода для терапии митохондриальных заболеваний.

Несмотря на перспективные результаты применение данного подхода для сдвига уровня гетероплазии ограничено лишь мутациями в мтДНК которые создают уникальный сайт узнавания соответствующей рестриктазы. Хотя до сих пор и выявляют новые полиморфизмы мтДНК, ассоциированные с различными заболеваниями, лишь малая часть из них может стать мишенью для модифицированных эндонуклеаз рестрикции. Также необходимо учитывать, что ядерный геном содержит большое количество сайтов узнавания рестриктаз. Поэтому нельзя исключать неспецифического действия

модифицированных рестриктаз на ядерную ДНК, в результате чего могут появиться нежелательные мутации.

Частично преодолеть эти проблемы позволяют нуклеазы с митохондриальной локализацией. Разработанные изначально для редактирования ядерного генома цинковопальцевые нуклеазы (ZFNs) [209] и нуклеазы на основе TALE белков (TALENs) [210] были адаптированы для элиминации патогенных вариантов мтДНК. Такие нуклеазы состоят из трех основных частей слитых в единый белок: сигнала митохондриальной локализации, ДНК-связывающего и нуклеазного доменов [211,212]. В качестве сигнала митохондриальной локализации, как и в случае модифицированных рестриктаз, используются пептиды из белков импортируемых в митохондрии в естественных условиях [213]. Нуклеазный домен соответствует FokI нуклеазе, которая неспецифически вносит двухцепочечный разрыв в ДНК [214]. Специфичность связывания искусственных нуклеаз с патогенными вариантами мтДНК обеспечивается посредством ДНК-связывающего домена из бактериального белка эффектора подобного активатору транскрипции (TALE) в случае митохондриально-направленных TALENs (mitoTALENs) [211] или за счет ДНК-связывающего домена типа “Цинковые пальцы” в случае митохондриально-направленных ZFNs (mtZFNs) [212]. ДНК-связывающий домен типа “Цинковые пальцы” часто встречается в составе транскрипционных факторов [215] поэтому в его структуре как правило содержится сигнал ядерной локализации [216] который должен быть удален для эффективного импорта mtZFN в митохондрии и снижения риска неспецифического расщепления ядерной ДНК [217]. Важной особенностью mtZFNs и mitoTALENs является возможность конструировать ДНК-связывающий домен связывающийся практически с любой последовательностью нуклеотидов [218], что значительно расширяет спектр патогенных мутаций в мтДНК для элиминации которых могут применяться эти инструменты. mtZFNs и mitoTALENs были успешно использованы для

сдвига уровня гетероплазии как в случае точечных мутаций, так и в случае делеций в мтДНК, причем сдвиг гетероплазии приводил к восстановлению нарушенных мутациями функций митохондрий [3,190,211,212,219,220]. К недостаткам mtZFNs и mitoTALENs можно отнести сложность конструирования ДНК связывающих доменов, которые состоят из повторяющихся высококонсервативных аминокислотных последовательностей в случае mitoTALENs, и необходимостью тестирования комбинации ZF модулей для получения ДНК связывающего домена способного специфически и эффективно связываться с целевой последовательностью ДНК в случае mtZFNs (рисунок 7).

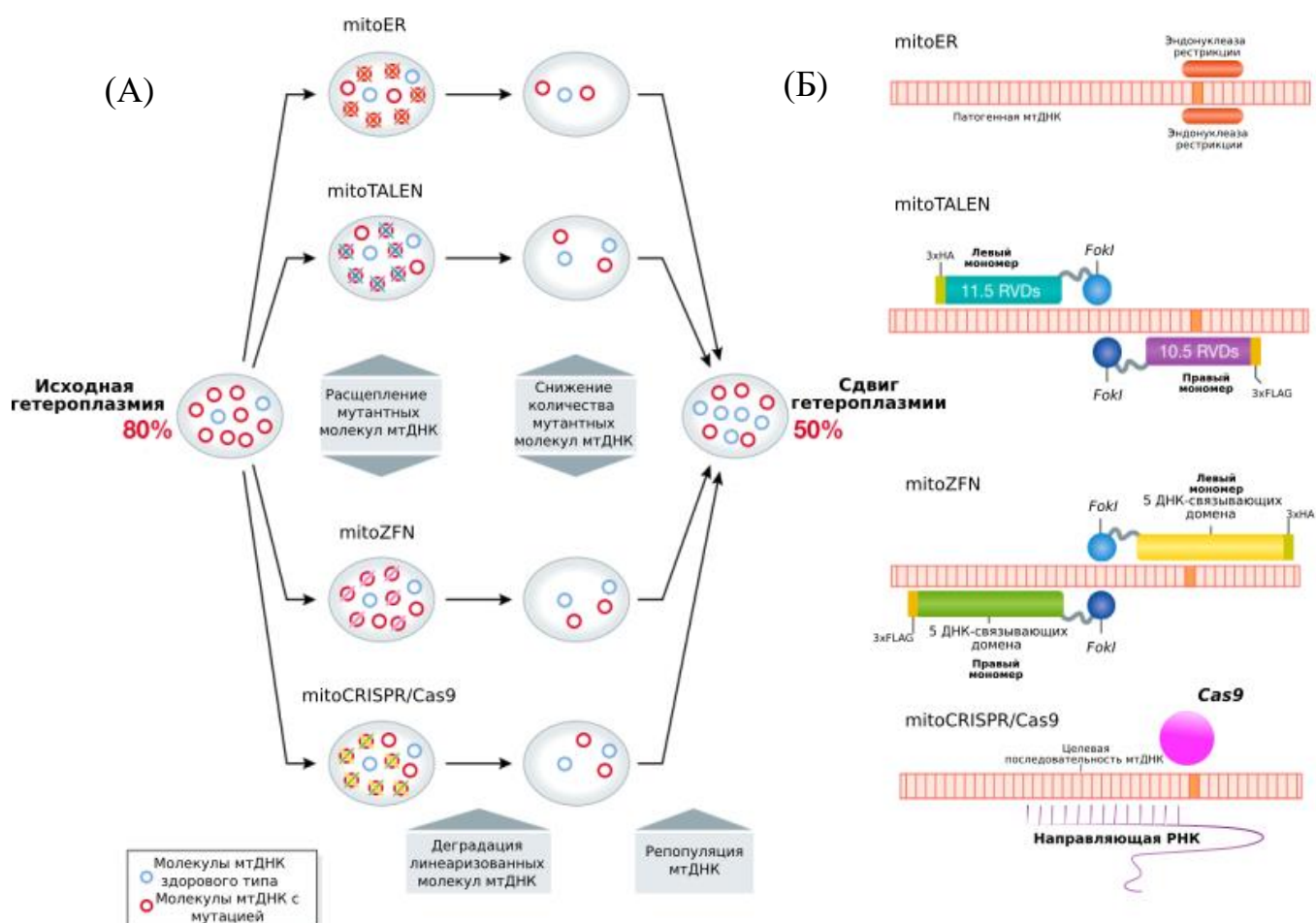


Рисунок 7. Манипуляция уровнем гетероплазии мтДНК с применением различных искусственных нуклеаз. (А) Принцип смещения уровня гетероплазии в митохондриях. Исходное соотношение мутантных и «здоровых» копий мтДНК быстро сдвигается в результате обработки сайт-направленными нуклеазами. В ходе элиминации большого

количества молекул мтДНК может последовать временное истощение общего пула мтДНК, которое вскоре восстанавливается в ходе репликации оставшихся копий, что влечет за собой улучшение биоэнергетических показателей митохондрий. (Б) Нуклеазы, применяемые и разрабатываемые, для нацеленной элиминации мтДНК несущих мутацию. mitoRE - эндонуклеаза рестрикции с митохондриальной локализацией; mtZFN - нуклеаза "цинковые пальцы" с митохондриальной локализацией; mitoTALEN – TALE нуклеазы, импортируемые в митохондрии; mitoCRISPR/Cas9 – система CRISPR/Cas9, импортируемая в митохондрии; FokI – эндонуклеаза рестрикции; RVD - repeat variable diresidue; HA и 3xFLAG – эпитопы [99].

Все вышеописанные нуклеазы представляют собой искусственные белки поэтому связывание с целевой последовательностью мтДНК происходит за счет ДНК-белковых взаимодействий. В относительно недавно разработанной и наиболее часто используемой технологии редактирования ядерного генома CRISPR/Cas9 для таргетинга Cas9 нуклеазы к целевому месту генома используется направляющая РНК [221]. Распознавание целевой последовательности ДНК происходит на основе взаимодействий по принципу Вотсона-Крика, что делает данную систему более специфичной. Кроме этого технология CRISPR/Cas9 оказалась более эффективной для редактирования генома, а также более гибкой и простой в конструировании gRNA против целевой последовательности ДНК [222]. Поэтому не удивительно, что во многих лабораториях по всему миру, включая нашу, ведутся работы по адаптации технологии CRISPR/Cas9 для элиминации мутантной мтДНК и редактирования митохондриального генома. В настоящее время по этой теме подготовлено или уже опубликовано несколько работ [223–229], однако убедительно продемонстрировать эффективную работу модифицированной системы CRISPR/Cas9 в митохондриях пока никому не удалось. Существует даже мнение, что данную систему в принципе не получится адаптировать для элиминации патогенной мтДНК [203]. Аналогично антирепликативным РНК такой скептицизм вызван отсутствием информации о молекулярных

механизмах импорта РНК в митохондрии. Однако работы в данной области не прекращаются и разрабатываются альтернативные способы доставки РНК в митохондрии.

Совершенно иной подход, опирающийся на белковую систему импорта, заключается в использовании в качестве носителей ДНК вирусных частиц, в частности, аденоассоциированного вируса второго типа (AAV2) [230–233]. Один из капсидных белков вируса был модифицирован детерминантой импорта субъединицы VIII цитохром с-оксидазы (COX8A-MTS), что позволило вирусной частице проникать внутрь митохондрий, доставляя туда свой геном. При использовании данного подхода в цитоплазматической гибридной клеточной линии человека, несущей патогенную мутацию mt.11778A>G, происходило восстановление синтеза АТФ. Таким образом утверждать о невозможности адаптации системы CRISPR/Cas9 для элиминации мутантной мтДНК и редактирования митохондриального генома млекопитающих еще рано, поскольку вопрос о доставке компонентов системы остается актуальным.

1.6 Краткое заключение

С момента секвенирования митохондриального генома прошло более 30 лет. За прошедшее время, исследователям удалось установить не только структуру, функциональные и генетические особенности мтДНК, но и определить патогенетические пути, в которых митохондрии играют непосредственную роль. Признание митохондрий в качестве основного биохимического центра клетки стало основой для исследований генома митохондрий и клинических проявлений, связанных с изменениями в мтДНК человека.

Как было установлено, мутации, возникающие в мтДНК, зачастую являются причиной тяжелых нейромышечных и нейродегенеративных

заболеваний, для которых в настоящее время нет эффективных методов лечения.

До открытия систем редактирования генов, были предприняты попытки по лечению митохондриальных заболеваний путем митохондриальной донации. Первые опыты по трансплантации здоровых митохондрий в яйцеклетки либо ооциты пациента, несущего высокую долю дефектных митохондрий, привели к появлению на свет здоровых приматов, а после и здоровых детей, от родителей, страдающих митохондриальными заболеваниями. Но несмотря на достигнутый успех, в ходе дальнейших детальнейших исследований было обнаружено что около 15% стволовых клеток, полученных из эмбрионов после донации митохондрий в условиях *in vitro*, демонстрируют полный возврат к исходному мутантному варианту. Предотвращения реверсии эмбрионов к исходному типу можно добиться, используя инструменты генной терапии в митохондриях непосредственно после переноса веретена или пронуклеуса для полной элиминации патогенных видов мтДНК.

Перепрограммированные белковые системы редактирования генома, эндонуклеазы рестрикции, ZFN и TALEN, уже продемонстрировали высокую эффективность в митохондриях млекопитающих. Но применение подобных систем имеет ряд ограничений, в первую очередь связанных с адаптацией компонентов систем под разные мутации мтДНК, вероятность внесения неспецифических мутаций в ядерный геном и сложность конструирования данных систем. Учитывая то, что на сегодняшний день уже выявлено более 330 мутаций мтДНК человека и это число постоянно увеличивается [125], возникла необходимость разработки более гибкой и мобильной платформы, не отличающейся по своей эффективности от белковых предшественников. Изначально выявленная как система защиты бактерий и архей от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей чужеродной ДНК, технология CRISPR/Cas9 зарекомендовала себя в качестве эффективного и

многофункционального инструмента в области редактирования ядерного генома практически любого организма. Все присущие характеристики и возможности системы CRISPR/Cas9 делают ее перспективным инструментом и в области генетической инженерии митохондрий.

Несмотря на отсутствие единого мнения о существовании эндогенного механизма импорта нуклеиновых кислот в митохондрии млекопитающих, мировое научное сообщество не останавливается в поисках доставки направляющей РНК (компонента системы CRISPR/Cas9) в митохондрии. Открытие подобного механизма даст сильный толчок в изучении фундаментальных процессов функционирования митохондрий. А адаптация CRISPR/Cas9 в свою очередь будет способствовать развитию новых подходов в лечении митохондриальных заболеваний.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Конструирование векторов для экспрессии компонентов системы MitoCRISPR/Cas9

2.1.1 Дизайн и сборка плазмидных конструкций, экспрессирующих направляющую РНК на мутацию mt.8993T>G мтДНК

Для целевого импорта gRNA в митохондрии млекопитающих в 3'-структурную часть gRNA были введены специфические детерминанты импорта нуклеиновых кислот в митохондрии (HF, HD, MRP, RP) [87,234–236],

Подбор последовательности спейсера направляющей РНК на целевой участок мтДНК (8305-9931 п.о.) осуществляли *in silico* на онлайн-платформе Benchling (<https://benchling.com/>). Карты всех плазмидных векторов были построены с помощью программного обеспечения SnapGene (<https://www.snapgene.com/>). Для сборки gRNA экспрессирующей плазмиды, олигонуклеотиды gRNA с перекрывающимися концами, гибридизовали и встраивали в вектор экспрессии gRNA_Cloning Vector (Addgene, 41824) методом бесшовной сборки по Гибсону (последовательности олигонуклеотидов в приложении 1). Правильность ориентации встройки подтверждали с помощью стандартной ПЦР с Taq ДНК-полимеразой. Все конструкции, несущие модификации в шпильке gRNA были проанализированы *in silico* для предсказания вторичной структуры с использованием программы RNAfold из пакета ViennaRNA [237].

2.1.2 Дизайн и сборка генетических конструкций, экспрессирующих нуклеазу Cas9

Карта плазмидного вектора pSBbi-GP-MitoCas9 была построена с помощью программного обеспечения SnapGene. Фрагмент 596-4899 п.н. ранее полученной в нашей лаборатории плазмиды pMitoCas9 [238]

амплифицировали с применением высокоточной полимеразы Q5 и олигонуклеотидами, несущими на 3'-концах сайты для фермента рестрикции SfiI. Продукт ПЦР очищали с помощью набора diaGene (Диаэм, Россия) для элюции ДНК из агарозного геля. Очищенный продукт и донорный вектор pSBbi-GP (AddGene, 60511) гидролизовали с помощью эндонуклеазы рестрикции SfiI и затем проводили реакцию лигирования продуктов гидролиза. Правильность ориентации встройки подтверждали с помощью стандартной ПЦР с Taq ДНК-полимеразой.

2.2 Методы работы с клеточными культурами

2.2.1 Культивирование клеточных линий

Цибридные клеточные линии NARP-3-1 и NARP3-2, содержащие мутацию mt.8993T>G в гене mtATP6 в состоянии гетероплазмии приблизительно 98% и 60% соответственно, были любезно предоставлены профессором М. Танака (Кафедра генной терапии, Международный Институт биотехнологии (Гифу, Япония)). Клетки NARP-3-1, NARP3-2 и их трансгенные производные линии NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 культивировали в питательной среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Invitrogen, США), 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина 1:1 (invitrogen, США), 0,11 мг/мл пирувата (Sigma, США) и 0,1 мг/мл уридина (Sigma, США), в качестве АТФ-субстрата.

2.2.2 Трансфекция клеточных линий

Трансфекцию клеточных линий осуществляли с помощью реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

2.2.3 Получение стабильных трансгенных клеточных линии

Для получения клеток со стабильной экспрессией нуклеазы MitoCas9 (ген Cas9 с сигналом митохондриальной локализации MTS-COX8A на 5'-конце), цибридные клетки трансфицировали компонентами системы Sleeping Beauty [239] в 6-луночных планшетах при 60-80% конфлюентности монослоя. Для этого смешивали в одной пробирке 2 мкг плазмидной ДНК, которая содержит 1,9 мкг плазмиды, экспрессирующей транспозон - MitoCas9 (pSBbi-GP-MitoCas9), со 100 нг вектора, кодирующего транспозазу SB100X (Addgene, 34879). Для позитивной селекции клеток, экспрессирующих MitoCas9, через 48 часов после трансфекции в культуральную среду добавляли антибиотик пурамицин (Gibco, США) в концентрации 1 мкг/мл. Селекцию проводили в течение 7 суток. После селекции трансгенные клетки наращивали для дальнейшего субклонирования. Отбор GFP-позитивных клонов осуществлялся с помощью автоматизированной системы для работы с клетками и колониями Aviso CellSelector (ALS, США). Из полученных трансгенных клеткок выделяли тотальную ДНК, для оценки уровня гетероплазмии мтДНК, и анализировали эффективность экспрессии конструкций по средней интенсивности флуоресценции GFP с помощью проточной цитофлуорометрии, используя BD FACS AriaII (BD Biosciences, США).

2.2.4 Иммуноцитохимия

Цибридные клеточные линии NARP-3-1 и NARP3-2 и их трансгенные производные линии NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 выращивали на покровных стеклах 15×15 мм в 12-луночных планшетах. При достижении 70-80% конфлюентности монослоя, клетки трансфецировали вектором pTagRFP (Evrogen, FP147) для визуализации митохондрий. Через 48 ч. после трансфекции клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером

(PBS) и фиксировали в течение 15 мин. при 37°C в 4% растворе параформальдегида (Диаэм, Россия), приготовленном на PBS. После фиксации покровные стекла промывали 2 раза по 3 мин. раствором PBS и обрабатывали 0,25% раствором Triton X-100 (Sigma, США) в PBS в течение 10 минут при комнатной температуре. Для блокирования неспецифического связывания антител клетки промывали 2 раза по 5 минут и затем инкубировали в течение 30 мин. с 10% раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере при 37°C. Для детекции нуклеазы MitoCas9, содержащей эпитоп 3xFLAG, клетки инкубировали с первичными моноклональными антителами anti-FLAG M2 (F1804, Sigma) в разведении 1:500 в 3% BSA при 37°C в течение двух часов. После двукратной промывки раствором PBS в течение 5 минут, в лунки добавляли вторичные антитела (Life Technologies, США), конъюгированные с Alexa Fluor 488 в разведении 1:500 в 3% BSA на PBS и инкубировали при 37°C в течение 45 мин. Клетки промывали 3 раза по 5 мин. буфером PBS, затем под покровное стекло наносили раствор ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies, США), для окрашивания ядер и предотвращения выгорания флуорохромов. Изображения получали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Германия) в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

2.2.5 Тест на колокализацию

Степень совместной локализации двух объектов определяется количеством совместно локализованных пикселей, полученных путем последовательного сканирования объекта в разных каналах (красный и зеленый канал). Коэффициент корреляции Пирсона (PCC) был рассчитан с использованием программного обеспечения ZEN 2010 (<https://www.zen.com/>). Пороговое значение высчитывалось автоматически для каждого изображения по Costes [240]. Анализы совместной локализации проводили на нескольких

клетках и оптических срезах. Данные PCC представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Валидацию метода колокализации проводили с применением изображений, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, из источника эталонного теста колокализации The Colocalization Benchmark Source (CBS) (www.colocalization-benchmark.com/).

2.2.6 Просвечивающая электронная микроскопия

Подготовку клеток для просвечивающей электронной микроскопии проводили в соответствии с ранее описанной процедурой [241]. Для ультраструктурного анализа клетки, выращенные в культуральной среде на пленках-подложках Melinex (Agar scientific, Великобритания), фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом на 0.1М натрийкаодилатном буфере (pH 7,2) в течение часа при комнатной температуре. После фиксации клетки отмывали в том же буфере и проводили постфиксацию 1%-ным раствором тетраоксида осмия. Отмывку от осмия проводили дистиллированной водой. Затем клетки инкубировали в 1%-ном водном растворе уранилацетата при +4°C в течение ночи. После отмывки клетки дегидратировали в этаноле возрастающей концентрации и ацетоне, затем в смеси ацетона и эпоксидной смолы Epon812. Заливку осуществляли в смоле Epon812 с последующей полимеризацией в течение двух суток при 60°C. Анализ зафиксированного материала и выбор колоний клеток для последующего ЭМ анализа проводили на полутонких срезах с использованием светового микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы толщиной 60-70 нм получали алмазным ножом (Diatome, США) на ультрамикротоме UMC-7 (Leica, Германия). Полученные образцы были проанализированы в просвечивающем электронном микроскопе JEM1400 (JEOL, Япония) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

2.2.7 Иммуноэлектронно-микроскопический анализ

Для иммуноэлектронной микроскопии клетки, выращенные на пленках-подложках Melinex (Agar scientific, Великобритания), фиксировали 4%-ным параформальдегидом с добавлением 0,25%-ного глутарового альдегида в 0.1M фосфатном буфере в течение 3 часов при комнатной температуре. После фиксации клетки отмывали в том же буфере и дегидратировали в этаноле возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) по 10 минут на льду и по 30 минут на льду в изопропанол. Далее клетки поэтапно инкубировали в смеси изопропанола и заливочной среды LR Gold (EMS, США) в различных соотношениях: 1:3, 1:1 и 3:1 по 1 часу в каждом при температуре -20°C. Заливку производили с применением набора LR Gold resin (EMS 19100). На следующий день клетки переносили в заливочные формы со свежей средой LR Gold с добавлением 0.1%-ной бензоилпероксидазы. Герметично закрытые формы помещали в полимеризационный бокс под ультрафиолетовый спектр. Полимеризация проходила в течение 48 часов при -20°C, затем производили постепенное нагревание препаратов до комнатной температуры и полимеризацию под ультрафиолетом в течение суток при +20°C. Полутонкие и ультратонкие срезы получали алмазным ножом (Diatome, США) на ультрамикротоме UMC-7 (Leica, Германия). Иммуномечение на ультратонких срезах толщиной 60-70 нм проводилось на никелевых сеточках (EMS G200-Ni) с использованием первичных моноклональных антител Anti-FLAG M2 (1:1000, F1804, Sigma) и вторичных антител, конъюгированных с коллоидным золотым диаметром 10 нм (Abcam, ab39619). Полученные образцы были проанализированы в просвечивающем электронном микроскопе JEM1400 (JEOL, Япония) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

2.2.8 Морфометрический анализ митохондрий

Морфометрический анализ проводился на ультратонких срезах с использованием программного обеспечения iTEM 5.1 software (Olympus, США). Выборка для каждой линии клеток составляла 300 митохондрий, выбранных случайным образом на разных срезах. При подсчетах использовался метод «слепой оценки», т.е. на зашифрованных образцах.

2.2.9 Конфокальная микроскопия

Направляющие РНК, содержащие детерминанты митохондриального импорта, транскрибировали с добавлением флуоресцентно меченого уридина (Fluorescein-12-UTP, Sigma-Aldrich) *in vitro* с использованием набора для синтеза РНК HiScribe T7 Quick High-Yield RNA (NEB # E2050) по протоколу производителя. Полученные РНК-транскрипты очищали экстракцией фенол-хлороформом с последующим осаждением этанолом для трансфекции в культуру клеток HeLa. Клетки выращивали на конфокальных чашках со стеклянным дном, там же их трансфецировали меченой РНК в количестве 2,5мкг с помощью Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США), но без добавления реагента-энхансера Р3000. Через 48 ч. после трансфекции митохондрии окрашивали 150 нМ красителем MitoTracker® Red CMXRos (Life Technologies, США) в течение 30 мин. при 37°C согласно инструкции фирмы-производителя. Прижизненную визуализацию gRNA осуществляли с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Германия).

2.2.10 Выделение митохондрий из клеточных линий

Для определения внутриклеточной локализации белка MitoCas9 прежде всего были получены митохондриальная и цитоплазматическая фракции клеток с применением набора Qproteome Mitochondria Isolation Kit (Qiagen,

Германия). Цибридные клеточные линии NARP-3-1 и NARP3-2 и их трансгенные производные линии NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 наращивали в культуральных фласках T-25. При достижении 80-90% плотности, клетки диссоциировали от культурального пластика и ресуспендировали при комнатной температуре в лизирующем буфере по протоколу производителя. Далее полученные лизаты осаждали центрифугированием в течение 10 мин на 1000g при 4°C и отбирали супернатант, содержащий цитоплазматические белки. Оставшийся осадок ресуспендировали в гомогенизаторе Даунса в ледяном буфере для разрушения с добавлением ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария). Гомогенат последовательно центрифугировали один раз 10 мин на 1000g при 4°C, и один раз 10 мин на 6000g при 4°C, при этом отбирая для центрифугирования супернатант из предыдущего этапа. Осадок ресуспендировали в буфере для хранения митохондрий. Хранили образцы при -70°C.

2.2.11 Вестерн-блот

Для лизиса 5×10^6 клеток использовали 300 мкл буфера RIPA, содержащего 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% IGEPAL[®], 1% дезоксихолат натрия, 10% додецилсульфат натрия и коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария). Клетки лизировали в течение 30 мин при 4°C, затем подвергали ультразвуковой обработке на приборе Bandelin Sonoplus с параметрами: 3 цикла по 10 секунд, 30% мощность, перерывы между циклами 60 секунд. Образцы все время находились на льду. Лизаты центрифугировали 20 мин на 13000rpm при 4°C и аликвотили супернатант в охлажденные центрифужные пробирки по 10мкл.

Образцы тотальной, цитоплазматической и митохондриальной фракций белка смешивали с 2X буфером для загрузки Laemmli (Bio-Rad, Германия). Электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (Bio-Rad, Германия) в течение 3 часов при напряжении 90В. Перенос проводили с использованием

мембраны PVDF (Bio-Rad, Германия) в буфере для переноса, содержащем 25 mM Tris-base (Applichem, Германия), 190 mM глицин, 10% метанол (Союзхимпром), в течение 16 ч при напряжении 50 В при 4°C. После переноса мембрану блокировали 5% БСА в PBST (0,01 М фосфатно-солевой буфер с 0,1% Tween20). После переноса мембрану инкубировали с первичными антителами anti-FLAG M2 (1:1000, F1804, Sigma), anti-GAPDH (1:2500, ab9485, Abcam), anti-TFAM(1:1000, ABE483, Sigma-Aldrich), затем со вторичными антителами anti-mouse HRP (Thermo-Fisher Scientific). Для проявления пероксидазной активности использовали набор Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad). Концентрацию белков измеряли с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

2.2.12 Цифровая капельная ПЦР

Количество копий гена *MitoCas9* в геноме трансгенных клеточных линий определяли с помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR). Для этой цели была подобрана пара праймер-зонд на участок трансгена, расположенный внутри последовательности *Cas9* (Евроген, г. Москва). В качестве референсного гена использовали ген субъединицы белка рибонуклеазы р30 – *RPP30*. Зонд на мишень - ген *MitoCas9* - был модифицирован флуоресцентным красителем FAM и тушителем ВНQ-1, зонд на референсный ген *RPP30* – красителем HEX и тушителем – ВНQ-1. Все праймеры и зонды были подобраны с помощью онлайн-сервиса Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Геномную ДНК, выделенную из клеток фенол-хлороформным методом, предварительно фрагментировали с помощью эндонуклеазы рестрикции HindIII. Генерацию капель, а также, прочтение, осуществляли по стандартному протоколу BioRad на системе QX100 ddPCR.

2.3 Молекулярно-генетические методы анализа

2.3.1 Анализ уровня гетероплазмии в клеточных культурах

Поскольку однонуклеотидная замена mt.8993T>G в мтДНК приводит к возникновению уникального сайта рестрикции *AvaI*, был проведен ПДРФ-анализ с последующей количественной оценкой копий мтДНК, несущих соответствующую мутацию в цибридных клеточных линиях. После выделения и очистки тотальной ДНК из цибридных клеточных лизатов фенол-хлороформной экстракцией, целевой участок мтДНК, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров (L8305 и H9931). Продукт ПЦР длиной 1305 п.о. подвергали гидролизу с помощью эндонуклеазы рестрикции *AvaI* (New England Biolabs, R0152S). Результаты анализа визуализировали с помощью электрофореза в 1.2% агарозном геле. Количественную оценку разрезанной мтДНК с мутацией осуществляли гель-денситометрией в программном обеспечении Image Lab (Bio-Rad, США).

2.3.2 Гидролиз ДНК комплексами gRNA/Cas9 в условиях *in vitro*

Направляющие РНК транскрибировали *in vitro* с использованием набора быстрого высокоэффективного синтеза РНК HiScribe T7 (E2050; NEB). Полученные gRNA очищали фенол-хлороформной экстракцией с последующим осаждением этанолом. Концентрацию синтезированной РНК измеряли в 50 мкл воды, обработанной диэтилпиноксикарбонатом (DEPC), с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific) и затем разбавляли до рабочей концентрации 300 нМ. Реакцию расщепления проводили в объеме 30 мкл, в состав которого входили: 1 мкл 1 мкМ нуклеазы Cas9 (конечная концентрация ~ 30 нМ) *S. pyogenes* (M0386L; NEB), 3 мкл 10[×] реакционного буфера для нуклеазы Cas9 (B0386A; NEB), 1 мкл 300 нМ gRNA (конечная 30 нМ). Конечный объем реакции доводили с помощью воды, не содержащей нуклеаз. После предварительной инкубации в течение 10

минут при 25°C в реакционную смесь добавляли 1 мкл 30 нМ ДНК-субстрата (конечная концентрация 3 нМ) и инкубировали при 37°C в течение 45 минут. Реакции расщепления матричной ДНК останавливали добавлением 1 мкл протеиназы К (P8107S; NEB) и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Образовавшиеся продукты расщепления анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. Наличие фрагментов ~676 и ~300 п.н. свидетельствовали о Cas9-опосредованном расщеплении ДНК. Реакции *in vitro* расщепления проводили в трех независимых повторах. Эффективность разрезания ДНК-субстрата определялась с помощью количественной оценки ДНК в бэндах геледенситометрией в программном обеспечении Image Lab (Bio-Rad, США). Достоверность различий средних значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

2.4 Статистическая обработка данных

Данные в тексте и таблице представлены в виде $M \pm m$, где M – это средняя арифметическая, m – стандартное отклонение

Статистическая оценка наблюдаемых изменений в уровне гетероплазмии между исходными и трансгенными клеточными линиями проводилась в Microsoft Excel. Значимость различий при попарном сравнении выборок оценивали с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента.

Анализ результатов, полученных при выполнении морфометрического анализа митохондрий, был проведен в программе Statistica 6.0. Для проверки статистической гипотезы применяли двухфакторный дисперсионный анализ с повторениями (Two-way ANOVA with replications). В качестве первого фактора был взят присутствие/отсутствие MitoCas9 в клеточной линии, в качестве второго – клеточная линия – NARP3-1 или NARP3-2 соответственно. Число повторений было равно 3. Данный анализ позволяет не только определить эффект модификации MitoCas9 на длину митохондрий, но также

определить достоверность отличий в эффекте модификации между клеточными линиями. Порог значимости теста ANOVA был выбран с учетом коррекции Бонферрони на множественность тестирования и был равен $P\text{-value} < 0.05/4 = 0.0125$, где 4 – число групп митохондрий по длине и коэффициенту округлости. Достоверность результатов изучаемого признака между группами при попарном сравнении оценивали с помощью теста *post Hoc Tukey*.

Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка *W*.

Статистический анализ смещения уровня гетероплазмии был аналогичен анализу морфологии митохондрий. В качестве первого фактора был взят присутствие/отсутствие *MitoCas9* в клеточной линии, в качестве второго – наличие/отсутствие обработки. Порог значимости теста ANOVA был выбран с учетом коррекции Бонферрони на множественность тестирования и был равен $P\text{-value} < 0.05/6 = 0.0125$, где 6 – число тестов для каждой группы.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Дизайн, сборка и анализ внутриклеточной локализации компонентов системы MitoCRISPR/Cas9

Для элиминации патогенных молекул мтДНК в первую очередь необходимо адаптировать компоненты системы CRISPR/Cas9 – направляющую РНК и нуклеазу Cas9 для их импорта в митохондрии.

Белковый компонент системы ранее уже был модифицирован для транспорта в митохондрии путем добавления нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный пептид с 5'-конца гена нуклеазы [231]. Поскольку эксперименты с временной трансфекцией плазмидными векторами показали эффективный транспорт белка MitoCas9 в митохондрии клеточных линий, следующим шагом в работе было создание трансгенной линии клеток, стабильно экспрессирующей нуклеазу из ядра. Получение подобных клеток позволило бы проводить дальнейший анализ воздействия системы MitoCRISPR/Cas9 на функциональном уровне без дополнительной трансфекции плазмидой, кодирующей нуклеазу. Для этой задачи были выбраны цибридные клеточные линии NARP3-1 и NARP3-2, которые содержат мутацию в митохондриальной ДНК mt.8993T>G в гене *MT-ATP6* мтДНК в состоянии гетероплазмии приблизительно на уровне 90% и 60% соответственно [204].

Основной проблемой подхода является адаптация второго компонента системы – направляющей РНК (gRNA) для манипуляций с мтДНК. Сейчас отсутствует однозначное мнение о эффективности и молекулярных механизмах транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии. На основании литературных данных нами была разработана стратегия по доставке gRNA в митохондрии с применением специфических детерминант целевого импорта РНК [197,235,236].

3.1.1 Импорт модифицированной нуклеазы MitoCas9 в митохондрии

3.1.1.1 Дизайн и сборка плазмидной конструкции для интеграции MitoCas9 в геном цибридных клеточных линий

Принцип искусственного переноса трансгенов с помощью системы Sleeping Beauty [239] основан на вырезании транспозона, фланкированного концевыми инвертированными повторами (ITR), ферментом транспозазой и последующей его интеграцией в геном хозяина (рисунок 8Б). Для интеграции кассеты *MitoCas9* в геном цибридных клеток при помощи системы Sleeping Beauty прежде всего необходимо было сконструировать вектор, кодирующий транспозон (рисунок 8А).

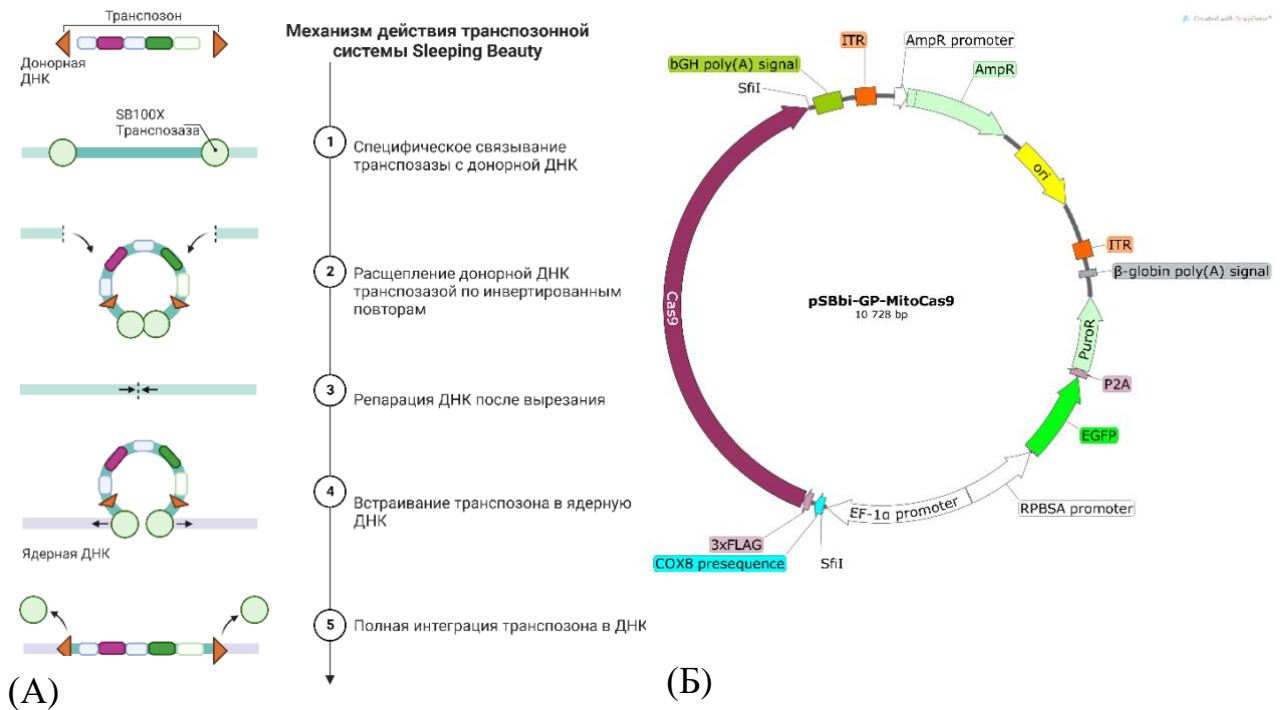


Рисунок 8. Схема интеграции гена *MitoCas9* в ядерный геном при помощи системы Sleeping Beauty. (А) Механизм действия транспозонной системы Sleeping Beauty. (Б) Карта плазмидного вектора pSBbi-GP-MitoCas9. *Cas9* - ген, кодирующий нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*; bGHpolyA - сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота; ITR-инвертированные концевые повторы; *AmpR*-селективный маркер, ген устойчивости к ампициллину; Ori - ориджин репликации; *PuroR* – ген, кодирующий пурамицин N-ацетилтрансферазу; RPBSA – синтетический промотор; EGFP - «усиленный» зеленый флуоресцентный белок; EF-1 α - конститутивный промотор фактора элонгации человека EF-

1 α ; COX8A - сигнал митохондриальной локализации субъединицы VIIIA цитохром с-оксидазы; 3xFLAG – маркерный пептид.

Отличительной особенностью плазмиды pSBbi-GP является наличие двух инвертированных повторов, для переноса транспозона, и селективного гена устойчивости к антибиотику пурамицину, для позитивной селекции трансгенных клонов. Фрагмент импортируемой в митохондрии нуклеазы *MitoCas9* (596-4899 п.о.) из донорной плазмиды pMitoCas9 клонировали в вектор pSBbi-GP. Необходимо отметить, что плазида pMitoCas9 была ранее сконструирована в работе Орищенко и др. [238]. Где для получения модифицированной нуклеазы *MitoCas9*, к последовательности гена *Cas9* бактерии *Streptococcus pyogenes*, с оптимизированным кодонным составом для экспрессии в клетках человека, с 5`-конца была присоединена нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнал митохондриальной локализации субъединицы VIIIA цитохром-с-оксидазы человека.

Поскольку вектор pSBbi-GP содержит сильный конститутивный промотор фактора элонгации человека EF-1 α , регуляция транскрипции *MitoCas9*, осуществлялась под его контролем. Наличие регуляторных элементов в конструкции позволяет добиться высокого уровня экспрессии интегрируемого гена в клетках млекопитающих. Для оценки эффективности трансфекции и прижизненной визуализации встройки трансгена в геном клеток, в сконструированной плазмиде также содержится ген *EGFP*, а для детекции внутриклеточной локализации нуклеазы, с 5`-конца непосредственно перед геном *Cas9* была встроена последовательность, кодирующая пептид 3xFLAG.

3.1.1.2 Получение и характеристика трансгенных цибридных клеточных линий, со стабильной экспрессией *MitoCas9*

В результате котрансфекции клеточных линий NARP3-1 и NARP3-2 двумя плазмидами pSBbi-GP-MitoCas9 и pSB100X, кодирующими компоненты системы Sleeping Beauty, были получены гетерогенные клеточные сублинии NARP3-1-MitoCas9 и NARP3-2-MitoCas9. Поскольку генетическая кассета, интегрированная в трансгенные клетки, содержит ген *PuroR* (рисунок 8А), отбор клонов, содержащих необходимую встройку, осуществляли на селективной среде с добавлением пурамицина. Учитывая, что среди интегрированных генов есть также ген *EGFP*, интеграцию транспозона в геном клеток оценивали посредством прижизненной флуоресцентной микроскопии. После нескольких раундов культивирования на ростовой среде с антибиотиком с помощью автоматизированной системы CellSelector был произведен отбор GFP-позитивных клонов. Все клоны, полученные в результате транспозиции, были проанализированы на наличие гетероплазмии по мутации mt.8993T>G мтДНК.

Для оценки уровня гетероплазмии мтДНК в цибридных клетках был проведен ПЦР-ПДФ-анализ. Поскольку однонуклеотидная замена mt.8993T>G в мтДНК приводит к возникновению уникального сайта рестрикции *AvaI*, оценку количества мутантных копий проводили при помощи *in vitro* разрезания ДНК (рисунок 9). Уровень гетероплазмии мтДНК оценивается по степени разрезания ДНК субстрата. Чем выше число мутантных молекул мтДНК – тем больше ДНК субстрата подвергается гидролизу. Напротив, количество неразрезанной ДНК соответствует количеству молекул мтДНК дикого типа. В качестве ДНК субстрата использован ПЦР фрагмент ДНК длиной 1678п.о., амплифицированный с тотальной ДНК с применением праймеров, фланкирующих исследуемый участок мтДНК.

Результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР-ПДФ-анализа соответствуют данным, представленным в статье Tanaka et.al. [208] для исходных гибридных клеточных линий NARP3-1 и NARP3-2 (Рисунок 9).

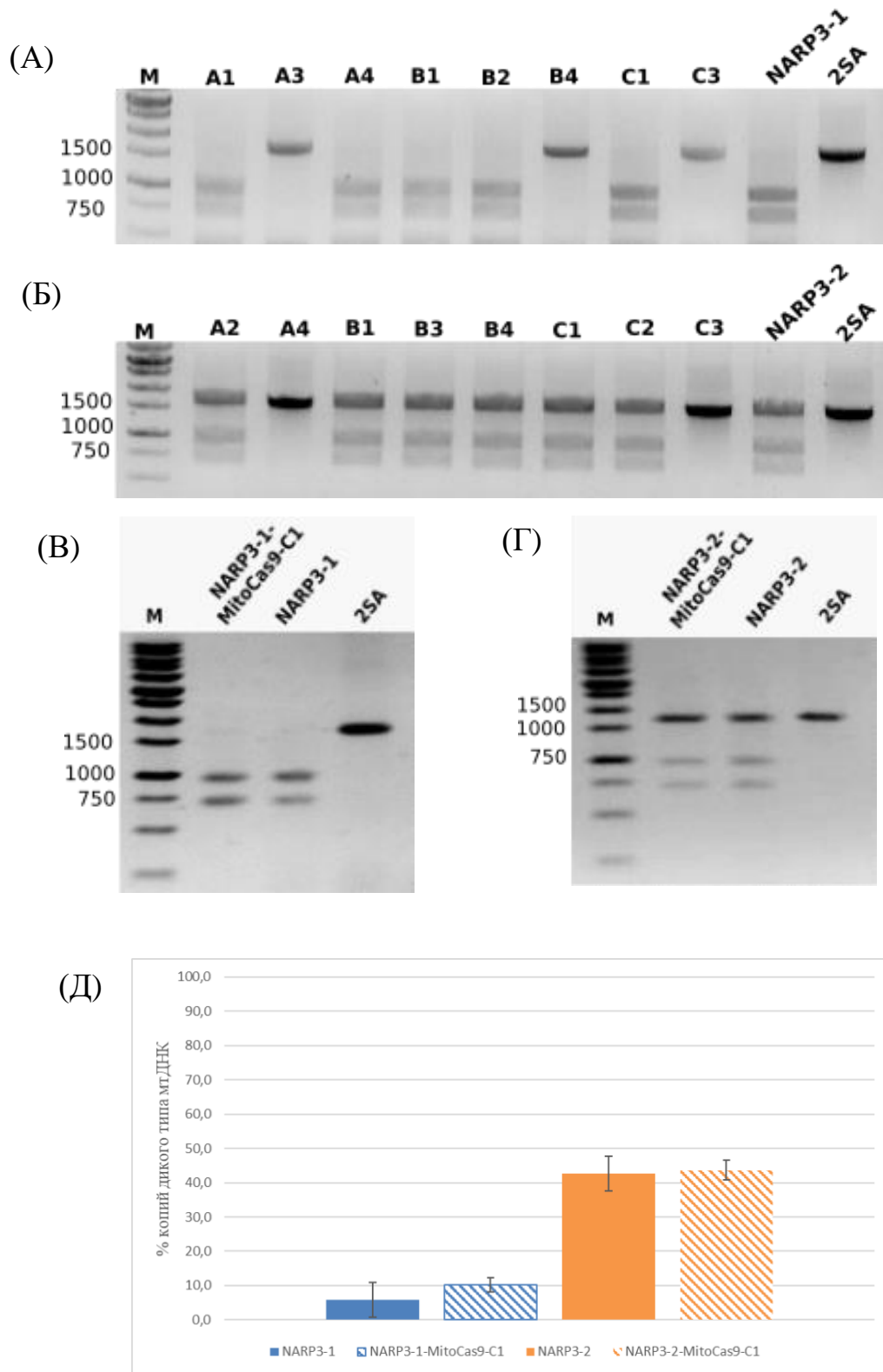


Рисунок 9. ПЦР-ДФ-анализ уровня гетероплазии мтДНК гибридных клеток. Сравнение уровня гетероплазии до и после транспозиции *MitoCas9* между трансгенными

клонами и исходными линиями NARP3-1 (А) и NARP3-2 (Б). ПЦР-ПДФ-анализ для оценки уровня гетероплазии в клеточных линиях NARP3-1 и NARP3-1-MitoCas9-C1 (В), в линиях NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1 (Г). (Д) Денситометрический анализ количества диких копий мтДНК в гибридных клеточных линиях. В качестве отрицательного контроля использовалась мтДНК, выделенная из клеточной линии 2SA, не содержащая мутацию mt.8993T>G. М - ДНК маркер Sky-High. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; n = 3. Сравнения уровня гетероплазии между значениями исходных и трансгенных клеточных линий были выполнены с использованием непарного t-критерия Стьюдента.

Среди полученных 8 трансгенных сублиний NARP3-1 и 8 сублиний NARP3-2, с стабильной экспрессией *MitoCas9*, было обнаружено, что в некоторых клонах отсутствует мутация mt.8993T>G, а соответственно и сайт рестрикции *AvaI* (рисунок 9А и Б, клоны А3, В4 и С3 NARP3-1; клоны А4 и С3 NARP3-2). Подобные изменения могли произойти в результате эндогенного сдвига гетероплазии в сторону молекул мтДНК дикого типа. В исследованиях на клеточных культурах гетероплазия поддерживается искусственно, путем внесения дополнительных субстратов АТФ в процессе непрерывного культивирования. В отличие от первичных клеток, полученных от пациентов, в перевиваемых линиях гибридов зачастую обнаруживается нестабильность в соотношении молекул мтДНК дикого и мутантного типа [242]. По большей части это зависит от условий культивирования и состава питательных сред.

Однако помимо этого, по данным исследований Lechuga-Vieco et al. [243,244], было показано, что уровень гетероплазии также во многом зависит от генетического фона клеток. Различия в динамике обусловлены функциональной комплементацией продуктов ядерного и митохондриального геномов при сборке системы ОФ. Для построения функциональных мультибелковых респираторных комплексов около 70 белков, кодируемых ядерной ДНК, и 13 структурных белков, кодируемых мтДНК, должны

физически соответствовать друг другу и заданной на клеточном уровне метаболической программе. Несовместимость, возникшая в результате гетероплазмии мтДНК, между продуктами ядерного и митохондриального геномов способствует снижению митохондриальной активности и адаптивной реакции клеток [244]. Соответственно, предполагается, что несовместимость ядерного и митохондриального геномов делает состояние гетероплазмии нестабильным и, таким образом, через элиминацию дефектных митохондрий и клеток, способствует сегрегации копий мтДНК в сторону молекул дикого типа.

На сегодняшний день, выяснить основные механизмы внутриклеточного дрейфа уровня гетероплазмии и определить ключевые мишени для ее смещения пока не удалось. Поэтому и разрабатываются технологии для искусственной модуляции уровня гетероплазмии мтДНК [245].

Несмотря на наличие клонов у которых отсутствует мутация mt.8993T>G (рисунок 9А и Б), были отобраны сублинии, не отличающиеся по уровню гетероплазмии от исходных клеточных линий по данным ПЦР-ПДРФ-анализа. В результате оценки интенсивности флуоресценции EGFP с помощью проточной цитометрии среди полученных сублиний, для последующих работ были выбраны два клона с наивысшей интенсивностью флуоресценции GFP: NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 (Таблица 1).

Полуколичественная оценка ДНК при помощи денситометрии (рисунок 9Д), демонстрирует, что гетероплазмия мтДНК в выбранных сублиниях остается на уровне исходных гибридных линий. Достоверных изменений выявлено не было. Полученные данные свидетельствуют о том, что репопуляции мтДНК дикого типа в выбранных субклонах в результате транспозиции и субклонирования не произошло. Отсутствие влияния интеграции и экспрессии MitoCas9 на мтДНК дополнительно подтверждали оценкой уровня гетероплазмии с помощью ПЦР-ПДРФ анализа в ходе

длительного культивирования (на протяжении 20 пассажей) клеточных линий (рисунок 10).

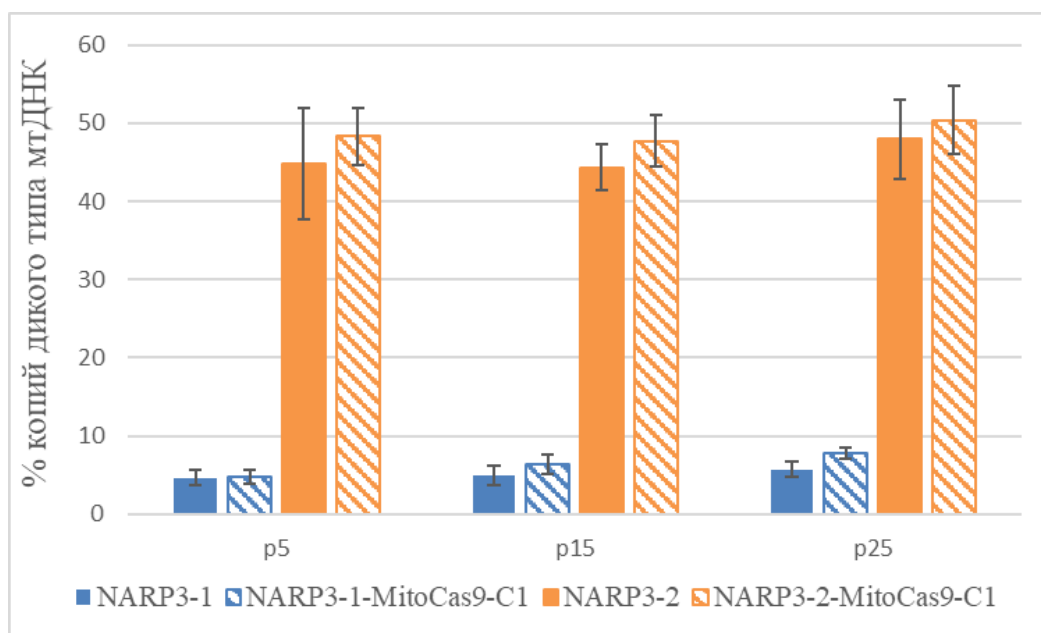


Рисунок 10. ПЦР-ПДРФ анализ динамики гетероплазии мтДНК в исходных и трансгенных клеточных линиях в ходе культивирования. 5р., 15р., 25р. – процент копий мтДНК дикого типа, проанализированный на 5-ом, 15-ом и 25-ом пассажах культивирования соответственно. Полуколичественная оценка ДНК с применением метода денситометрии по данным ПЦР-ПДРФ анализа. Данные представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение; $n = 3$. Парные сравнения уровня гетероплазии между значениями исходных и трансгенных клеточных линий были выполнены с использованием t-критерия Стьюдента.

Далее, каждая из полученных нами трансгенных клеточных линий была проанализирована на число GFP-позитивных клеток в общей клеточной популяции (Таблица 1). Было выявлено, что 99,2% клеток линии NARP3-1-MitoCas9-C1 экспрессируют GFP, соответственно и нуклеазу. Для NARP3-2-MitoCas9-C1 это значение было равно 97,4%. Стоит отметить, что в работе Орищенко [238], в клеточной линии Phoenix, транзигентно трансфицированной плазмидами кодирующими модифицированную нуклеазу, число клеток, экспрессирующих GFP, было в разы меньше (4,7% и 18,4%). Равномерная и стабильная экспрессия MitoCas9 в полученной нами клеточной культуре

позволит проводить дальнейший анализ воздействия системы MitoCRISPR/Cas9 на функциональном уровне без дополнительной трансфекции плазмидой, кодирующей нуклеазу.

Таблица 1. Эффективность экспрессии *MitoCas9* в клеточных линиях NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1

Клеточная линия	% GFP- позитивных клеток	Геометрическое среднее интенсивности флуоресценции GFP	Число копий гена <i>MitoCas9</i>
NARP3-1-MitoCas9-C1	99,2	1692	25
NARP3-2-MitoCas9-C1	97,4	439	14

По результатам анализа интенсивности флуоресценции GFP в трансгенных клеточных линиях, было обнаружено, что геометрические средние значения интенсивности флуоресценции между клеточными линиями NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 отличаются почти в 4 раза (Таблица 1). Нами было выдвинуто предположение о том, что интенсивность флуоресценции GFP прямо пропорциональна числу копий гена *MitoCas9*, интегрированного в геном. Количество копий гена *MitoCas9* в клеточных линиях NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 оценивали с помощью цифровой капельной ПЦР. В результате было установлено, что в геноме NARP3-1-MitoCas9-C1 встроилось 25 копий, при этом в геноме NARP3-2-MitoCas9-C1 было обнаружено 14 копий *MitoCas9*. Исходя из данных, полученных в результате проточной цитометрии и цифровой капельной ПЦР, можно сделать вывод о том, что экспрессия *MitoCas9* должна осуществляться на более высоком уровне в клеточной линии NARP3-1-MitoCas9-C1, по сравнению с NARP3-2-MitoCas9-C1, что связано с большим числом встроек *MitoCas9* в геном клеток.

Несмотря на интеграцию гена *MitoCas9* в геном трансгенных клеточных линий, ранее нами уже было установлено, что уровень гетероплазмии мтДНК в полученных линиях не менялся. Уровень гетероплазмии сохранялся независимо от уровня экспрессии *MitoCas9*. В связи с этим можно

предварительно сделать вывод о том, что внутриклеточная экспрессия MitoCas9 не влияет на уровень гетероплазмии мтДНК в гибридных клеточных линиях.

В результате экспериментов по созданию трансгенных клеточных линий было получено две клеточные линии со стабильной экспрессией гена, кодирующего нуклеазу Cas9. Модификация кодирующей последовательности гена нуклеазы, путем добавления сигнала митохондриальной COX8A на N-конец гена, позволяет транспортировать нуклеазу в митохондрии клеток. В ряде работ было продемонстрировано, что подобное слияние MTS и Cas9 позволяет добиться желаемого результата [223,224,227,238,246]. Однако в большей части работ экспрессия MitoCas9 была временной, в результате транзientной трансфекции клеток конструкциями, кодирующими нуклеазу. На наш взгляд, временная экспрессия не позволяет в полной мере изучить эффективность работы системы MitoCRISPR/Cas9, а также оценить влияние модифицированной нуклеазы на геном митохондрий. Поэтому и возникла необходимость создания клеточной линии с стабильной экспрессией MitoCas9.

В работе Loutre et. al [246] были получены клеточные линии с конститутивной и индуцибельной экспрессией MitoCas9 из генома клеток на основе клеточных линий HepG2 и HEK293T. Несмотря на наличие доказательств локализации MitoCas9 в митохондриях клеток, детальной характеристики полученных клеточных линий в работе описано не было. Более того, ни в одной из работ ген *MitoCas9* не был интегрирован в геном клеточных линий, моделирующих митохондриальное заболевание. В свою очередь мы демонстрируем, что независимо от уровня экспрессии *MitoCas9*, уровень гетероплазмии мтДНК в гибридных клеточных линиях с разным уровнем гетероплазмии по мутации mt.8993T>G не изменяется.

3.1.1.2 Анализ локализации нуклеазы MitoCas9 в клеточных линиях NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1

Для анализа внутриклеточной локализации модифицированной нуклеазы MitoCas9, клетки NARP3-1, NARP3-1-MitoCas9-C1, NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1 лизировали и подвергали дифференциальному центрифугированию для фракционирования на цитозольную и митохондриальную белковые фракции. Все клеточные лизаты были проанализированы при помощи вестерн-блот анализа, с использованием антител против эпитопа FLAG, белка GAPDH и митохондриального маркера TFAM (рисунок 11).

Проведенный на полученных экстрактах вестерн-блот анализ позволил выявить целевой белок в митохондриальных фракциях трансгенных клеточных линий, и в небольшом количестве в цитоплазматической фракции. При этом, в исходных цибридных клеточных линиях NARP3-1 и NARP3-2, не экспрессирующих MitoCas9, искомый белок не детектировался. Присутствие небольших количеств нуклеазы в цитоплазматической фракции трансгенных клеток объясняется тем, что трансляция мРНК белков, импортируемых в митохондрии, осуществляется непосредственно в цитоплазме. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) принимает участие в пермеабиллизации митохондриальной мембраны при апоптозе [247–249]. Присутствие апоптотических клеток в клеточных лизатах подтверждается наличием белка GAPDH в митохондриальной фракции.

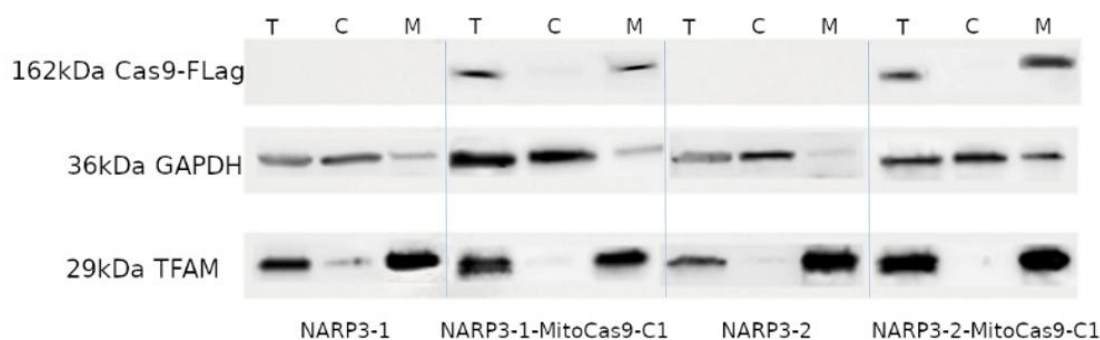


Рисунок 11. Анализ локализации модифицированной нуклеазы с помощью метода вестерн-блот анализа. Буквами отмечены белковые фракции, где Т – тотальная, С –

цитоплазматическая и М – митохондриальная. Cas9-FLAG – нуклеаза MitoCas9, слитая с эпитопом 3xFLAG; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; TFAM – митохондриальный транскрипционный фактор А.

Далее, мы провели иммуоцитохимическое окрашивание гибридных клеток с использованием антител против эпитопа 3xFLAG (рисунок 12). В качестве контроля внутриклеточной локализации EGFP была выбрана исходная гибридная линия NARP3-2, трансфицированная плазмидой pEGFP-N1, с цитоплазматической локализацией GFP. Иммуофлуоресцентный анализ показал, что в основной массе клеток NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 сигнал точно распределен по цитоплазме и колокализуется с митохондриями, мечеными специфическим белком с митохондриальной локализацией (TagRFP-mito) (Рисунок 12).

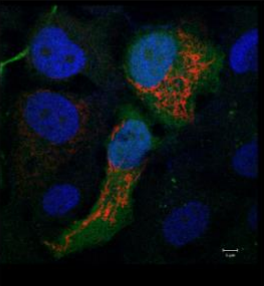
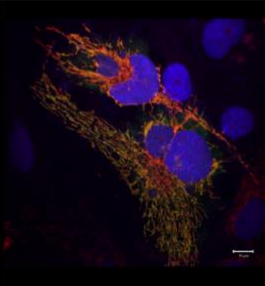
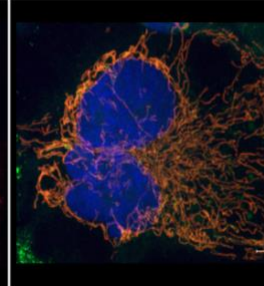
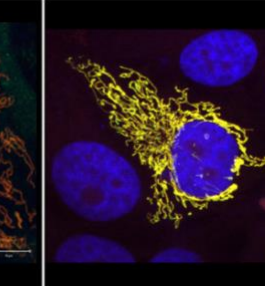
Клеточная линия	NARP3-2	NARP3-1-MitoCas9-C1	NARP3-2-MitoCas9-C1	NARP3-2
				
Экспрессируемые белки	EGFP-N1 (без MTS)+TagRFP-Mito	MitoCas9+TagRFP-Mito	MitoCas9+TagRFP-Mito	TurboGFP-Mito+TagRFP-Mito
Коэффициент корреляции Пирсона (PCC) для GFP и RFP	Низкий (0,23±0,07)	Средний (0,41±0,09)	Средний (0,50±0,07)	Высокий (0,79±0,04)

Рисунок 12. Локализация нуклеазы MitoCas9 в гибридных клеточных линиях, трансфицированных pTag-RFP-mito. Клетки окрашивали антителами против 3xFLAG. Для детекции митохондрий, клеточные линии трансфицировали вектором pTag-RFP-mito, который кодирует красный флуоресцентный белок (RFP), с митохондриальной локализацией. Для окрашивания ядер использовали DAPI. Количественную оценку колокализации нуклеазы и митохондрий измеряли с помощью коэффициента корреляции

Пирсона для пикселей зеленого и красного каналов. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n=3 независимых эксперимента). Шкала 10мкм

Наблюдаемое при конфокальной микроскопии перекрытие флуорохромов красного и зеленого каналов позволило нам утверждать о совместной локализации двух структур. Однако подобный анализ пересечения двух флуоресцентных каналов в конфокальной микроскопии довольно субъективный метод оценки колокализации, поэтому мы дополнительно провели колокализационный тест с применением программного обеспечения ZEN 2010. Серия изображений, полученных с помощью Z-стекинга, была объединена в одно изображение путем построения проекции максимальной интенсивности (maximum intensity projection). Затем, основываясь на пересечении пикселей на красном и зеленом каналах, были обнаружены области перекрытия желтого цвета. Программное обеспечение автоматически рассчитало коэффициент корреляции пикселей по Пирсону, с учетом порогового значения по Costes, отображающий зависимость интенсивности пикселей в двух каналах (рисунок 12) для перекрывающихся структур.

Коэффициент перекрытия по Пирсону (PCC) между зеленым (MitoCas9) и красным (TagRFP-mito) каналами для клеточной линии NARP3-1-MitoCas9-C1 составил 0,41. Для клеточной линии NARP3-2-MitoCas9-C1 мы наблюдали незначительное увеличение PCC = 0,50. Средние значения PCC обеих клеточных линий указывают на совместное положение пикселей двух объектов зеленого и красного каналов, что свидетельствует о том, что нуклеаза MitoCas9 локализуется либо во внутреннем пространстве, либо на внешней мембране митохондрий.

Одной из возможных причин средних показателей коэффициента перекрытия между митохондриями и модифицированной нуклеазой в клеточных линиях может быть пониженный импорт MitoCas9 внутрь митохондрий ввиду большого размера (~160 кДа) и повышенной

гидрофобности транспортируемого белка. В недавней работе Marcelo et.al. был произведен сравнительный анализ 31 MTS на способность импортировать цитозольные белки в митохондрии [213]. Белки, обладающие повышенным составом гидрофобных аминокислот, демонстрировали пониженные показатели коэффициента корреляции Пирсона, по сравнению с гидрофильными белками, такие как GFP. Подобную зависимость объясняют тем, что высокогидрофобные белки могут застревать в транслокационных комплексах мембран митохондрий [213]. Но тем не менее, сигнал MTS рекрутирует цитозольные белки к внешней мембране органеллы, позволяя транспортироваться им внутрь, с пониженной эффективностью.

Помимо этого, в работе Zuriñe et. al. [224] также был проведен сравнительный анализ между CRISPR - ассоциированными нуклеазами из других семейств, перепрограммированными для направленного импорта в митохондрии клеток млекопитающих. Нуклеазы LbCas12a, SpCas9 и AsCas12a были слиты с разными вариантами MTS. По результатам иммунофлуоресцентного, вестерн-блот и иммуно-электронномикроскопического анализа наиболее эффективно транспортировалась нуклеаза LbCas12a, слитая с MTS Su9 (9 субъединица АТФазы *Neurospora crassa*). Очевидная разница в эффективности импорта в митохондрии, наблюдаемая для Cas9 и LbCas12a, может быть объяснена различными характеристиками белков. Общая доменная организация этих ферментов значительно отличается, особенно в отношении их N-концевых последовательностей, которые обычно являются ключевыми для успешного импорта белка в митохондрии. LbCas12a имеет более положительно заряженный N-конец (первые 24 аминокислоты), что объясняет его высокую эффективность импорта в митохондрии, а также он меньше по размеру и менее гидрофобен, по сравнению с Cas9 [224].

Модифицируя структуру Cas9, оптимизировав ее для улучшенного импорта в митохондрии (например, использование расщепленного на части

Cas9) можно добиться результатов аналогичных с LbCas12a. Но остается открытым вопрос, не повлияют ли модификации на функциональную активность митохондрий.

Чтобы более точно определить, в какую структурную часть митохондрий нуклеаза интернализуется и влияет ли MitoCas9 на структуру и биогенез митохондрий, был проведен дополнительный иммуно-электронномикроскопический и ультраструктурный анализ с помощью электронной микроскопии.

Согласно иммуно-электронномикроскопическому анализу, проведенному Морозовой К. Н., антитела, меченные коллоидным золотом, специфично связываются с эпитопом 3xFLAG, слитым с модифицированной нуклеазой MitoCas9, во внутреннем матриксе митохондрий. Метка обнаруживается лишь у трансгенных линий, NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1, что свидетельствует об избирательном связывании антител с нуклеазой (рисунок 13).

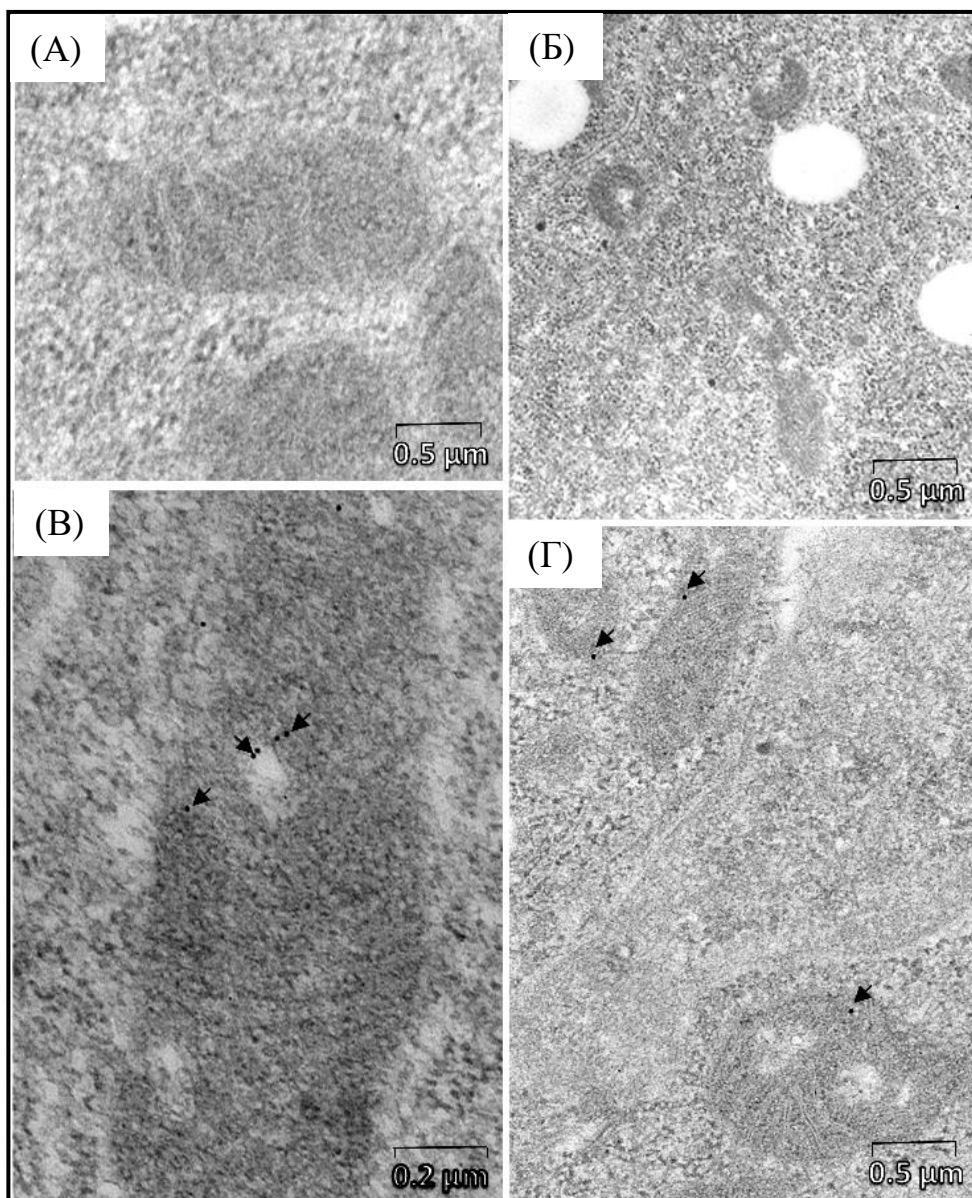


Рисунок 13. Иммуноэлектронно-микроскопический анализ клеточных линий NARP 3-1 (А), NARP 3-2 (Б), NARP 3-1-MitoCas9-C1 (В), NARP 3-2- MitoCas9-C1 (Г). Субклеточная локализация MitoCas9 в гибридных клеточных линиях NARP 3-1-C1 (В), NARP 3-1-C1 (Г) обозначена черной стрелкой.

Присутствие отдельных меток в цитоплазме клеток соответствует данным, полученным ранее методом вестерн-блот анализа. Учитывая то, что большая часть белка MitoCas9 обнаруживается во внутреннем компартменте органеллы, можно утверждать о направленном импорте MitoCas9 в матрикс митохондрий.

Согласно полученным данным, показано, что белковый компонент системы CRISPR/Cas9 - нуклеаза – успешно импортируется внутрь митохондрий культивируемых клеток благодаря введенным модификациям. Так, присоединение последовательности митохондриального таргетинга (MTS) к N-концу импортируемого белка [206], позволило перенаправить нуклеазу Cas9 в митохондрии клеток. Аналогичный подход по доставке нуклеазы и ее ортологов (LbCas12a, AsCas12a) был реализован в работах других научных групп [223,224,226,238,246,250]. Оригинальный метод реконструирования Cas9, позволяющий увеличить эффективность импорта белка, был продемонстрирован в работе Hussain et al. [250]. С N- и C- концов последовательности нуклеазы Cas9, оптимизированной для экспрессии в клетках мыши, были добавлены два MTS сигнала. Однако подобные модификации привели к неспецифическому распределению нуклеазы по всей цитоплазме [250]. Из-за отсутствия данных о колокализации нуклеазы и митохондрий в данной статье, соответствующие выводы об эффекте положения MLS сигнала на импорт Cas9 до сих пор не сделаны.

Помимо этого, в статье Jo et al. [223], выдвигалось предположение о том, что Cas9, в нативном виде, без удаления сигнала ядерной локализации (NLS), импортируется в митохондрии клеточных культур человека. Однако в последующих работах внутримитохондриальной локализации NLS-Cas9 обнаружено не было [238,251]. Что дополнительно подтверждает предположение о том, что импорт белков в митохондрии без соответствующих сигналов локализации либо невозможен, либо неэффективен.

Помимо выбора стратегии перенаправления нуклеаз в митохондрии, еще одним важным аспектом, требующим внимания, является эффективность импорта модифицированного белка. Как и в работе Zuriñe et. al. [224], нами было выявлено, что MitoCas9 транспортируется в митохондрии со средней эффективностью. Возможно применение других вариантов Cas9, таких как SaCas9, AsCpf1, LbCas12a которые выполняют функции, аналогичные Cas9,

но имеют другую последовательность распознавания, РАМ и меньший размер, приведет к более эффективной доставке в митохондрии клеток. Более того, комбинируя различные варианты MTS и нуклеаз можно подобрать оптимальную комбинацию, обладающую высокой эффективностью импорта в митохондрии. Тем не менее, прежде чем анализировать воздействие систем редактирования мтДНК, вне зависимости от используемой нуклеазы, важно знать стратегии перенаправления белков и представлять эффекты от экспрессии эндонуклеаз в митохондриях.

3.1.1.3 Анализ влияния нуклеазы MitoCas9 на морфологию митохондрий клеточных линий NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1

В экспериментальной работе Zuriñe et. al. [224] было обнаружено резкое изменение морфологии и функциональной активности митохондрий в клеточных линиях, трансфицированных аналогом MitoCas9. Авторами было выдвинуто предположение о влиянии длительной экспрессии импортируемого белка (до 48 часов) на характеристики митохондрий в культуре клеток пигментного эпителия сетчатки hTERT RPE-1.

В нашей работе кластер MitoCas9 интегрирован в геном клеточных линий, моделирующих митохондриальное заболевание NARP и MILS. Мы также сравнили ультраструктуру исходных и трансгенных гибридных клеток с применением просвечивающей электронной микроскопии, для оценки влияния нуклеазы MitoCas9 на морфологию митохондрий клеточных линий NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1.

Согласно результатам ультраструктурного электронно-микроскопического анализа клеточных линий NARP3-1, NARP3-1-MitoCas9-C1, NARP3-2, NARP3-2-MitoCas9-C1 (рисунок 14), большая часть митохондрий гибридов имеет разреженный матрикс в различной степени. Матрикс митохондрий клеточной линии NARP3-1 выглядят более разреженным по сравнению с линией NARP3-2. Кристы митохондрий линии NARP3-2 наиболее приближены к типичной организации, в то время как в

линии NARP3-1 наблюдаются нарушения в форме и расположении крист. Подобные морфологические изменения, вероятнее всего, ассоциированы с уровнем гетероплазии по мутации mt.8993T>G в гене 6-ой субъединицы АТФ-синтазы (*MT-ATP6*). Поскольку мутации в субъединицах АТФ-синтазы приводят к нарушениям ее сборки, это приводит к изменениям морфологии крист [252]. Помимо этого, показано, что уровень гетероплазии цибридных клеток коррелирует со скоростью синтеза АТФ и мембранным потенциалом митохондрий. При увеличении мутационной нагрузки mt.8993T>G мтДНК клеток, скорость синтеза АТФ снижается, а мембранный потенциал пропорционально увеличивается [253]. Подобные изменения в биоэнергетике митохондрий способны индуцировать продукцию активных форм кислорода и последующие окислительные процессы в клетке [254]. Соответственно при 90% гетероплазии по мутации в линии NARP3-1, внутриклеточные дефекты более выражены, чем в линии NARP3-2, с уровнем гетероплазии равным 60% (рисунок 14А и Б).

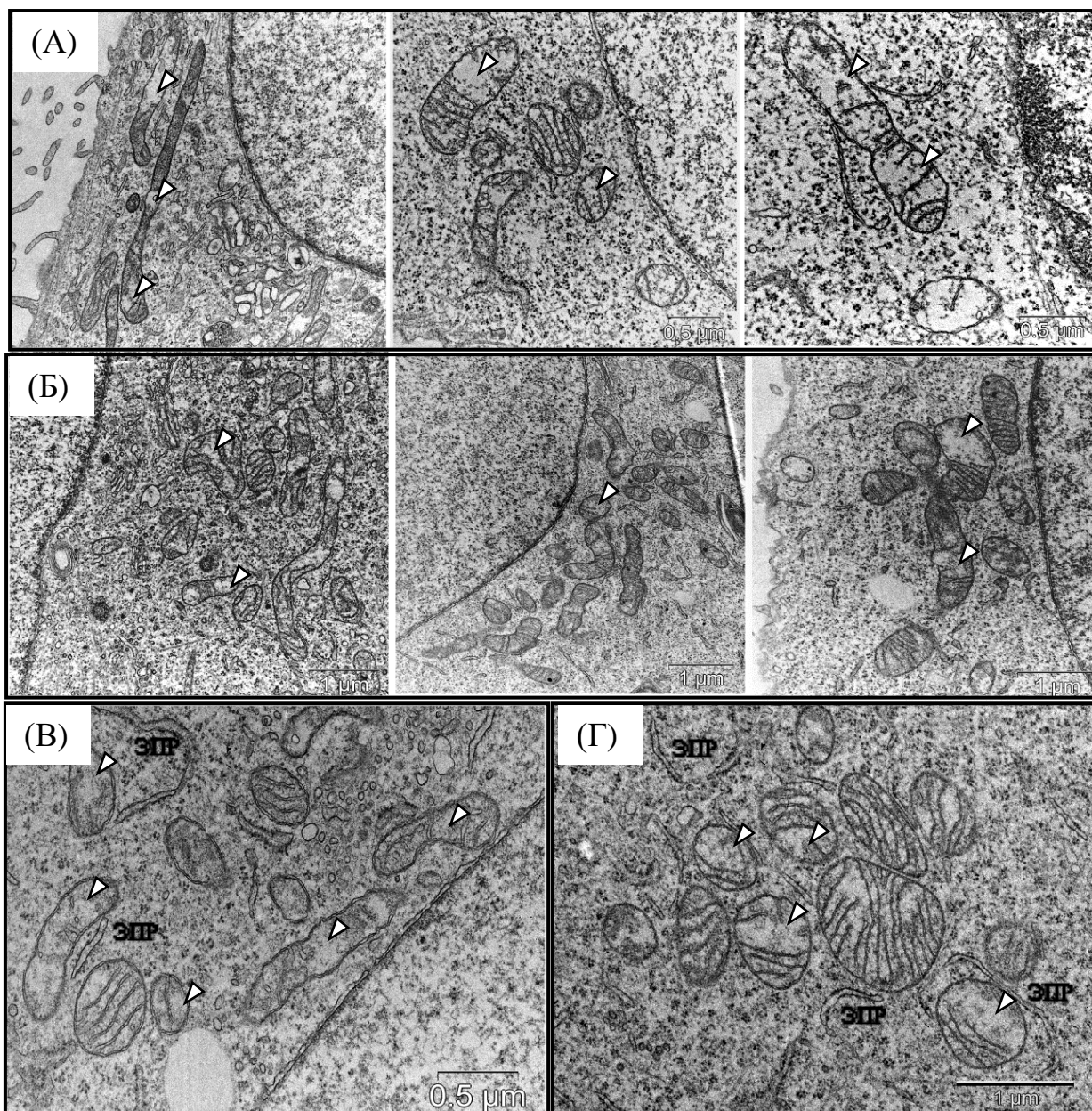


Рисунок 14. Ультраструктурный электронно-микроскопический анализ клеточных линий NARP3-1 (А), NARP3-2 (Б), NARP3-1-MitoCas9-C1 (В), NARP3-2-MitoCas9-C1 (Г). Стрелками \blacktriangleright обозначены разреженные участки матрикса митохондрий. ЭПР-эндоплазматический ретикулум.

Митохондрии трансгенных клетки NARP3-1-MitoCas9-C1 (рисунок 14В) окпо сравнению с исходными цибридными клетками NARP3-1 (рисунок 14А) больше по размеру, согласно данным морфометрии митохондрий (рисунок 15). Однако регулярность расположения и форма крист остается нарушенной. Помимо этого, выявлено увеличение протяженности цистерн шероховатого

ЭПР, так же как и количества мембран гладкого ЭПР, что может свидетельствовать об активных процессах синтеза белка и в частности модифицированной нуклеазы в трансгенных линиях. Аналогичное увеличение числа мембран шероховатого и гладкого ЭПР обнаружено и в линии NARP3-2-MitoCas9-C1 (рисунок 14Г).

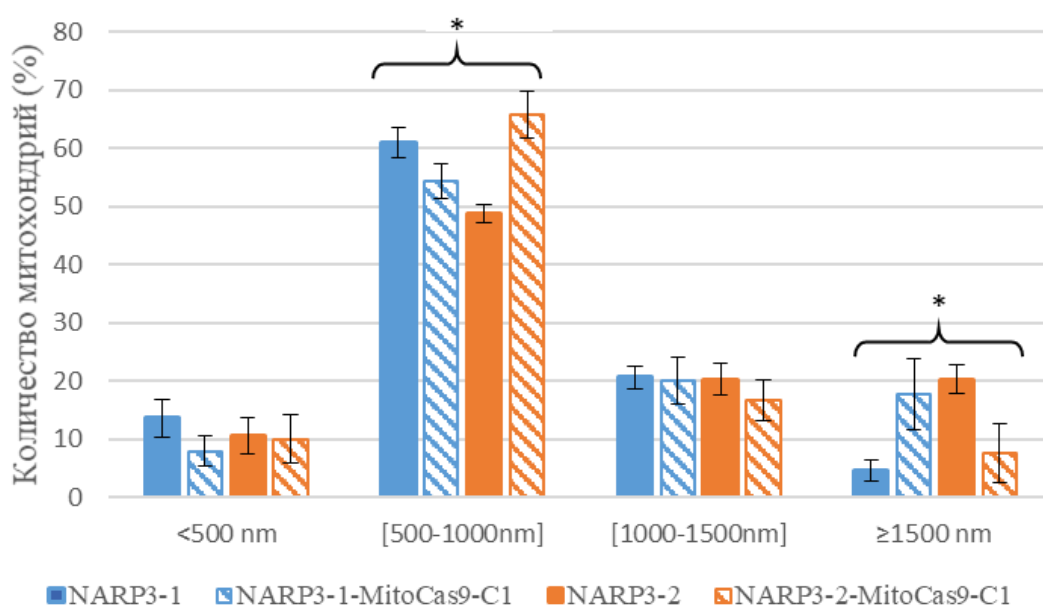


Рисунок 15. Морфометрические показатели митохондрий исходных и трансгенных цибридных клеточных линий: длина митохондрий. Оценка размеров митохондрий (n=100, значения для трех независимых биологических повторов показаны как среднее ± стандартное отклонение среднего). * отмечены значимые (p-value<0.05) попарные изменения подсчитанные в группе с использованием Post Hoc Tukey HSD теста.

Мы применили двух-факторный дисперсионный анализ с повторениями (Two-way ANOVA with replications) для оценки влияния MitoCas9 на морфологию митохондрий клеточных линий NARP3-1, NARP3-2 и их трансгенных производных. В качестве двух факторов были выбраны «клеточная линия» и «присутствие MitoCas9». Предварительно, была проверена нормальность распределения числа митохондрий в каждой из групп (<500nm, 500-1000nm, 1000-1500nm, ≥1500nm) с помощью теста Shapiro-Wilk, не показавшего достоверные отклонения от нормального распределения (p

value > 0.05). В результате дисперсионного анализа мы не обнаружили достоверного эффекта MitoCas9 на длину митохондрий в рамках групп <500nm и 1000-1500nm. При этом в рамках групп 500-1000nm и ≥ 1500 nm были выявлены достоверные различия. Далее мы провели Post Hoc Tukey HSD тест, который проводя попарные сравнения между группами, указывает на пары, между которыми существует достоверные отличия по изучаемому признаку.

Результаты Post Hoc Tukey HSD теста показали, что представленность митохондрий с размером 500-1000 достоверно отличается между линиями NARP3-1 и NARP3-2 (p-value=0.028), NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1 (p-value=0.0048), NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 (p-value=0.042). При этом в ≥ 1500 nm различия наблюдались между NARP3-1 и NARP3-2 (p-value=0.008), NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1 (p-value=0.0026), NARP3-1 и NARP3-1-MitoCas9-C1 (p-value=0.022).

Согласно статистическим данным, число митохондрий размером ≥ 1500 nm достоверно увеличивается (p-value=0.022) у NARP3-1-MitoCas9-C1 по сравнению с исходной клеточной линией, что свидетельствует об удлинении митохондрий в данной линии. Можно предположить, что в митохондриях данной клеточной линии индуцируется слияние. Помимо увеличения длины митохондрий, также было обнаружено увеличение коэффициента округлости митохондрий, рассчитываемого как соотношение длин большой оси митохондрий к малой (minor/major axis) (Рисунок 16). Принято считать, чем ближе коэффициент округлости митохондрий к 1, тем короче и круглее выглядит митохондрия. Соответственно, митохондрии с коэффициентом равным 2-5 - это морфологически овальные митохондрии. Если же коэффициент выше 5 и стремится к 10, считается, что это длинные и очень длинные вытянутые митохондрии.

Для оценки округлости митохондрий мы провели анализ, аналогичный ранее проведенному для измерения длин митохондрий в клеточных линиях NARP3-1, NARP3-2 и их производных. Предварительно мы проверили

нормальность распределения числа митохондрии каждой из групп округлости (1-2, 2-5, 5-10, ≥ 10) с помощью теста Shapiro-Wilk, не показавшего достоверные отклонения от нормального распределения ($P\text{-value} > 0.05$).

В результате анализа мы обнаружили достоверный эффект модификации MitoCas9 на представленность митохондрий с коэффициентом округлости 1-2 и 2-5 ($P\text{-value}=0.000523$ и 0.000626 соответственно). Также мы показали, что эффект модификации MitoCas9 на представленности митохондрий с округлостью 1-2, 2-5, 5-10 принципиально отличается между клеточными линиями NARP3-1 и NARP3-2 – $P\text{-value}$ взаимодействия факторов «клеточная линия» и «наличие MitoCas9» равнялось $1.21 \cdot 10^{-05}$, $1.24 \cdot 10^{-3}$ и $9.06 \cdot 10^{-05}$ соответственно.

На графике округлости митохондрий (Рисунок 16) продемонстрировано, что число митохондрий, с коэффициентом округлости 5-10 достоверно увеличивается в трансгенной линии NARP3-1-MitoCas9-C1, по сравнению с исходной клеточной линией NARP3-1 ($p\text{-value}=0.009$). Более того, наблюдается возникновение группы митохондрий, обладающих коэффициентом ≥ 10 . Отсюда следует вывод, что экспрессия MitoCas9 влияет на морфологию митохондрий, индуцируя их удлинение и слияние в клеточной линии NARP3-1-MitoCas9-C1.

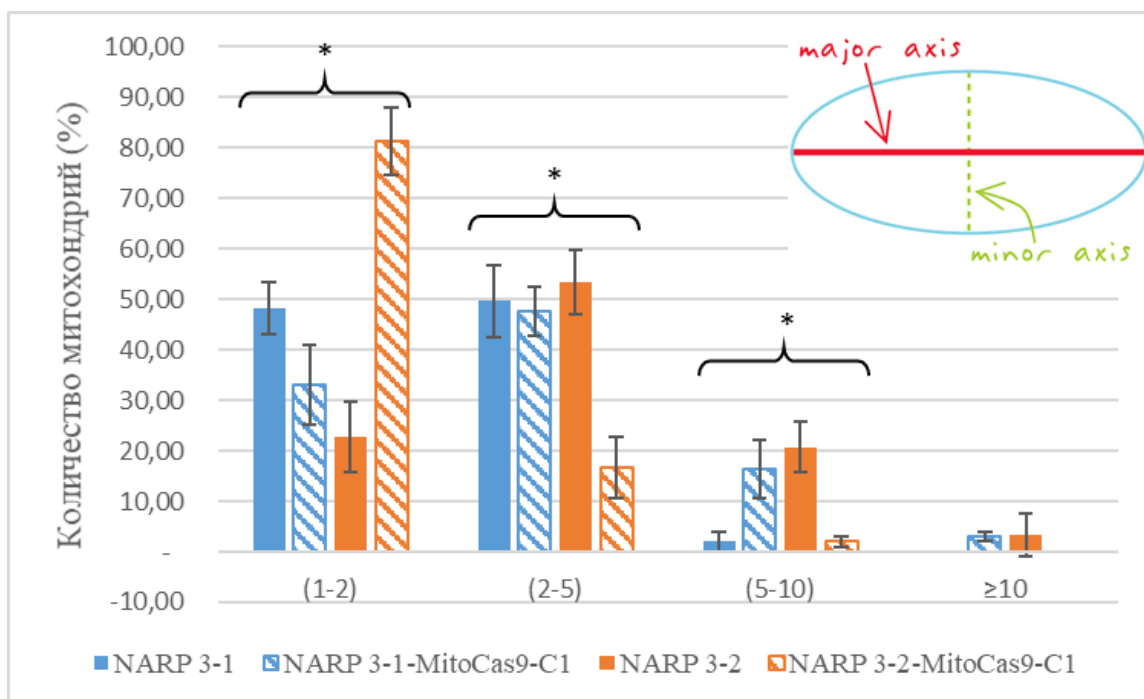


Рисунок 16. Морфометрические показатели митохондрий исходных и трансгенных гибридных клеточных линий: коэффициент округления. Оценка округлости митохондрий ($n=100$, значения для трех независимых биологических повторов показаны как среднее \pm стандартное отклонение среднего). В правом верхнем углу графически представлены большая и малая ось (minor/major axis) митохондрий, чьи длины учитываются при расчете коэффициента округлости митохондрий. Значения коэффициентов: (1-2) – округлые митохондрии, (2-5) – овальные митохондрии, (5-10) – удлинённые митохондрии, ≥ 10 – очень вытянутые митохондрии. * отмечены значимые изменения ($p\text{-value} < 0.05$), подсчитанные в группе с использованием Post Hoc Tukey HSD теста.

Трансгенные клетки NARP3-2-MitoCas9-C1 (рисунок 14Г) демонстрируют незначительное увеличение разреженности матрикса митохондрий, по сравнению с исходной линией NARP 3-2 (рисунок 14 Б). При этом наблюдается повышение числа митохондрий с уменьшенными размерами (500-1000nm) ($P\text{-value}=0.004$), согласно данным морфометрии митохондрий (рисунок 15). Снижение количества митохондрий с размерами $\geq 1500\text{nm}$ коррелирует с увеличением числа округлившимся митохондрий, с коэффициентом (1-2) ($P\text{-value}=0,0002$ при сравнении NARP 3-2 и NARP3-2-

MitoCas9-C1) (Рисунок 16). Более того, число удлинённых митохондрий постепенно снижается, приводя к полному исчезновению митохондрий с коэффициентом ≥ 10 . Уменьшение размеров и увеличение числа округлившихся митохондрий свидетельствует о фрагментации органелл, вероятнее всего возникшей в результате воздействия модифицированной нуклеазы MitoCas9 на морфологию митохондрий. Общая характеристика митохондрий цибридных клеточных линий до и после интеграции MitoCas9 представлена в таблице 2.

Таблица 2. Обобщенная характеристика митохондрий цибридных клеточных линий.

Клеточная линия	Состояние матрикса	Состояние крист	Морфология
NARP3-1	умеренно разрежен	нарушенная организация	овальные, средней длины
NARP3-1-MitoCas9-C1	сильно разрежен	нарушенная организация	сильно удлинённые
NARP3-2	слабо разрежен	типичная организация	удлинённые
NARP3-2-MitoCas9-C1	умеренно разрежен	типичная организация	округлые, фрагментированные

На сегодняшний день, зависимость между интернализацией MitoCas9 и процессами слияния-деления митохондрий не описана в научной литературе. Но исследования на клеточных культурах и тканях показывают, что динамика митохондрий имеет решающее значение в поддержании здоровья митохондриальной популяции [255–258]. Так, в условиях стресса, стимулируется слияние отдельных митохондрий в единую взаимосвязанную структуру, с целью обмена содержимым матрикса и общим увеличением биоэнергетической эффективности органелл [259–263]. Результатом деления, в свою очередь, является распределение мембранного потенциала, протеома и молекул мтДНК между дочерними митохондриями для увеличения митохондриальной массы [264]. В случае увеличения размеров митохондрий, как это наблюдается для NARP3-1-MitoCas9-C1, можно предположить, что экспрессия MitoCas9 в митохондриях с 90% уровнем гетероплазии, вызывает

слияние органелл в единую сеть, с целью поддержания постоянства мембранного потенциала и метаболической эффективности митохондрий. Так, слияние митохондрий в ретикулум может защитить клетки, по крайней мере временно, от гибели во время стресса. Действительно, во время голодания блокирование способности митохондрий к слиянию приводило к гибели клеток [259].

В клетках NARP3-2-MitoCas9-C1 наблюдается обратный процесс, связанный с фрагментацией органелл. Существует гипотеза, согласно которой клеточный стресс приводит к фрагментации митохондрий из-за накопленных повреждений и деполяризации мембранного потенциала митохондрий [265–267]. После фрагментации, дисфункциональные органеллы могут быть удалены посредством митофагии, потенциально восстанавливая митохондриальный ретикулум до нормального состояния [265,268]. Следуя описанным выше гипотезам, можно предположить, что MitoCas9 индуцирует слияние и деление митохондрий в ответ на внутриклеточный стресс в цибридных клеточных линиях NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1. Однако количество регуляторных белков и путей, которые, как известно, активируют стрессовое состояние в клетке неуклонно растет. Поэтому для выяснения данного механизма необходимы более детальные исследования.

Описанные нами результаты согласуются с данными полученными в работе Szczepanowska et al. [269]. Также, как и в указанной работе, нами было выявлено, что митохондрии клеточной линии NARP3-1 с 60% уровнем гетероплазии, существуют преимущественно в виде удлинённых организованных сетей. Подобная митохондриальная сеть была описана во многих клеточных линиях дикого типа [270–272]. Напротив, фрагментированные митохондрии были обнаружены при анализе линии NARP3-1, с 90% уровнем гетероплазии мтДНК по мутации m.8993T> G. Полученные результаты демонстрируют взаимосвязь между мутационной нагрузкой митохондриального генома и морфологией митохондрий. Так, с

увеличением уровня гетероплазмы мтДНК увеличивается выраженность митохондриальных дефектов (разрежение матрикса, нарушение в организации, расположении и формы крист и т.д.).

Однако, в результате экспрессии *MitoCas9* в митохондриях трансгенных клеточных линий, степень выраженности дефектов в большей степени оставалась неизменной. На основе данных ультраструктурного электронно-микроскопического и морфометрического анализа клеточных линий NARP3-1, NARP3-1- *MitoCas9*-*MitoCas9*-C1, NARP3-2, NARP3-2-*MitoCas9*-C1 можно предварительно сделать вывод о том, что интернализация *MitoCas9* в митохондриях вызывает незначительные изменения в регулярности расположения и форме крист.

В работах Jo et al. [223] и Zuriñe et. al. [224] отмечалось, что длительная экспрессия модифицированной нуклеазы *MitoCas9* приводит к нарушению морфологии митохондрий. Наши данные подтверждают выявленные авторами статей изменения. Более того, мы можем дополнительно отметить, что структурно-динамические изменения в митохондриях трансгенных клеточных линий, вероятнее всего, являются защитной реакцией клеток на хронический стресс, который возник в результате внутримитохондриальной экспрессии *MitoCas9*.

Изначально цибридные клеточные линии NARP, с различным уровнем гетероплазмы мтДНК, находились в условиях хронического окислительного стресса, вызванного в ответ на мутационную нагрузку мтДНК и сниженную активность АТФ-азы. Дополнительный фактор, в виде внутриклеточной сверхэкспрессии *MitoCas9*, более чем вероятно, мог усугубить данное состояние, вызвав изменения в биогенезе и биоэнергетике митохондрий. Возможно, снижение числа встроок гена *MitoCas9* в геном клеток либо индуцируемая экспрессия *MitoCas9* позволят избежать негативного эффекта нуклеазы на клеточный гомеостаз. Несмотря на полученные нами результаты, анализировать воздействие системы *MitoCRISPR/Cas9* необходимо.

Поскольку избавление клеток от окислительного стресса возможно путем снижения числа мутантных копий мтДНК, смещением гетероплазмии и восстановлением энергетических функций митохондрий.

3.1.2 Импорт направляющей РНК в митохондрии клеточных линий

3.1.2.1 Дизайн вариантов направляющей РНК, содержащих целевые детерминанты импорта в митохондрии

Существует мнение, что митохондрии являются возможно единственными структурами для которых адаптировать систему CRISPR/Cas9 не получится [203]. Трудности с адаптацией системы для работы в митохондриях прежде всего связаны с тем, что для импорта во внутреннее пространство митохондрии, компонентам системы необходимо преодолеть барьер в виде внешней и внутренней митохондриальных мембран.

Ввиду отсутствия единого мнения по поводу транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии, вопрос о применении системы CRISPR/Cas9 для супрессии мутаций мтДНК также остается спорным. Однако, на сегодняшний день существует ряд опубликованных работ, утверждающих о наличии специфических детерминант целевого импорта ряда РНК в митохондрии. Было показано, что шпильки HF и HD в транспортной РНК дрожжей *S. cerevisiae* отвечают за импорт в митохондрии tRNA^{Lys} CUU (tRK1). Добавление этих шпилек в структуру других РНК приводило к импорту в митохондрии *in vivo* и восстановлению функций нарушенных патогенными мутациями в мтДНК [87,273–275]. Используя данные шпильки, другим исследователям также удалось сконструировать рекомбинантные молекулы РНК, которые эффективно импортируются в митохондрии млекопитающих и там блокируют репликацию специфических молекул мтДНК [200,201]. Аналогичные исследования, но с применением РНК-компонентов рибонуклеаз RP [83,276] и MRP [81], участвующих в митохондриальных матричных процессах млекопитающих, позволили предположить, что домены

этих типов РНК могут также служить в качестве детерминант целевого импорта в митохондрии [277]. Все обнаруженные цитозольные РНК, транспортируемые в митохондрии, являются малыми, некодирующими и содержат палиндромные последовательности, образующие шпильки, ответственные за импорт РНК. Введение таких вторичных структур в последовательность gRNA вероятно также может способствовать ее транспортировке в матрикс митохондрий.

Для сайт-специфического распознавания и расщепления ДНК-последовательности мишени необходимо, чтобы оба компонента системы CRISPR/Cas9 (gRNA и Cas9) сформировали активный эффекторный комплекс [278,279]. Исходя из этого, прежде всего мы провели анализ кристаллической структуры взаимодействия нуклеазы с дуплексом gRNA-ДНК (рисунок 17А) по данным работы Nishimasu et al. [280].

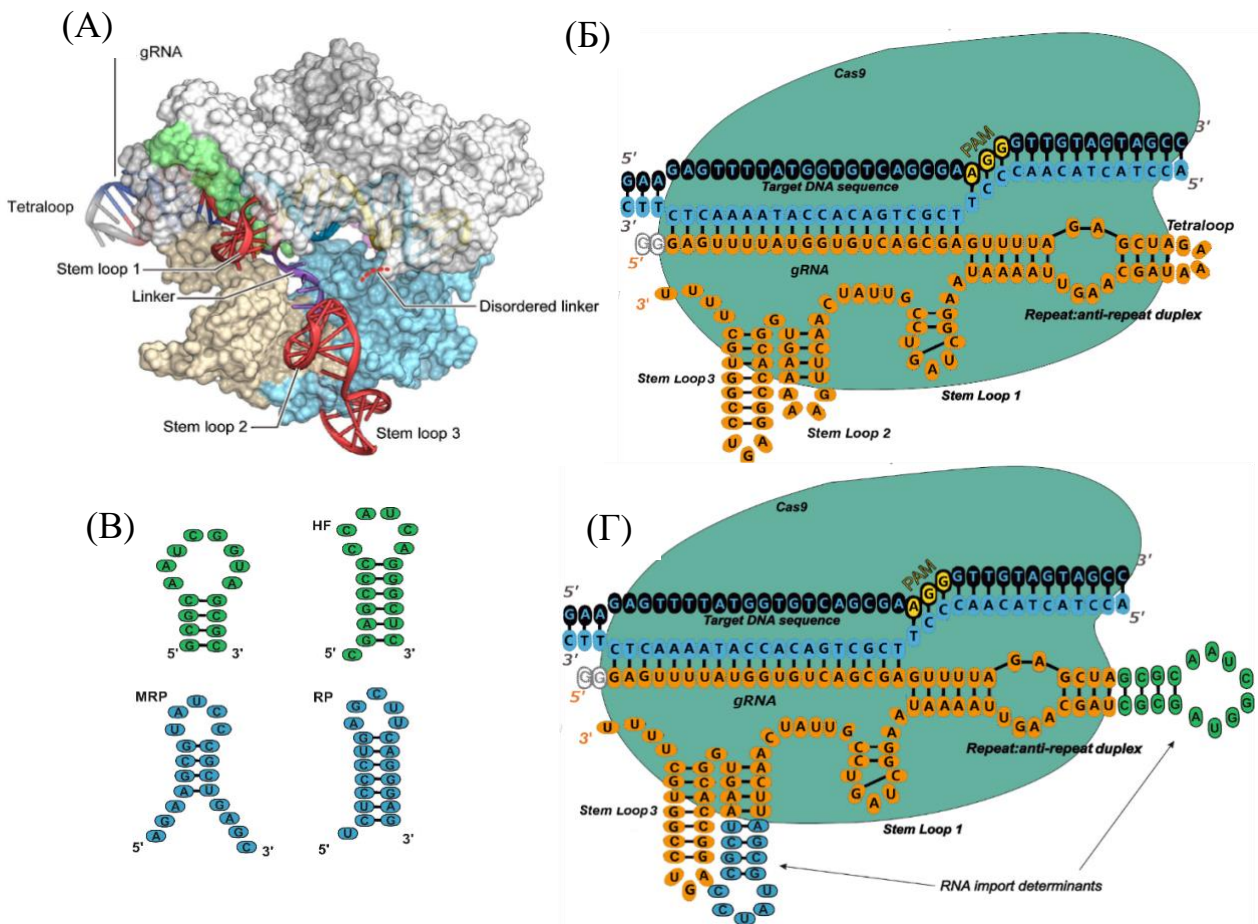


Рисунок 17. Дизайн рекомбинантной молекулы gRNA. (А) Кристаллическая структура Cas9 в комплексе с направляющей РНК и ДНК-мишенью (Nishimasu et al. 2012).

(Б) Организация комплекса ДНК- gRNA - Cas9, где петли tetraloop и stem loop 2 gRNA свободны от взаимодействия с нуклеазой. (В) Структура шпилек, предположительно выступающих в качестве детерминант импорта РНК в митохондрии. (Г) Пример замещения участков петель конститутивной части gRNA детерминантами импорта.

Поскольку петли tetraloop и stem loop 2 конститутивной части gRNA частично выступают за пределы рибонуклеопротеинового комплекса [280] (рисунок 17А, Б), можно предположить, что введение модификаций в данные локусы не должно повлиять на эффективность сборки и аффинность связывания всего комплекса с целевой последовательностью ДНК, а также его функциональную активность. Поэтому нуклеотиды GAAA соответствующих петель (tetraloop или stem loop 2) gRNA заменяли последовательностью нуклеотидов одной из четырех детерминант импорта РНК в митохондрии (шпильки HD, HF, RP, MRP) (рисунок 17В) во всех возможных конформациях (прямая, обратная, комплементарная, обратно-комплементарная). В результате было получено 32 варианта gRNA со встройкой в структуру tetraloop или stem loop 2 детерминант импорта РНК в митохондрии. Для каждого варианта модифицированной gRNA была предсказана вторичная структура с использованием веб-сервера RNAfold из пакета программного обеспечения ViennaRNA [237]. Предсказанные *in silico* структуры модифицированных gRNA сравнивали с идеальной теоретической, в которой петли tetraloop или stem loop 2 не были изменены. В результате для каждой из детерминант импорта было отобрано по одной наиболее оптимальной конформации при встройке в каждую из петель tetraloop или stem loop 2 gRNA. Всего было получено 8 вариантов модифицированных gRNA вторичные структуры которых имели минимальные отличия от немодифицированной gRNA (таблица 2). Варианты модифицированных gRNA клонировали в вектор gRNA-cloning vector. Вариант HF-SL клонировать не удалось из-за

технических трудностей, которые, вероятнее всего, связаны со вторичной структурой в нуклеотидной последовательности.

Таблица 3. Характеристика модифицированных направляющих РНК. Вторичная структура gRNA представлена в виде точечно-скобочной модели. Каждый из символов соответствует основанию в нуклеотидной последовательности gRNA. Скобка обозначает спаренное основание в последовательности gRNA. Точками обозначены неспаренные основания, которые соответствуют петлям в структуре шпильки. Немодифицированные шпильки tetraloop и stem loop 2 выделены серым цветом.

Модификация gRNA	Расположение детерминанты импорта	Конформация детерминанты импорта	5` - 3` вторичная структура gRNA
NEG	Без модификаций	-	<pre> (((((((.....)))))).....((((.....))).((((.....)))) Tetraloop Stem loop 2 </pre>
MRP-TLR	Tetraloop	Обратная	<pre> (((((((.....)))))).....((((.....))).((((.....)))) </pre>
RP-TLO	Tetraloop	Прямая	<pre> (((((((.....)))))).....((((.....))).((((.....)))) </pre>
HD-TLO	Tetraloop	Прямая	<pre> (((((((.....)))))).....((((.....))).((((.....)))) </pre>
HF-TLR	Tetraloop	Обратная	<pre> (((((((.....)))))).....((((.....))).((((.....)))) </pre>
MRP-SLO	Stem loop 2	Прямая	<pre> (((((((.....)))))).....((.....)).....((((.....)))) </pre>
RP-SLO	Stem loop 2	Прямая	<pre> (((((((.....)))))).....((.....)).....((((.....)))) </pre>
HD-SLO	Stem loop 2	Прямая	<pre> (((((((.....)))))).....((((.....)))).....((((.....)))) </pre>
HF-SLO	Stem loop 2	Прямая	<pre> (((((((.....)))))).....((((.....)))).....((((.....)))) </pre>

Ранее оба компонента системы CRISPR/Cas9 уже подвергались многочисленным модификациям с целью увеличения эффективности и специфичности системы, а также расширения функциональных возможностей. В направляющей РНК выделяют несколько структурных элементов: спейсер - участок длиной около 20 нуклеотидов с 5` конца gRNA комплементарный целевой последовательности ДНК, четыре шпильки -

вторичные структуры РНК типа “стебель-петля” (tetraloop, stem loop 1 или nexus, stem loop 2 и stem loop 3), причем в структуре шпильки tetraloop выделяют нижний стебель, выступ и верхний стебель [280,281]. С помощью направленного мутагенеза было показано, что выступ и stem loop 1 (nexus) являются ключевыми элементами в структуре gRNA, которые необходимы для активности системы CRISPR/Cas9. В свою очередь верхний стебель в шпильке tetraloop и шпилька stem loop 2 могут быть значительно модифицированы или даже полностью удалены из gRNA и при этом активность комплекса gRNA/Cas9 сохраняется [281,282]. Более того при увеличении длины шпилек tetraloop и stem loop 2 повышалась стабильность gRNA и эффективность сборки комплекса gRNA и неактивной нуклеазы Cas9 [283,284]. Поэтому мы предположили, что внесение детерминант митохондриального импорта именно в эти структуры gRNA, приведет к ее митохондриальной локализации и не повлияет на функциональную активность комплекса gRNA/Cas9.

3.1.2.2 Анализ влияния модификаций gRNA на функциональную активность комплекса gRNA/Cas9 *in vitro*.

Оценку функциональной активности комплекса нуклеазы Cas9 с различными вариантами модифицированных gRNA проводили при помощи реакций *in vitro* расщепления субстрата ДНК. В реакциях использовали gRNA синтезированную при помощи *in vitro* транскрипции с РНК-полимеразой T7 и коммерческую рекомбинантную нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*. В качестве субстрата добавляли двухцепочечный фрагмент ДНК длиной 976 п.н., амплифицированный с помощью ПЦР. Протоспейсер подбирали таким образом, чтобы в случае успешного внесения комплексом gRNA /Cas9 двухцепочечного разрыва в ДНК-субстрат, образовывалось два фрагмента длиной 298 п.н. и 678 п.н. В качестве контролей проводили реакции *in vitro* расщепления с немодифицированной gRNA (NEG) и без добавления gRNA. Все реакции проводили в трех независимых повторах. Результаты

электрофореза в агарозном геле продуктов реакций *in vitro* расщепления представлены на рисунке 18А. Видно, что при использовании всех вариантов модифицированных gRNA происходит специфическое расщепление ДНК-субстрата с образованием фрагментов ожидаемого размера (678 п.о. и 298 п.о). Таким образом несмотря на внесенные модификации в структуру направляющей РНК комплекс gRNA/Cas9 сохраняет свою функциональную активность.

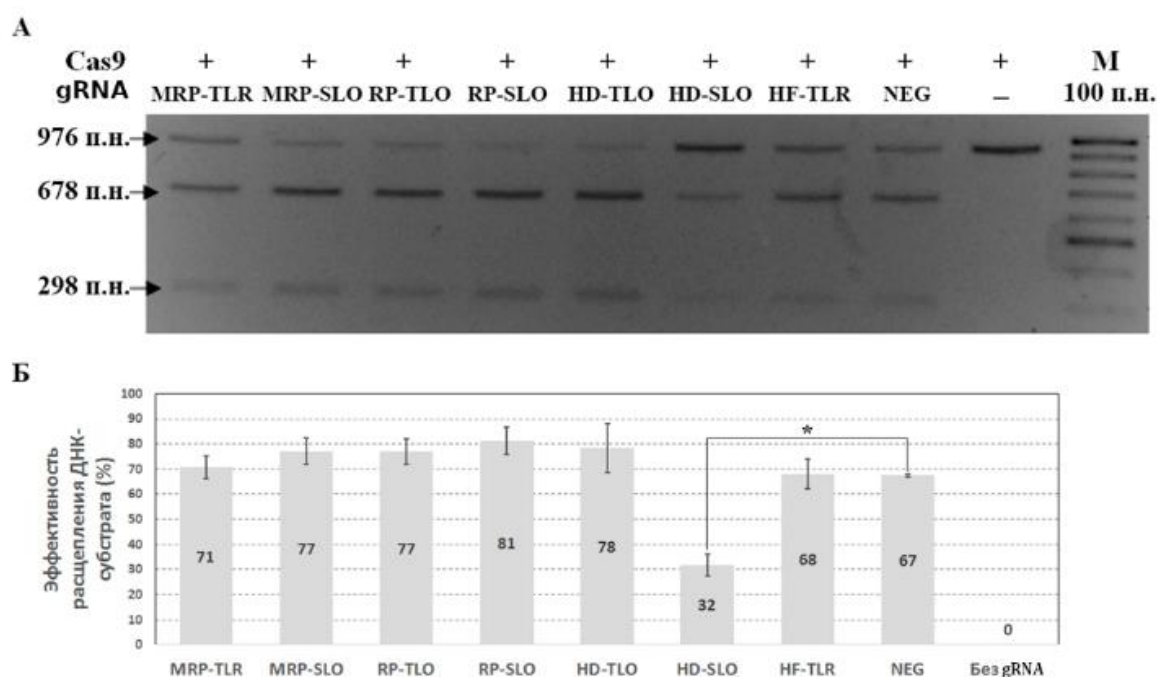


Рисунок 18. Расщепление *in vitro* ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с различными вариантами модифицированных gRNA. М - ДНК маркер с шагом 100 п.н. Продукты реакций *in vitro* расщепления анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле (А) Эффективность расщепления ДНК-субстрата оценивали с помощью денситометрии (Б) Стандартное отклонение приведено для трех независимых экспериментов. * обозначены значимые различия ($p < 0,05$) между средними значениями эффективности расщепления ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с немодифицированной gRNA и в комплексе с модифицированной gRNA.

Количественную оценку эффективности разрезания ДНК-субстрата проводили при помощи денситометрии. Эффективность расщепления

определяли по отношению плотности пикселей в полосах, соответствующих расщепленному ДНК-субстрату к исходному неразрезанному фрагменту (рисунок 18Б). Эффективность разрезания ДНК-субстрата нуклеазой Cas9 в комплексе с немодифицированной РНК (NEG) составляет 67%. Модификация gRNA путем встройки детерминанты импорта HD в прямой конформации в петлю stem loop 2 gRNA (вариант HS-SLO) статистически значимо ($p \leq 0,05$) снижала эффективность расщепления ДНК-субстрата до 32%, то есть более чем в два раза по сравнению с немодифицированной РНК (NEG). Другие варианты модификаций gRNA не приводили к каким-либо статистически значимым изменениям в эффективности расщепления ДНК-субстрата.

При использовании всех вариантов модифицированной gRNA происходило специфическое расщепление ДНК-субстрата (рисунок 18), что указывает на то, что введенные нами модификации не нарушают процесс формирования комплекса gRNA/Cas9, специфичность связывания комплекса с ДНК-субстратом, а также нуклеазную активность Cas9. Однако необходимо отметить, что некоторые из модификаций gRNA приводили как к увеличению, так и снижению эффективности расщепления ДНК-субстрата комплексом gRNA/Cas9. Это может быть связано с влиянием модификаций на стабильность gRNA, эффективность формирования рибонуклеопротеидного комплекса gRNA/Cas9, а также нуклеазную активность Cas9 [285].

В работе Loutre et al. [246] был использован аналогичный подход для импорта gRNA в матрикс митохондрий, только детерминанты импорта были добавлены на 5' либо 3' конец gRNA. В случае модификации 3' конца активность комплекса gRNA/Cas9 *in vitro* была сравнимой с активностью комплекса при использовании немодифицированной РНК, тогда как при модификации 5' конца активность комплекса значительно снижалась. Снижение активности комплекса gRNA/Cas9 при использовании в реакциях *in vitro* gRNA с модифицированным 5' концом, скорее всего, связано с процессированием и деградацией 5' конца модифицированной gRNA, что

было продемонстрировано ранее для gRNA с увеличенным районом спейсера, а также встройкой с 5' конца MS2 и PP7 шпилек [285–287].

Помимо этого, в исследованиях Loutre et al. , Zuriñe et al. и Hussain et al. [224,246,250] было обнаружено, что транспорт направляющей РНК может происходить вне зависимости от наличия в ее нуклеотидной последовательности специфических детерминант митохондриального импорта. Вероятнее всего, вторичные структуры конститутивной части gRNA распознаются как MTS и могут обеспечить потенциальный путь для импорта направляющей РНК в митохондрии млекопитающих.

3.1.2.3 Анализ внутриклеточной локализации модифицированных вариантов направляющей РНК

Для того, чтобы оценить функциональную активность gRNA в условиях *in vivo*, был проведен анализ локализации флуоресцентно меченых вариантов РНК с применением конфокальной прижизненной микроскопии. Изучая импорт анти-репликативных олигорибонуклеотидов, которые содержали в своей последовательности аналогичные шпилечные структуры, в работе Tonin et al. [87] была продемонстрирована интернализация модифицированных РНК в митохондрии культивируемых клеток. В ходе воспроизведения данного эксперимента, клеточные линии HeLa были трансфицированы *in vitro* транскрибированными флуоресцентно мечеными вариантами Alexa488-gRNA HF-TLR и Alexa488-FD20H, синтезированной на основе последовательности, представленной авторами статьи. Alexa488-FD20H вариант РНК был использован в качестве положительного контроля, с доказанной способностью транспортироваться в митохондрии. Меченая Alexa488-gRNA HF-TLR содержит в последовательности tetra loop шпильку HF, которая входит в структуру транспортной РНК дрожжей *S. cerevisiae* и отвечает за импорт в митохондрии tRNA^{Lys} CUU (tRK1). Стоит отметить, что мечение РНК не должно существенно изменять вторичную структуру и, соответственно, влиять на митохондриальный импорт молекулы РНК [201].

Для проведения количественного анализа совместной локализации изображений конфокальной микроскопии мы оценили значения коэффициента корреляции Пирсона. Выявленные в течение первых 24 часов большие скопления флуоресцентного сигнала на периферии клеток (рисунок 19), скорее всего являлись комплексами РНК-Lipofectamine, со слабым коэффициентом корреляции с митохондриями, окрашенными MitoTracker Red (красная флуоресценция) и gRNA, меченными Alexa-488 (зеленая флуоресценция) (Рисунок 20). Подобное распределение сигнала наблюдалось как для контроля Alexa488-FD20H, так и для Alexa488-gRNA HF-TLR.

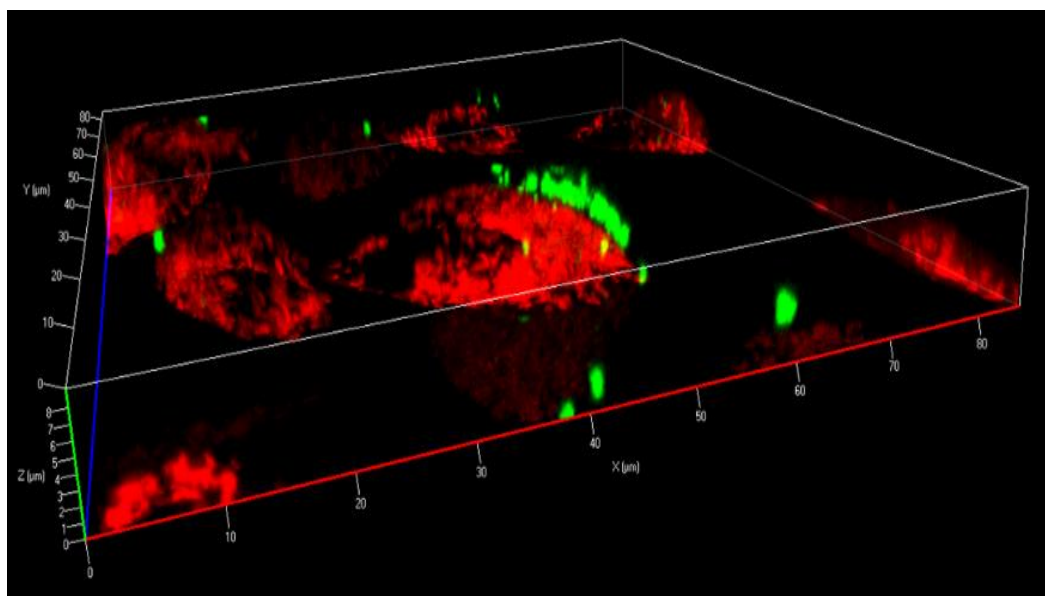


Рисунок 19. 3D реконструкция клеток, трансфицированных флуоресцентно-меченой HF-TLR gRNA спустя 24 часа после трансфекции. Митохондрии окрашены с помощью красителя MitoTracker® Red (красный). gRNA HF-TLR содержит в своей последовательности Alexa Fluor 488-5-UTP (зеленый).

Через 3 дня после трансфекции, распределение зеленой метки резко изменялось. Число скоплений РНК-Lipofectamine уменьшилось, а молекулы РНК были в основном диспергированы внутри клетки, демонстрируя частичную совместную локализацию РНК с митохондриальной сетью (Рисунок 20). Так, соотношение перекрывающихся структур (митохондрий и РНК-молекул) увеличилось на 3 день до $PCC=0,35$ для контрольного варианта

Alexa488-FD20H. С сопоставимой, но немного отличающейся эффективностью, импортируются в митохондрии Alexa488-gRNA HF-TLR (PCC=0,29). Вероятно, слияние-деление митохондрий способствовало процессу диффундирования молекул РНК и, соответственно, более гомогенному распределению флуоресцентной метки в митохондриях в течение 72 часов.

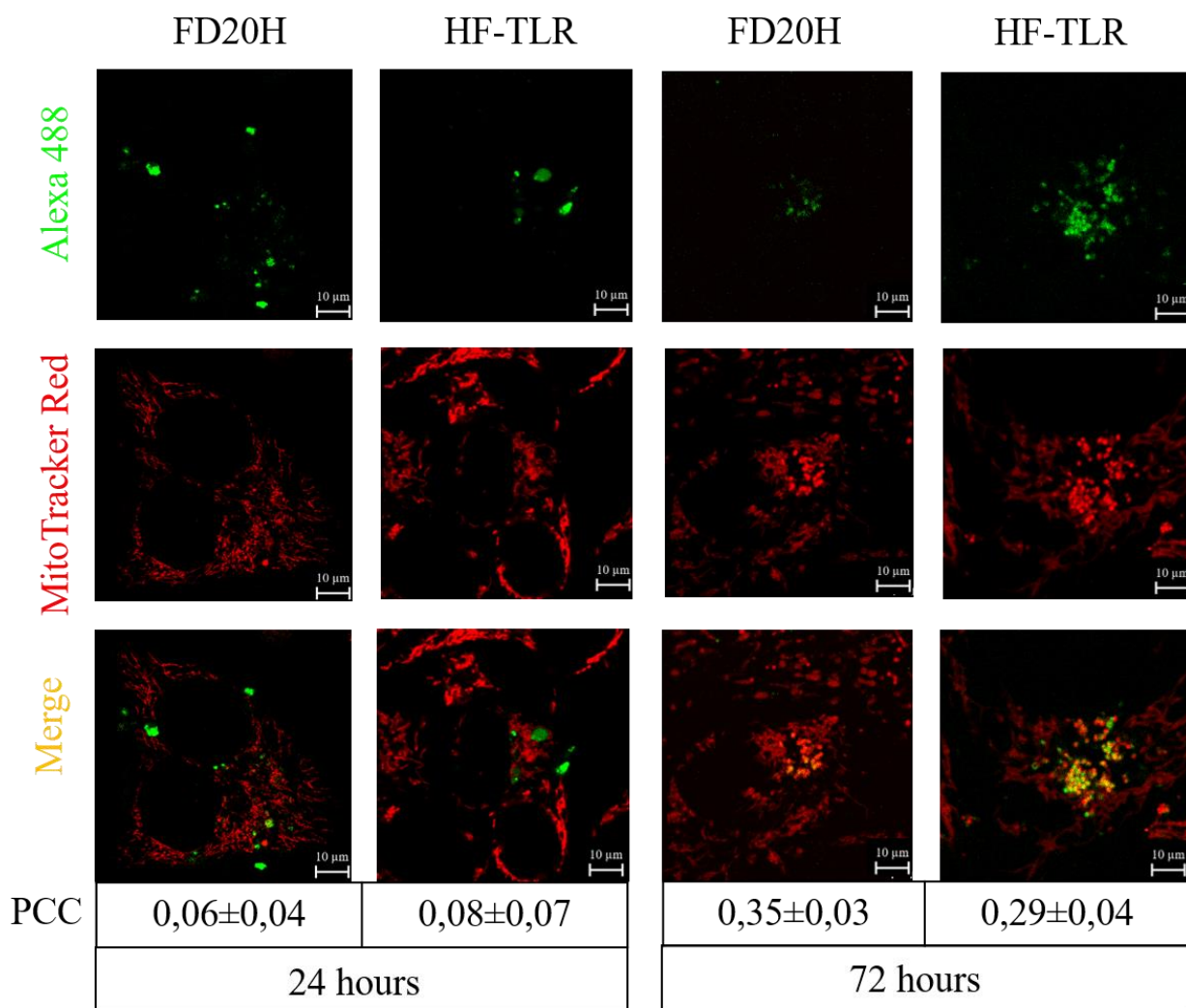


Рисунок 20. Конфокальная микроскопия клеток человека HeLa, трансфицированных вариантами РНК, мечеными Alexa Fluor 488 (зеленый), в различные периоды времени после трансфекции (внизу панели). FD20H - клетки, трансфицированные РНК FD-20H, меченной Alexa Fluor 488-5-UTP, которая импортируется в митохондрии; HF-TLR - клетки, трансфицированные модифицированной направляющей РНК, распознающей мутантный вариант мтДНК, меченной Alexa Fluor 488-5-UTP; MitoTracker Red - визуализация митохондриальной сети с помощью MitoTracker Red; Merge - перекрытие сигналов

красного и зеленого флуоресцентных каналов. Под панелями показана количественная оценка совместной локализации РНК с митохондриями, оцененная для нескольких клеток и 6–10 оптических срезов в трех независимых экспериментах. РСС — коэффициент корреляции Пирсона для пикселей зеленого и красного каналов.

В результате прижизненного анализа клеточной линии HeLa, трансфицированной флуоресцентно-мечеными вариантами РНК, внутриклеточная локализация РНК-молекул была установлена. Однако спустя 96 часов молекулы РНК слабо детектировались, либо не детектировались вовсе. Причиной отсутствия сигнала на 4 день после трансфекции может являться повышенная деградация экзогенных РНК внутриклеточными РНКазами. Сравнивая ряд рекомбинантных молекул, в работе Tonin et al. [87], была продемонстрирована повышенная устойчивость и стабильность только химерных молекул РНК, в которых некоторые вторичные структуры были заменены на последовательности ДНК. Вполне вероятно, что введение подобных последовательностей в gRNA улучшит стабильность трансфецируемых молекул.

В ходе дизайна направляющей РНК, способной импортироваться в матрикс митохондрий, было выявлено, что наиболее оптимальным местом для модификации gRNA и в частности встройки детерминант импорта в митохондрию являются шпильки tetraloop и stem loop 2 в конститутивной части РНК. Показано, что встроенные в структуру направляющей РНК модификации в виде последовательностей, способствующих импорту gRNA в митохондрии, не влияют на функциональную активность комплекса gRNA/Cas9 в условиях *in vitro*. Однако все варианты модификаций необходимо тестировать не только *in vitro*, но и *in vivo* на клеточных линиях, анализируя как активность комплекса gRNA/Cas9, так и эффективность импорта обоих компонентов системы в митохондрии. В результате анализа внутриклеточной локализации gRNA было обнаружено, что введенная в tetraloop gRNA детерминанта импорта HF из транспортной РНК дрожжей,

способствует частичному транспорту направляющей РНК в митохондрии клеточной линии HeLa. Предполагается, что эффективность импорта будет аналогичной и для других вариантов модифицированной gRNA.

Судить о локализации gRNA в митохондриях помимо конфокальной микроскопии возможно опосредованно, анализируя воздействие системы MitoCRISPR/Cas9 в условиях *in vivo*. Помимо этого, определить наличие импортируемых РНК можно при помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией для тотальной РНК, выделенной из изолированных митохондрий клеток, трансфицированных gRNA. Подобным образом в работе Hussain et al. [250] было продемонстрировано присутствие в митохондриях гибридной gRNA, распознающей mt.11205G>A, которая содержала на 5'-конце последовательность RP-петли. Однако помимо модифицированной gRNA авторы также обнаружили присутствие gRNA без петли RP в митохондриальной фракции. Что может быть связано как с неспецифическим транспортом экзогенных РНК в митохондрии, так и с недостаточной очисткой митохондрий от РНК связавшихся с внешней мембраной [289].

3.2 Анализ сдвига гетероплазмии в линиях гибридных клеток при воздействии системы MitoCRISPR/Cas9

Согласно литературным и экспериментальным данным нескольких научных групп, показано, что цинковопальцевые нуклеазы (ZFNs) [209] и нуклеазы на основе TALE белков (TALENs) [210] смещают с различной эффективностью гетероплазмию мтДНК [3,190,211,212,219,220]. Однако существенный ряд недостатков не позволяет широко применять данные системы для редактирования митохондриального генома. Система CRISPR/Cas9 обладает большей гибкостью и специфичностью по сравнению с mtZFNs и mitoTALENs. Для работы системы необходимо заменить спейсер (20п.о.) направляющей РНК, узнающий специфичную последовательность

мтДНК. При этом белковый компонент – нуклеаза MitoCas9 – остается неизменной.

Анализ работы системы MitoCRISPR/Cas9 в условиях *in vivo* проводили путем временной трансфекции исходных и трансгенных клеточных линий векторами, которые экспрессируют различные варианты gRNA либо компоненты системы mtZFN (ZFN с митохондриальной локализацией). Поскольку в работах Gammage et al. и Minczuk et al. [3,212,290,291] было показано, что mtZFNs специфически распознает патогенные варианты мтДНК и смещает уровень гетероплазии в цибридных клеточных линиях с различной эффективностью, данная система была выбрана нами в качестве положительного контроля для анализа воздействия MitoCRISPR/Cas9.

Для оценки работы систем MitoCRISPR/Cas9 и mtZFNs на исходных и трансгенных клеточных линиях были выбраны следующие группы:

1. Необработанный контроль - клеточные линии, не подвергающиеся обработке. Отрицательный контроль.
2. 8993T>G NEG – клетки, трансфицированные вариантом gRNA, против мутации mt.8993T>G и не содержащего детерминанты импорта в своей структуре
3. 8993T>G RP-SLO - клетки, трансфицированные вариантом gRNA, распознающим мутацию mt.8993T>G. Содержит в stem loop2 петле шпильку-детерминанту импорта RP из РНК-компонента рибонуклеазы RP.
4. 8993T>G mtZFNs – клетки трансфицированные компонентами системы mtZFNs, распознающей молекулы мтДНК с мутацией 8993T>G. Положительный контроль.

Трансфекцию клеточных линий NARP3-1, NARP3-2, NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 проводили на 0 и 4 день. Отбор клеток для ПЦР-ПДРФ анализа уровня гетероплазии проводили в 0, 2 и 6 день. Общая схема анализа смещения гетероплазии под воздействием MitoCRISPR/Cas9 и mtZFNs отображена на рисунке 21.

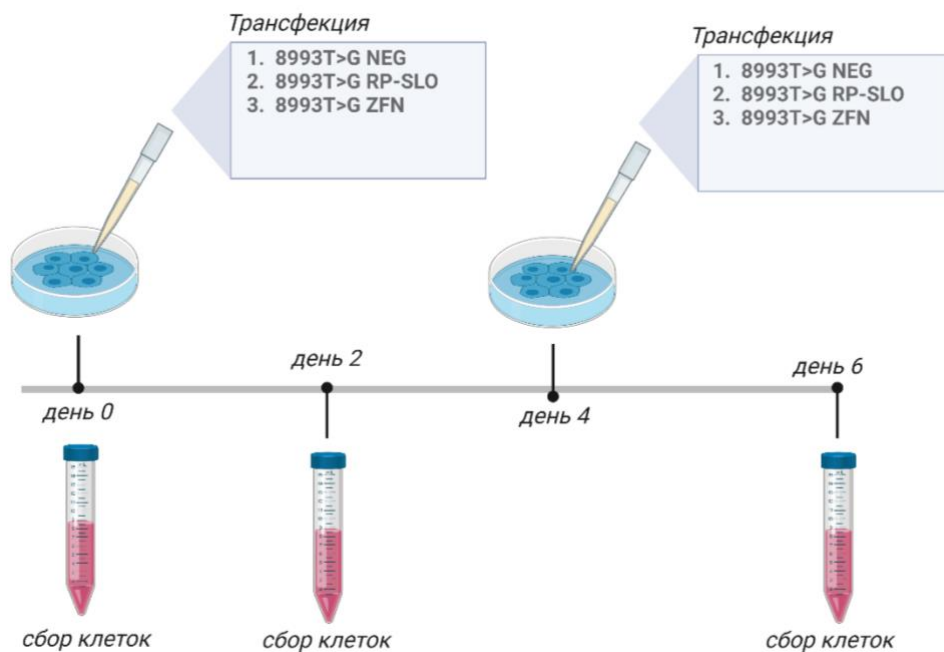


Рисунок 21. Общая схема анализа смещения гетероплазмы в клеточных линиях NARP3-1, NARP3-2, NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1. Трансфекцию различными вариантами gRNA, их комбинациями и ZFN-системой осуществляли на 0 и 4 день в трех независимых повторах. Уровень гетероплазмы анализировали на 2 и 6 день после трансфекции, выделяя тотальную ДНК из обработанных клеток.

Прежде чем проводить анализ смещения гетероплазмы под воздействием систем для элиминации мтДНК, дополнительно был оценен уровень гетероплазмы в исследуемых клеточных линиях в процессе культивирования на разных пассажах (рисунок 22). В результате статистического анализа, с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента, достоверного изменения в количестве копий мтДНК дикого типа в ходе культивирования на 2 и 6 день обнаружено не было. Что дополнительно подтверждает отсутствие неспецифического влияния MitoCas9 на геном митохондрий и на стабильность соотношения молекул дикого и мутантного типа мтДНК в клеточных культурах.

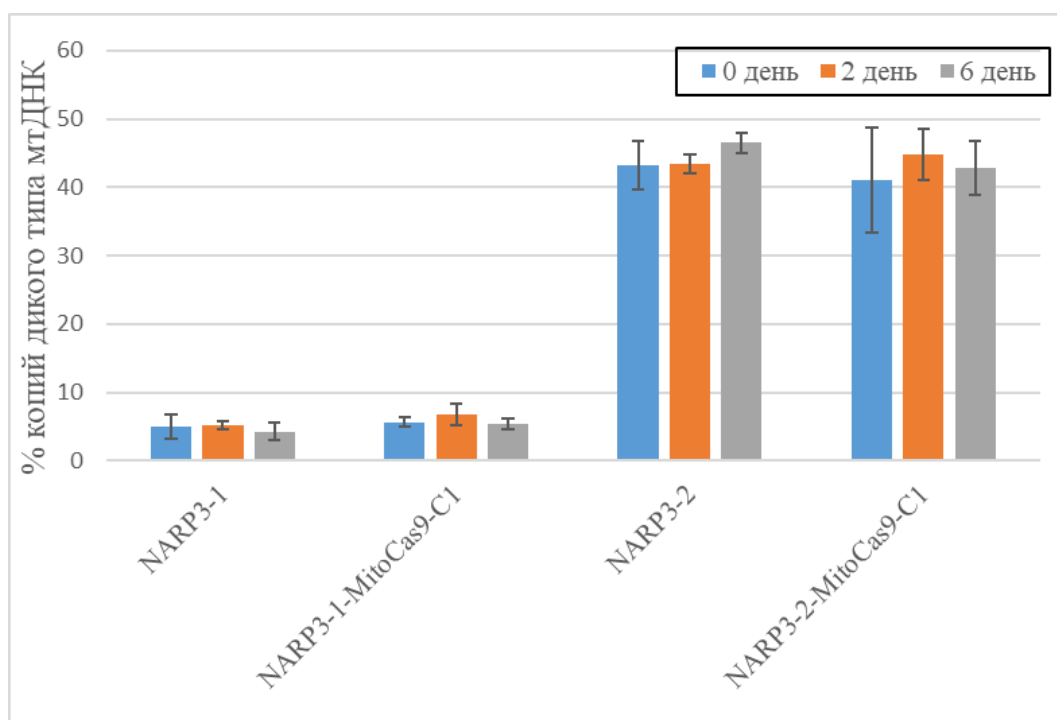


Рисунок 22. Анализ динамики смещения гетероплазии в ходе культивирования NARP3-1, NARP3-2, NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1. Данные представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение; $n = 3$. Статистический анализ проводили с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента, с учетом поправки Бонферрони (p -value <0.025)

Следующим шагом была проверка гипотезы о возможности искусственного смещения гетероплазии в условиях *in vivo* под воздействием системы mtZFNs. Система mtZFN работает как гетеродимер и состоит из двух белковых компонентов: один из мономеров mtZFN, специфично распознает мутацию, в то время как второй мономер связывается с последовательностью дикого типа. Димеризация двух мономеров в комплекс произойдет лишь в том случае, когда оба компонента нуклеазы специфично свяжутся с целевыми последовательностями. При распознавании мутации происходит сборка комплекса и внесение двуцепочечного разрыва в последовательность мтДНК, что в дальнейшем инициирует деградацию линейаризованной молекулы мтДНК. Подобный принцип элиминации мтДНК является основополагающим в смещении гетероплазии мтДНК с помощью искусственных нуклеаз.

Для оценки изменений между необработанным контролем и клетками, трансфицированными 8993T>G mtZFNs, на 2 и 6 день, был выбран односторонний t-критерий Стьюдента, применяемый для данных среди которых одно из сравниваемых средних значений заведомо больше (или меньше) другого, согласно нулевой гипотезе. На основе экспериментальных и литературных данных других научных групп, мы ожидали элиминации мутантных молекул и, соответственно, положительного сдвига гетероплазии в сторону дикого типа мтДНК.

В результате статистического анализа нами было выявлено, что 8993T>G mtZFNs смещает гетероплазию во всех клеточных линиях не только по сравнению с необработанными клетками, но и в пределах одной клеточной линии с достоверной разницей между 2 и 6 днем у NARP3-1 и NARP3-1-MitoCas9-C1 (рисунок 23).

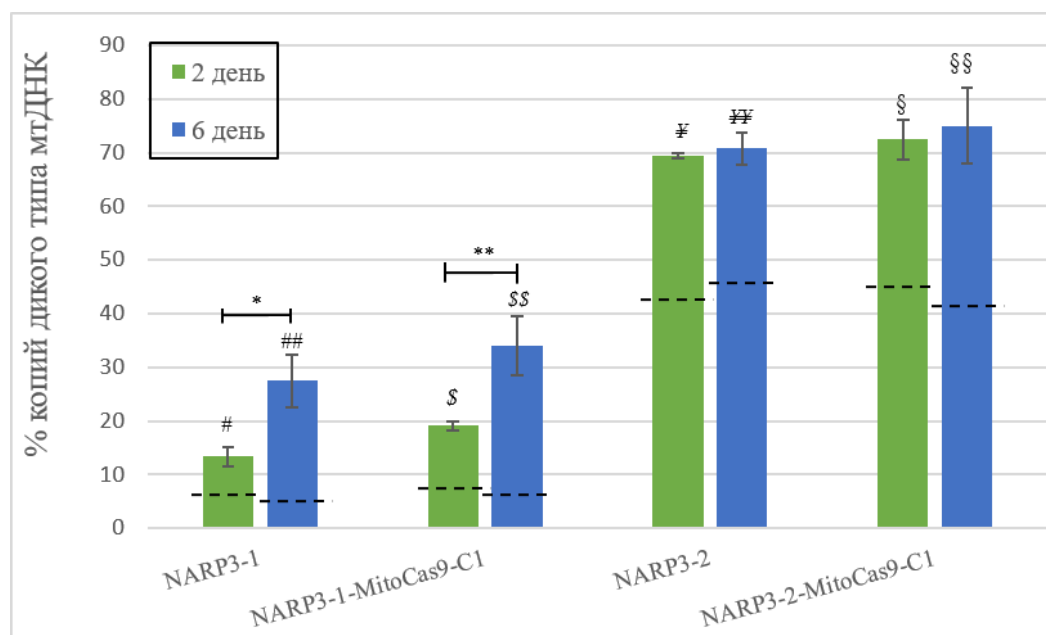


Рисунок 23. Оценка смещения уровня гетероплазии в гибридных клеточных линиях под воздействием системы 8993T>G mtZFNs. Данные представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение; $n = 3$. Штриховой линией обозначены значения «% молекул дикого типа мтДНК» в необработанном контроле для каждой клеточной линии на 2 и 6 день. Символами обозначены достоверные значения с учетом поправки Бонферрони (p -value<0.025) при сравнении с необработанным контролем: # - p -value=0.008; ##- p -value<0.001; \$ - p -value<0.05; \$\$- p -value<0.01; * - p -value<0.05; ** - p -value<0.01; § - p -value<0.05.

value=0.0006; **- p-value=0.008; \$- p-value=0.0013; \$\$- p-value=0.0001; ¥- p-value= 3,22315E-06; ¥¥- p-value=0,0001; §- p-value=0,0004; §§- p-value=0.0011. Достоверные различия, выявленные в одной и той же группе в разные дни обозначены * -p-value=0.004 и **- p-value=0.005.

Ранее собранные и оптимизированные компоненты mtZFN против мутации mt.8993T>G в работе Minczuk et al. [290], демонстрировали селективную элиминацию мутантных вариантов мтДНК спустя 24 часа после обработки цибридных клеток, что сопровождалось сдвигом гетероплазмы от ~7% молекул мтДНК дикого типа до ~17%, по результатам ПЦР-ПДФ анализа [292]. При этом к 18 и 28 дню эффект в цибридных клеточных линиях оставался неизменным. Полученные нами результаты согласуются с данными, описанными в литературе. Так, мы наблюдаем смещение гетероплазмы в сторону мтДНК дикого типа в среднем на 10% для линий NARP3-1 и NARP3-1-MitoCas9-C1, и на 25% у NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1 на второй день после обработки во всех клеточных линиях.

Однако в клеточной линии NARP3-1 и ее трансгенной производной NARP3-1-MitoCas9-C1 мы наблюдаем усиление эффекта на 6 день после 2-х раундов трансфекции векторами, кодирующими компоненты mtZFN 8993T>G. Вероятнее всего, кумулятивный эффект в данных линиях связан с исходным уровнем гетероплазмы. Поскольку число мутантных копий в геноме NARP3-1 и NARP3-1-MitoCas9-C1 изначально было приблизительно 90%, репопуляция молекул мтДНК может происходить медленнее, но при этом стабильно, с нарастающим увеличением числа мтДНК молекул дикого типа. В клеточных линиях с 60% уровнем гетероплазмы (NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1) мы наблюдали увеличение количества молекул мтДНК дикого типа на второй день с сохранением эффекта на 6-ой день после всех раундов трансфекции. Вероятной причиной наблюдаемых изменений лишь на вторые сутки также является исходный уровень гетероплазмы. Чем больше

изначальных копий мтДНК дикого типа в геноме – тем быстрее происходит удаление мутантных копий и замещение их здоровыми молекулами.

На основе полученных нами данных ранее было показано, что модифицированные компоненты системы CRISPR/Cas9 – нуклеаза MitoCas9 и gRNA импортируются в митохондрии клеточных линий. Также было продемонстрировано, что изменения в структуре направляющей РНК не влияют на функциональную активность комплекса Cas9/gRNA в условиях *in vitro*. Следующим логическим шагом в нашей работе являлось проведение анализа функциональной активности MitoCRISPR/Cas9 в условиях *in vivo*.

По результатам двух-факторного дисперсионного анализа данных, полученных в результате количественной оценки ДНК с применением метода денситометрии по данным ПЦР-ПДРФ анализа, было выявлено достоверное смещение уровня гетероплазии в клеточной линии NARP3-1-MitoCas9-C1 при обработке модифицированным вариантом gRNA 8993T>G RP-SLO на шестой день после двух раундов трансфекции (Рисунок 24). Стоит напомнить, помимо того, что данная РНК распознает и связывается с целевой последовательностью мтДНК с мутацией mt.8993T>G, она также содержит в stem loop2 петле детерминанту импорта RP из РНК-компонента рибонуклеазы RP. В работе Hussain et al. [250] при трансфекции gRNA, содержащей на 5'-конце аналогичную шпильку RP, снижение числа мутантных молекул мтДНК происходило через 24 часа. При этом мы детектируем эффект от воздействия MitoCas9/gRNA 8993T>G RP-SLO только на шестой день. Процент мтДНК копий дикого типа сместился с 4% до 14%. Различия могут быть связаны как с разницей в скорости импорта направляющих РНК в митохондрии, так и с различием в методе трансфекции, времени инкубации и количестве повторов обработки gRNA. Как ранее нами было показано, флуоресцентный сигнал от меченой gRNA детектируется в митохондриях спустя 72 часа, соответственно это может сказаться на времени сборки и функционировании всего комплекса.

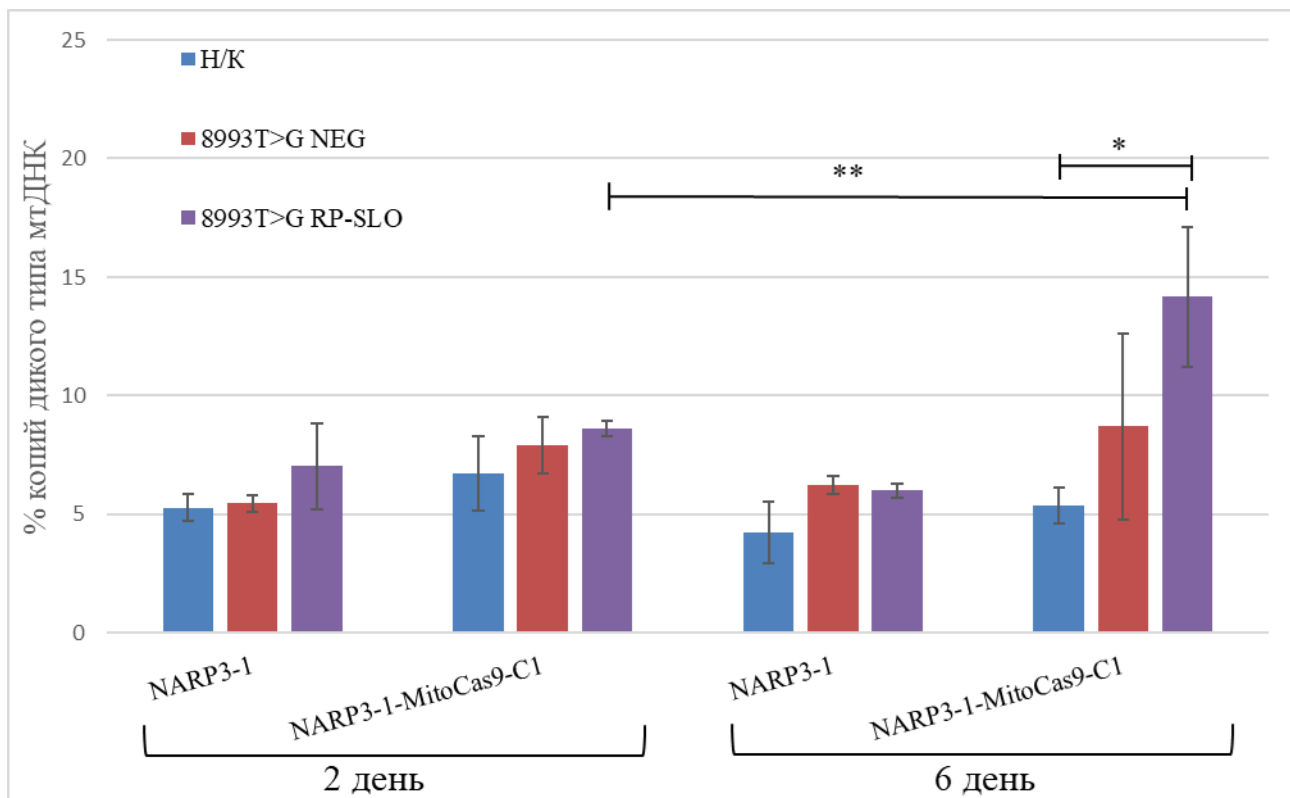


Рисунок 24. Оценка смещения уровня гетероплазии мтДНК под воздействием системы MitoCRISPR/Cas9 по результатам ПЦР-ПДРФ анализа в клеточных линиях NARP3-1и NARP3-1-MitoCas9-C1 в условиях *in vivo*. Достоверные различия между статистическими данными, полученными в результате двух-факторного ANOVA-теста на трех повторах, с учетом коррекции по Бонферрони ($p\text{-value} < 0.008$) обозначены символами: *- $p\text{-value} = 0.00132$, **- $p\text{-value} = 0.00012$. Различия оценивали между исходными и трансгенными линиями, между обработкой и необработанным контролем, между обработками на 2 и 6 день.

При трансфекции клеточной линии NARP3-2-MitoCas9-C1 вариантом gRNA 8993T>G RP-SLO смещение гетероплазии мтДНК детектировали на второй день после обработки (рисунок 25 фиолетовые столбцы). Так количество копий мтДНК дикого типа сместилось с 43% до 55%, при сравнении с необработанным контролем. В исходной клеточной линии достоверных изменений в уровне гетероплазии до и после обработки не детектировали. Полученные данные согласуются с результатами обработки

тех же самых клеточных линий компонентами системы mtZFNs. В обоих случаях сдвиг гетероплазии обнаруживали на 2-ой день после трансфекции, что может свидетельствовать о едином ускоренном механизме репопуляции мтДНК в клетках, с пониженным уровнем гетероплазии (в случае NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1 уровень гетероплазии исходно был равен 60%).

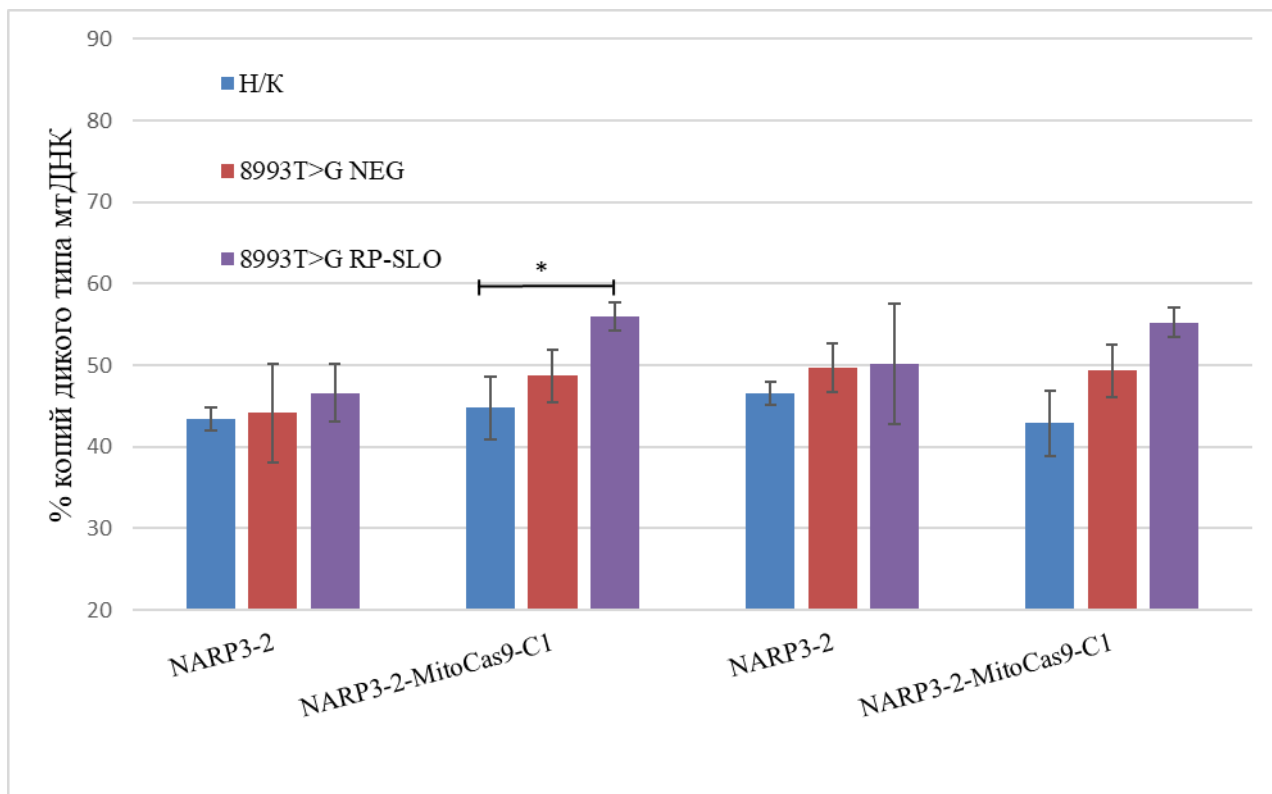


Рисунок 25. Оценка смещения уровня гетероплазии мтДНК под воздействием системы MitoCRISPR/Cas9 по результатам ПЦР-ПДРФ анализа в клеточных линиях NARP3-2 и NARP3-2-MitoCas9-C1 в условиях *in vivo*. Достоверные различия между статистическими данными, полученными в результате двух-факторного ANOVA-теста на трех повторах, с учетом коррекции по Бонферрони (p -value<0.008) обозначены символами: *- p -value=2,79391E-06. Различия оценивали между исходными и трансгенными линиями, между обработкой и необработанным контролем, между обработками на 2 и 6 день.

Когда клеточные линии NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 были трансфицированы вариантом направляющей РНК, не содержащей детерминанту импорта в своей последовательности (8993T>G NEG), достоверных различий в изменении числа немутантных копий мтДНК между

исходными и трансгенными линиями ни в одном из дней обнаружено не было (Рисунок 24 и рисунок 25 красные столбцы). Мы продемонстрировали достоверное снижение числа копий мтДНК в клетках, трансфицированных модифицированным вариантом gRNA 8993T>G RP-SLO. При этом в исходных клеточных линиях, не экспрессирующих MitoCas9, сдвига гетероплазии не наблюдалось, что свидетельствует о функциональной активности MitoCRISPR/Cas9.

Полученную нами систему, как и в целом стратегию сдвига гетероплазии можно в дальнейшем модифицировать и оптимизировать. Так, в работе Loutre et al. [236] было обнаружено, что совместное использование двух направляющих РНК, одна из которых способствует нарушению репликации, а вторая специфично распознает мутантную последовательность, приводит к более эффективному удалению мутантных молекул, чем при применении лишь одного варианта. Авторы статьи объясняли кумулятивный эффект от воздействия двух РНК тем, что РНК, нарушающая репликацию в некодирующем участке мтДНК, делает другие участки мтДНК доступными для распознавания другой gRNA и разрезания мтДНК - мишени, тем самым инициируя дальнейшую деградацию. Помимо этого, в работе Loutre et al. [236] было обнаружено, что расщепляющая активность комплекса gRNA (с F- или D-детерминантами импорта)/Cas9 была частично или полностью заблокирована, что означает, что добавление шпилек в структуру стебель-петля gRNA может влиять на связывание gRNA и нуклеазы Cas9 или на процесс распознавания gRNA и ДНК-мишени в клетках [289].

Таким образом, информация о функциональной активности MitoCRISPR/Cas9 и способах улучшения эффективности ее работы постоянно расширяется. Полученные нами данные предоставляют дополнительные доказательства того, что редактирование генов, опосредованное CRISPR-Cas9, потенциально может быть использовано для терапии митохондриальных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе исследования была проведена работа с имеющимися современными данными по теме, спланирован дизайн и основной ход ключевых экспериментов по адаптации компонентов системы CRISPR/Cas9 для элиминации мутантных копий мтДНК.

Были получены трансгенные цибридные линии клеток NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1 со стабильной экспрессией нуклеазы Cas9, которая направленно импортируется в митохондриальный матрикс. Было продемонстрировано, что независимо от уровня экспрессии *MitoCas9*, уровень гетероплазии мтДНК не меняется. Совместная локализация нуклеазы и митохондрий была показана методом иммуоцитохимического, вестерн-блот и иммуно-электромикроскопического анализа клеточных линий. Дополнительная количественная оценка перекрытия двух объектов на изображениях с помощью анализа колокализации, подтвердила интернализацию *MitoCas9* во внутреннем пространстве митохондрий. Предполагается, что внутриклеточная экспрессия *MitoCas9* может индуцировать окислительный стресс в трансгенных клеточных линиях NARP3-1-MitoCas9-C1 и NARP3-2-MitoCas9-C1, что наблюдается в виде изменения в биогенезе митохондрий. Полученные в результате трансгенеза клеточные линии позволяют проводить дальнейший анализ воздействия системы MitoCRISPR/Cas9 на функциональном уровне.

Мы разработали гибридную структуру направляющей РНК, содержащую в своей последовательности различные детерминанты митохондриального импорта, для специфического распознавания мтДНК молекул, несущих мутацию mt.8993T>G. В условиях *in vitro* эксперимента по разрезанию ДНК последовательности мишени, нами было показано отсутствие влияния введенных модификаций на функциональную активность комплекса gRNA/Cas9. Доказанный с помощью флуоресцентной микроскопии импорт флуоресцентно-меченой gRNA в митохондрии, позволил нам

использовать модифицированные gRNA для дальнейших анализов в условиях *in vivo*.

В экспериментах по анализу уровня гетероплазии в клеточных линиях, в результате воздействия системы MitoCRISPR/Cas9, нами было обнаружено достоверное смещение уровня гетероплазии в сторону мтДНК дикого типа на 2 и 6 день после обработки плазмидами, кодирующими различные варианты РНК-компонента системы.

Оба компонента системы MitoCRISPR/Cas9, модифицированные для экспрессии в митохондриях, демонстрируют успешное применение CRISPR/Cas9 для редактирования митохондриального генома и предполагают возможность манипуляций с мтДНК в условиях *in vitro* и *in vivo*. Полученные нами данные представляются перспективными и могут открыть большие возможности для фундаментальных исследований и прикладного использования в медицине

ВЫВОДЫ

1. Полученные трансгенные линии со стабильной экспрессией нуклеазы *MitoCas9*, импортируемой в матрикс митохондрий, на основе цибридных клеточных линий, моделирующих синдромы NARP и Лея, могут быть использованы для оптимизации подходов использования системы MitoCRISPR/Cas9
2. Введение в трансгенные цибридные клеточные линии гена *MitoCas9* не приводит к изменению уровня гетероплазии в процессе длительного культивирования клеток
3. Экспрессия *MitoCas9* в трансгенных клеточных линиях приводит к изменению морфологии митохондрий
4. Введение детерминант митохондриального импорта в петли tetraloop и stem loop2 направляющей РНК (gRNA) способствует ее импорту в митохондрии и не нарушает функциональную активность системы CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro*
5. Действие нуклеазы *MitoCas9* и модифицированной gRNA в трансгенных линиях цибридов вызывает направленный сдвиг гетероплазии на уровне 10%

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schaefer A.M. et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults // *Ann. Neurol.* 2008. Vol. 63, № 1. P. 35–39.
2. DiMauro S., Schon E.A. Mitochondrial DNA mutations in human disease // *Am. J. Med. Genet.* 2001. Vol. 106, № 1. P. 18–26.
3. Gammage P.A. et al. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2016. Vol. 44, № 16. P. 7804–7816.
4. Nass M.M.K. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS: I. Fixation and Electron Staining Reactions // *J. Cell Biol.* 1963. Vol. 19, № 3. P. 593–611.
5. Schatz G., Haslbrunner E., Tuppy H. Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1964. Vol. 15, № 2. P. 127–132.
6. Anderson S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome // *Nature.* 1981. Vol. 290, № 5806. P. 457–465.
7. Nicholls T.J., Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA // *Exp. Gerontol.* Elsevier Inc., 2014. Vol. 56. P. 175–181.
8. Litonin D. et al. Human mitochondrial transcription revisited: Only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 24. P. 18129–18133.
9. Gustafsson C.M., Falkenberg M., Larsson N.G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA // <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>. *Annual Reviews*, 2016. Vol. 85. P. 133–160.
10. Tan B.G. et al. The human mitochondrial genome contains a second light strand promoter // *Mol. Cell.* Cell Press, 2022.
11. Wolstenholme D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. // *Int. Rev. Cytol.* 1992. Vol. 141. P. 173–216.

12. Ojala D., Montoya J., Attardi G. TRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria // *Nature*. 1981. Vol. 290, № 5806. P. 470–474.
13. Lott M.T. et al. MtDNA variation and analysis using Mitomap and Mitomaster // *Curr. Protoc. Bioinforma.* John Wiley and Sons Inc., 2013. Vol. 44, № SUPPL.44.
14. Shokolenko I.N., Alexeyev M.F. Mitochondrial transcription in mammalian cells // *Front. Biosci. Frontiers in Bioscience*, 2017. Vol. 22, № 5. P. 4520.
15. Satoh M., Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell // *Exp. Cell Res.* 1991. Vol. 196, № 1. P. 137–140.
16. Legros F. et al. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA // *J. Cell Sci. J Cell Sci*, 2004. Vol. 117, № 13. P. 2653–2662.
17. Xin J.C., Butow R.A. The organization and inheritance of the mitochondrial genome // *Nature Reviews Genetics. Nat Rev Genet*, 2005. Vol. 6, № 11. P. 815–825.
18. Kucej M., Butow R.A. Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids // *Trends in Cell Biology. Trends Cell Biol*, 2007. Vol. 17, № 12. P. 586–592.
19. Malka F., Lombès A., Rojo M. Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: Focus on vertebrate nucleoids // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. Elsevier*, 2006. Vol. 1763, № 5–6. P. 463–472.
20. Ekstrand M.I. et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals // *Hum. Mol. Genet.* 2004. Vol. 13, № 9. P. 935–944.
21. Shutt T.E., Gray M.W. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins // *Trends Genet. Elsevier Ltd*, 2006. Vol. 22, № 2. P. 90–95.
22. Kukat C. et al. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. Vol. 108, № 33. P. 13534–

- 13539.
23. Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. // *Essays Biochem.* 2018. Vol. 62, № 3. P. 287–296.
 24. Longley M.J. et al. The Fidelity of Human DNA Polymerase γ with and without Exonucleolytic Proofreading and the p55 Accessory Subunit // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 42. P. 38555–38562.
 25. Gray H. W.T.W. Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase. // *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 1992. Vol. 267, № March, 25. P. 5835–5841.
 26. Nissanka N. et al. The mitochondrial DNA polymerase gamma degrades linear DNA fragments precluding the formation of deletions // *Nat. Commun. Springer US*, 2018. Vol. 9, № 1. P. 2491.
 27. Lim S.E., Longley M.J., Copeland W.C. The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 53. P. 38197–38203.
 28. Johnson A.A. et al. Human Mitochondrial DNA Polymerase Holoenzyme: Reconstitution and Characterization [†] // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39, № 7. P. 1702–1708.
 29. Carrodegua J.A., Pinz K.G., Bogenhagen D.F. DNA binding properties of human pol γ B // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 51. P. 50008–50014.
 30. Lin C.-S. et al. High Mitochondrial DNA Copy Number and Bioenergetic Function Are Associated with Tumor Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13, № 9. P. 11228–11246.
 31. Korhonen J.A. et al. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro // *EMBO J.* 2004. Vol. 23, № 12. P. 2423–2429.
 32. Hermoso J.M. et al. Volume 13 Number 21 1985 of phage Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research. 1985. Vol. 13, № 21. P. 7715–7728.

33. Tiranti V. et al. Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB) // *Gene*. 1993. Vol. 126, № 2. P. 219–225.
34. Farr C.L., Wang Y., Kaguni L.S. Functional interactions of mitochondrial dna polymerase and single- stranded DNA-binding protein. Template-primer DNA binding and initiation and elongation of DNA strand synthesis // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 21. P. 14779–14785.
35. Korhonen J.A., Gaspari M., Falkenberg M. TWINKLE has 5' и 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 49. P. 48627–48632.
36. Ladoukakis E.D. human mitochondrial DNA. 2004. P. 27543.
37. McKinney E.A., Oliveira M.T. Replicating animal mitochondrial DNA // *Genet. Mol. Biol.* 2013. Vol. 36, № 3. P. 308–315.
38. Kasamatsu H., Robberson D.L., Vinograd J. A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1971. Vol. 68, № 9. P. 2252–2257.
39. Clayton D.A. Replication of animal mitochondrial DNA // *Cell*. 1982. Vol. 28, № 4. P. 693–705.
40. Fusté J.M. et al. Mitochondrial RNA Polymerase Is Needed for Activation of the Origin of Light-Strand DNA Replication // *Mol. Cell. Cell Press*, 2010. Vol. 37, № 1. P. 67–78.
41. Chang D.D., Clayton D.A. Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA // *Cell*. 1984. Vol. 36, № 3. P. 635–643.
42. Wanrooij S. et al. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 32. P. 11122–11127.
43. Wong T.W., Clayton D.A. In vitro replication of human mitochondrial DNA:

- Accurate initiation at the origin of light-strand synthesis // *Cell*. 1985. Vol. 42, № 3. P. 951–958.
44. Miralles Fusté J. et al. In Vivo Occupancy of Mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein Supports the Strand Displacement Mode of DNA Replication // *PLoS Genet*. 2014. Vol. 10, № 12.
 45. Shadel G.S., Clayton D.A. Mitochondrial Dna Maintenance in Vertebrates // *Annu. Rev. Biochem*. 1997. Vol. 66, № 1. P. 409–435.
 46. Yasukawa T. et al. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand // *EMBO J*. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 25, № 22. P. 5358–5371.
 47. Yang M.Y. et al. Biased Incorporation of Ribonucleotides on the Mitochondrial L-Strand Accounts for Apparent Strand-Asymmetric DNA Replication // *Cell*. Cell Press, 2002. Vol. 111, № 4. P. 495–505.
 48. Holmes J.B. et al. Primer retention owing to the absence of RNase H1 is catastrophic for mitochondrial DNA replication // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2015. Vol. 112, № 30. P. 9334–9339.
 49. Holt I.J., Lorimer H.E., Jacobs H.T. Coupled Leading- and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA // *Cell*. Cell Press, 2000. Vol. 100, № 5. P. 515–524.
 50. Bowmaker M.R. et al. Mammalian Mitochondrial DNA Replicates Bidirectionally from an Initiation Zone // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278, № 51. P. 50961–50969.
 51. Fish J., Raule N., Attardi G. Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis // *Science (80-.)*. 2004. Vol. 306, № 5704. P. 2098–2101.
 52. Montoya J. et al. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1982. Vol. 79, № 23. P. 7195–7199.
 53. Montoya J., Gaines G.L., Attardi G. The pattern of transcription of the human

- mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units // *Cell*. 1983. Vol. 34, № 1. P. 151–159.
54. Ngo H.B. et al. Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 5. P. 1–12.
 55. Curran S., Murray G.I. An introduction to laser-based tissue microdissection techniques. // *Methods Mol. Biol.* Clift. Nj. 2005. Vol. 293, № 5. P. 3–8.
 56. Posse V., Gustafsson C.M. Human mitochondrial transcription factor B2 is required for promoter melting during initiation of transcription // *J. Biol. Chem.* 2017. Vol. 292, № 7. P. 2637–2645.
 57. Sologub M. et al. TFB2 is a transient component of the catalytic site of the human mitochondrial RNA polymerase. // *Cell*. 2009. Vol. 139, № 5. P. 934–944.
 58. Arnold J.J. et al. Sensitivity of Mitochondrial Transcription and Resistance of RNA Polymerase II Dependent Nuclear Transcription to Antiviral Ribonucleosides // *PLoS Pathog.* 2012. Vol. 8, № 11.
 59. Minczuk M. et al. TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39, № 10. P. 4284–4299.
 60. Hale F. Disillusioned conservative: The evolution of Gabriel Scott's political views // *Scand. Stud.* 2007. Vol. 79, № 3. P. 295–318.
 61. American Society of Biological Chemists., Rockefeller Institute for Medical Research., American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of biological chemistry.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
 62. Gohil V.M. et al. Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression. // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 18. P. 13742–13747.
 63. Yakubovskaya E. et al. Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription // *Cell*. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 141, № 6. P. 982–993.

64. Gorman G.S. Clinical and Genotypic aspects of Mitochondrial Disease // MRCP.
65. Jemt E. et al. Regulation of DNA replication at the end of the mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE and a conserved sequence element // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № 19. P. 9262–9275.
66. Osawa S. et al. Recent evidence for evolution of the genetic code // Microbiol. Rev. 1992. Vol. 56, № 1. P. 229–264.
67. Temperley R. et al. Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes // Science (80-.). 2010. Vol. 327, № 5963. P. 301.
68. Watson K. The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *saccharomyces cerevisiae* // J. Cell Biol. 1972. Vol. 55, № 3. P. 721–726.
69. Sevarino K.A., Poyton R.O. Mitochondrial membrane biogenesis: Identification of a precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit II, an integral polypeptide // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1980. Vol. 77, № 1. P. 142–146.
70. Tomecki R. et al. Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32, № 20. P. 6001–6014.
71. Lapkouski M., Hällberg B.M. Structure of mitochondrial poly(A) RNA polymerase reveals the structural basis for dimerization, ATP selectivity and the SPAX4 disease phenotype // Nucleic Acids Res. 2015. Vol. 43, № 18. P. 9065–9075.
72. Nagaike T. et al. Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, № 20. P. 19721–19727.
73. Verechshagina N.A. et al. Import of Proteins and Nucleic Acids into Mitochondria // Biochem. 2018. Vol. 83, № 6. P. 643–661.

74. Neupert W., Herrmann J. Neupert, W. & Herrmann, J. M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723-749 // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. Vol. 76. P. 723–749.
75. Moczko M. et al. The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. Vol. 17, № 11. P. 6574–6584.
76. Abe Y. et al. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20 // *Cell.* 2000. Vol. 100, № 5. P. 551–560.
77. Wu Y., Sha B. Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. Vol. 13, № 7. P. 589–593.
78. Straub S.P. et al. Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery // *Biol. Chem.* 2016. Vol. 397, № 11.
79. Chacinska A. et al. Mitochondrial translocation contact sites: Separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex // *EMBO J.* 2003. Vol. 22, № 20. P. 5370–5381.
80. Hell K., Neupert W., Stuart R.A. Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA // *EMBO J.* 2001. Vol. 20, № 6. P. 1281–1288.
81. Chang D.D., Clayton D.A. A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA // *Science.* 1987. Vol. 235. P. 1178–1184.
82. Li K. et al. Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. // *J. Cell Biol.* Rockefeller University Press, 1994. Vol. 124, № 6. P. 871–882.
83. Doersen C.J. et al. Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity // *J. Biol. Chem.* American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 1985. Vol. 260, № 10. P. 5942–5949.

84. Yoshionari S. et al. Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria // FEBS Lett. No longer published by Elsevier, 1994. Vol. 338, № 2. P. 137–142.
85. Magalhães P.J., Andreu A.L., Schon E.A. Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. // Mol. Biol. Cell. American Society for Cell Biology, 1998. Vol. 9, № 9. P. 2375–2382.
86. Wang G. et al. PNPASE regulates RNA import into mitochondria // Cell. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 142, № 3. P. 456–467.
87. Tonin Y. et al. Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA // Biochimie. Elsevier Masson SAS, 2014. Vol. 100, № 1. P. 192–199.
88. Smirnov A. et al. Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18 // Genes Dev. 2011. Vol. 25, № 12. P. 1289–1305.
89. Jeandard D. et al. Import of Non-Coding RNAs into Human Mitochondria: A Critical Review and Emerging Approaches // Cells. 2019. Vol. 8, № 3. P. 286.
90. Leucci E. et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON // Nature. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 531, № 7595. P. 518–522.
91. Filatova A.Y. et al. Long noncoding rnas are a promising therapeutic target in various diseases // Bull. Russ. State Med. Univ. 2017. Vol. 6, № 3. P. 5–16.
92. Chen K., Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs // Nature Reviews Genetics. Nat Rev Genet, 2007. Vol. 8, № 2. P. 93–103.
93. Barrey E. et al. Pre-microRNA and Mature microRNA in Human Mitochondria // PLoS One / ed. Klymkowsky M. Public Library of Science, 2011. Vol. 6, № 5. P. e20220.
94. Sripada L. et al. Systematic Analysis of Small RNAs Associated with Human Mitochondria by Deep Sequencing: Detailed Analysis of Mitochondrial Associated miRNA // PLoS One / ed. Pfeffer S. Public Library of Science,

2012. Vol. 7, № 9. P. e44873.
95. Bandiera S. et al. Nuclear Outsourcing of RNA Interference Components to Human Mitochondria // PLoS One / ed. Pfeffer S. Public Library of Science, 2011. Vol. 6, № 6. P. e20746.
 96. Geiger J., Dalgaard L.T. Interplay of mitochondrial metabolism and microRNAs // Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG, 2017. Vol. 74, № 4. P. 631–646.
 97. Zhang X. et al. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation // Cell. Cell Press, 2014. Vol. 158, № 3. P. 607–619.
 98. Das S. et al. Divergent effects of miR-181 family members on myocardial function through protective cytosolic and detrimental mitochondrial microRNA targets // J. Am. Heart Assoc. John Wiley and Sons Inc., 2017. Vol. 6, № 3.
 99. Jagannathan R. et al. Translational Regulation of the Mitochondrial Genome Following Redistribution of Mitochondrial MicroRNA in the Diabetic Heart // Circ. Cardiovasc. Genet. Lippincott Williams and Wilkins, 2015. Vol. 8, № 6. P. 785–802.
 100. Brown W.M. et al. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution // J. Mol. Evol. Springer-Verlag, 1982. Vol. 18, № 4. P. 225–239.
 101. Cassano A.G., Anderson V.E., Harris M.E. Evidence for direct attack by hydroxide in phosphodiester hydrolysis // J. Am. Chem. Soc. J Am Chem Soc, 2002. Vol. 124, № 37. P. 10964–10965.
 102. Kaufman B.A., Picard M., Sondheimer N. Mitochondrial DNA, nuclear context, and the risk for carcinogenesis // Environ. Mol. Mutagen. John Wiley and Sons Inc., 2019. Vol. 60, № 5. P. 455–462.
 103. Floros V.I. et al. Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos // Nat. Cell Biol. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 20, № 2. P. 144–151.

104. Kauppila J.H.K. et al. Base-excision repair deficiency alone or combined with increased oxidative stress does not increase mtDNA point mutations in mice // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2018. Vol. 46, № 13. P. 6642–6649.
105. Rossignol R. et al. Mitochondrial threshold effects // *Biochem. J.* Biochem J, 2003. Vol. 370, № 3. P. 751–762.
106. Bacman S.R. et al. Manipulation of mitochondrial genes and mtDNA heteroplasmy // *Methods in Cell Biology.* Academic Press Inc., 2020. Vol. 155. P. 441–487.
107. Tuppen H.A.L. et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* Biochim Biophys Acta, 2010. Vol. 1797, № 2. P. 113–128.
108. Rai P.K. et al. Advances in methods for reducing mitochondrial DNA disease by replacing or manipulating the mitochondrial genome // *Essays Biochem.* Portland Press Ltd, 2018. Vol. 62, № 3. P. 455–465.
109. Wei W., Chinnery P.F. Inheritance of mitochondrial DNA in humans: implications for rare and common diseases // *J. Intern. Med.* Blackwell Publishing Ltd, 2020. Vol. 287, № 6. P. 634–644.
110. Payne B.A.I. et al. Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA // *Hum. Mol. Genet.* Oxford Academic, 2013. Vol. 22, № 2. P. 384–390.
111. Li M. et al. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes // *Am. J. Hum. Genet.* Cell Press, 2010. Vol. 87, № 2. P. 237–249.
112. Giuliani C. et al. Transmission from centenarians to their offspring of mtDNA heteroplasmy revealed by ultra-deep sequencing // *Aging (Albany. NY).* Impact Journals LLC, 2014. Vol. 6, № 6. P. 454–467.
113. van den Ameele J. et al. Mitochondrial heteroplasmy beyond the oocyte bottleneck // *Semin. Cell Dev. Biol.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 97. P. 156–166.
114. Hauswirth W.W., Laipis P.J. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal

- lineage of Holstein cows. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. Vol. 79, № 15. P. 4686–4690.
115. Cao L. et al. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells // Nat. Genet. Nat Genet, 2007. Vol. 39, № 3. P. 386–390.
 116. Cao L. et al. New evidence confirms that the mitochondrial bottleneck is generated without reduction of mitochondrial DNA content in early primordial germ cells of mice // PLoS Genet. PLoS Genet, 2009. Vol. 5, № 12. P. e1000756.
 117. Jenuth J.P. et al. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA // Nat. Genet. Nat Genet, 1996. Vol. 14, № 2. P. 146–151.
 118. Chen X. et al. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes // Am. J. Hum. Genet. Elsevier, 1995. Vol. 57, № 2. P. 239–247.
 119. Cree L.M. et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes // Nat. Genet. Nat Genet, 2008. Vol. 40, № 2. P. 249–254.
 120. Freyer C. et al. Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission // Nat. Genet. 2012. Vol. 44 (11), № 11. P. 1282–1285.
 121. Wonnapijit P., Chinnery P.F., Samuels D.C. Previous Estimates of Mitochondrial DNA Mutation Level Variance Did Not Account for Sampling Error: Comparing the mtDNA Genetic Bottleneck in Mice and Humans // Am. J. Hum. Genet. 2010. Vol. 86(4), № 4. P. 540–550.
 122. Cree L.M., Samuels D.C., Chinnery P.F. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 2009. Vol. 1792(12), № 12. P. 1097–1102.
 123. Stewart J.B., Chinnery P.F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease // Nat. Rev. Genet.

- Nature Publishing Group, 2015. Vol. 16, № 9. P. 530–542.
124. Wallace D.C. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy // *Science* (80-.). 1988. Vol. 242, № 4884. P. 1427–1430.
 125. Nissanka N., Moraes C.T. Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches // *EMBO Rep.* 2020. Vol. 21, № 3. P. e49612.
 126. Man P.Y.W., Turnbull D.M., Chinnery P.F. Leber hereditary optic neuropathy // *J. Med. Genet.* BMJ Publishing Group, 2002. Vol. 39, № 3. P. 162–169.
 127. Kim J.Y., Hwang J.M., Park S.S. Mitochondrial DNA C4171A/ND1 is a novel primary causative mutation of Leber's hereditary optic neuropathy with a good prognosis // *Ann. Neurol.* *Ann Neurol*, 2002. Vol. 51, № 5. P. 630–634.
 128. Spruijt L. et al. A MELAS-associated ND1 mutation causing Leber hereditary optic neuropathy and spastic dystonia // *Arch. Neurol.* *Arch Neurol*, 2007. Vol. 64, № 6. P. 890–893.
 129. Jun A.S., Brown M.D., Wallace D.C. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia (heteroplasmy/oxidative phosphorylation/mtDNA haplotype) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. 6206–6210 p.
 130. Meyerson C., Van Stavern G., McClelland C. Leber hereditary optic neuropathy: Current perspectives // *Clin. Ophthalmol.* Dove Medical Press Ltd, 2015. Vol. 9. P. 1165–1176.
 131. Мазунин И. О., Володько Н.В., Стариковская Е. Б. С.П.И. Митохондриальный геном и митохондриальное заболевание человека // *Молекулярная биология.* 2010. Vol. 44, № 5. P. 755–772.
 132. White S.L. et al. Two cases of prenatal analysis for the pathogenic T to G substitution at nucleotide 8993 in mitochondrial DNA // *Prenat. Diagn.* John Wiley & Sons, Ltd, 1999. Vol. 19, № 12. P. 1165–1168.

133. Schon E.A. et al. Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis // *Semin. Cell Dev. Biol.* Elsevier Ltd, 2001. Vol. 12, № 6. P. 441–448.
134. Solaini G. et al. The study of the pathogenic mechanism of mitochondrial diseases provides information on basic bioenergetics // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* Elsevier, 2008. Vol. 1777, № 7–8. P. 941–945.
135. De Praeter C. et al. Extremely high mutation load of the mitochondrial 8993 T>G mutation in a newborn: implications for prognosis and family planning decisions // *Eur. J. Pediatr.* Springer Verlag, 2015. Vol. 174, № 2. P. 267–270.
136. Thorburn D.R., Rahman S. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP // *GeneReviews.* University of Washington, Seattle, 2014. P. 1–30.
137. Martikainen M.H., Kytövuori L., Majamaa K. Juvenile parkinsonism, hypogonadism and Leigh-like MRI changes in a patient with m.4296G>A mutation in mitochondrial DNA // *Mitochondrion.* Elsevier, 2013. Vol. 13, № 2. P. 83–86.
138. Mkaouar-Rebai E. et al. Two new mutations in the MT-TW gene leading to the disruption of the secondary structure of the tRNA^{Trp} in patients with Leigh syndrome // *Mol. Genet. Metab.* Academic Press, 2009. Vol. 97, № 3. P. 179–184.
139. Shanske S. et al. The G13513A Mutation in the ND5 Gene of Mitochondrial DNA as a Common Cause of MELAS or Leigh Syndrome Evidence From 12 Cases.
140. Bannwarth S. et al. Prevalence of rare mitochondrial DNA mutations in mitochondrial disorders // *J. Med. Genet.* BMJ Publishing Group Ltd, 2013. Vol. 50, № 10. P. 704–714.
141. Moslemi A.R. et al. Two new mutations in the MTATP6 gene associated with Leigh syndrome // *Neuropediatrics.* Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York, 2005. Vol. 36, № 5. P. 314–318.

142. Aravintha Siva M. et al. Gene therapy for the mitochondrial genome: Purging mutations, pacifying ailments // *Mitochondrion*. Elsevier B.V., 2019. Vol. 46. P. 195–208.
143. Shoffner J.M. et al. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation // *Cell*. Cell Press, 1990. Vol. 61, № 6. P. 931–937.
144. Mancuso M. et al. The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? // *J. Neurol.* Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG, 2014. Vol. 261, № 3. P. 504–510.
145. Manwaring N. et al. Population prevalence of the MELAS A3243G mutation // *Mitochondrion*. Elsevier, 2007. Vol. 7, № 3. P. 230–233.
146. Goto Y.I., Nonaka I., Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies // *Nature*. Nature Publishing Group, 1990. Vol. 348, № 6302. P. 651–653.
147. Nesbitt V. et al. The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: Clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation - Implications for diagnosis and management // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. BMJ Publishing Group, 2013. Vol. 84, № 8. P. 936–938.
148. Литвинова Н.А., Воронкова А.С., Сухоруков В.С. Патогенные точечные мутации митохондриальной ДНК. 2014. № 2013. P. 29–34.
149. Gorman G.S. et al. Mitochondrial diseases // *Nat. Rev. Dis. Prim.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 2, № 1. P. 1–22.
150. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies // *Nature*. Nature Publishing Group, 1988. Vol. 331, № 6158. P. 717–719.
151. Gorman G.S. et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. // *Ann. Neurol.* Wiley-Blackwell, 2015. Vol. 77, № 5. P. 753–759.
152. Pitceathly R.D.S., Rahman S., Hanna M.G. Single deletions in mitochondrial

- DNA - Molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice // Neuromuscular Disorders. Elsevier, 2012. Vol. 22, № 7. P. 577–586.
153. Moraes C.T. et al. Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions // Muscle Nerve. John Wiley & Sons, Ltd, 1995. Vol. 18, № S14. P. S150–S153.
 154. Zeviani M. et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome // Neurology. Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology, 1988. Vol. 38, № 9. P. 1339–1346.
 155. Hammans S.R. et al. Evidence for intramitochondrial complementation between deleted and normal mitochondrial DNA in some patients with mitochondrial myopathy // J. Neurol. Sci. Elsevier, 1992. Vol. 107, № 1. P. 87–92.
 156. Fontana G.A., Gahlon H.L. Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation // Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Res, 2020. Vol. 48, № 20. P. 11244–11258.
 157. Nissanka N., Minczuk M., Moraes C.T. Mechanisms of Mitochondrial DNA Deletion Formation // Trends Genet. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 35, № 3. P. 235–244.
 158. Chinnery P.F., Hudson G. Mitochondrial genetics // Br. Med. Bull. 2013. Vol. 106, № 1. P. 135–159.
 159. Spelbrink J.N. et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria // Nat. Genet. Nature Publishing Group, 2001. Vol. 28, № 3. P. 223–231.
 160. Kaukonen J. et al. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance // Science (80-.). American Association for the Advancement of Science, 2000. Vol. 289, № 5480. P. 782–785.
 161. Chinnery P.F. et al. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder // Lancet. Elsevier, 2004. Vol. 364, № 9434. P. 592–596.

162. Chen T. et al. The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells // *Journal of Human Genetics. J Hum Genet*, 2011. Vol. 56, № 10. P. 689–694.
163. Lee H.F. et al. The neurological evolution of Pearson syndrome: Case report and literature review // *Eur. J. Paediatr. Neurol. Eur J Paediatr Neurol*, 2007. Vol. 11, № 4. P. 208–214.
164. Khrapko K. et al. Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*, 1999. Vol. 27, № 11. P. 2434–2441.
165. Russell O.M. et al. Preferential amplification of a human mitochondrial DNA deletion in vitro and in vivo // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2018. Vol. 8, № 1. P. 1799.
166. Taivassalo T., Haller R.G. Exercise and training in mitochondrial myopathies // *Med. Sci. Sports Exerc. Med Sci Sports Exerc*, 2005. Vol. 37, № 12. P. 2094–2101.
167. Lehmann D., McFarland R. Overview of Approaches to Mitochondrial Disease Therapy // *J. Inborn Errors Metab. Screen. FapUNIFESP (SciELO)*, 2018. Vol. 6. P. 232640981775296.
168. Garone C., Viscomi C. Towards a therapy for mitochondrial disease: An update // *Biochem. Soc. Trans. Portland Press Ltd*, 2018. Vol. 46, № 5. P. 1247–1261.
169. Shoubridge E.A., Wai T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte // *Curr. Top. Dev. Biol. Academic Press*, 2007. Vol. 77, № 06. P. 87–111.
170. Russell O.M. et al. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future // *Cell. Cell Press*, 2020. Vol. 181, № 1. P. 168–188.
171. Samuels D.C., Wonnapijit P., Chinnery P.F. Preventing the transmission of pathogenic mitochondrial DNA mutations: Can we achieve long-term benefits from germ-line gene transfer? // *Hum. Reprod. Oxford University Press*, 2013.

- Vol. 28, № 3. P. 554–559.
172. Mitalipov S. et al. Limitations of preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA diseases // *Cell Reports*. Elsevier, 2014. Vol. 7, № 4. P. 935–937.
 173. Wolf D.P., Mitalipov N., Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine // *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 21, № 2. P. 68–76.
 174. Gorman G.S., Grady J.P., Turnbull D.M. Mitochondrial donation - How many women could benefit? // *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 2015. Vol. 372, № 9. P. 885–887.
 175. Cree L., Loi P. Mitochondrial replacement: From basic research to assisted reproductive technology portfolio tool-technicalities and possible risks // *Mol. Hum. Reprod*. Oxford University Press, 2015. Vol. 21, № 1. P. 3–10.
 176. Byrne J.A. et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer // *Nature*. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 450, № 7169. P. 497–502.
 177. Tachibana M. et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells // *Nature*. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 461, № 7262. P. 367–372.
 178. Sato A. et al. Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102, № 46. P. 16765–16770.
 179. Alikani M. et al. First birth following spindle transfer for mitochondrial replacement therapy: hope and trepidation // *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 34, № 4. P. 333–336.
 180. Zhang J. et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease // *Reprod. Biomed. Online*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 34, № 4. P. 361–368.
 181. Zhang J. et al. Pregnancy derived from human zygote pronuclear transfer in a

- patient who had arrested embryos after IVF // *Reprod. Biomed. Online*. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 33, № 4. P. 529–533.
182. Palacios-González C., Medina-Arellano M. de J. Mitochondrial replacement techniques and Mexico's rule of law: On the legality of the first maternal spindle transfer case // *J. Law Biosci.* Oxford University Press, 2017. Vol. 4, № 1. P. 50–69.
183. Ishii T. Potential impact of human mitochondrial replacement on global policy regarding germline gene modification // *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 29, № 2. P. 150–155.
184. Hamilton G. The mitochondria mystery // *Nature*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 525, № 7570. P. 444–446.
185. Hyslop L.A. et al. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease // *Nature*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 534, № 7607. P. 383–386.
186. Hudson G., Takeda Y., Herbert M. Reversion after replacement of mitochondrial DNA // *Nature*. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 574, № 7778. P. E8–E11.
187. Yamada M. et al. Genetic Drift Can Compromise Mitochondrial Replacement by Nuclear Transfer in Human Oocytes // *Cell Stem Cell*. Cell Press, 2016. Vol. 18, № 6. P. 749–754.
188. Kang E. et al. Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations // *Nature*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 540, № 7632. P. 270–275.
189. Ramalho-Santos J. et al. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells // *Hum. Reprod. Update*. Oxford Academic, 2009. Vol. 15, № 5. P. 553–572.
190. Reddy P. et al. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing // *Cell*. Cell Press, 2015. Vol. 161, № 3. P. 459–469.

191. King M.P., Attardi G. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA // *Cell*. Cell Press, 1988. Vol. 52, № 6. P. 811–819.
192. Taylor R.W. et al. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids // *Nat. Genet.* 1997. Vol. 15, № 2. P. 212–215.
193. Demidov V. V. et al. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts // *Biochem. Pharmacol.* Biochem Pharmacol, 1994. Vol. 48, № 6. P. 1310–1313.
194. Chinnery P.F. et al. Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria // *Gene Ther.* Gene Ther, 1999. Vol. 6, № 12. P. 1919–1928.
195. Muratovska A. et al. Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations: Implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2001. Vol. 29, № 9. P. 1852–1863.
196. Egholm M. et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules // *Nature.* Nature, 1993. Vol. 365, № 6446. P. 566–568.
197. Orum H. et al. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping // *Nucleic Acids Res.* Nucleic Acids Res, 1993. Vol. 21, № 23. P. 5332–5336.
198. Kolesnikova O.A. et al. Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria // *Rna.* 2010. Vol. 16, № 5. P. 926–941.
199. Entelis N.S. et al. 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria: Comparison of in vitro requirements // *J. Biol. Chem.* J Biol Chem, 2001. Vol. 276, № 49. P. 45642–45653.
200. Comte C. et al. 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, № 1. P.

- 418–433.
201. Tonin Y. et al. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA // *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.*, 2014. Vol. 289, № 19. P. 13323–13334.
 202. Loutre R. et al. Anti-replicative recombinant 5S rRNA molecules can modulate the mtDNA heteroplasmy in a glucose-dependent manner // *PLoS One* / ed. Spelbrink J.N. 2018. Vol. 13, № 6. P. e0199258.
 203. Gammage P.A., Moraes C.T., Minczuk M. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-Ized // *Trends Genet.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 34, № November. P. 101–110.
 204. Moretton A. et al. Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks // *PLoS One. Public Library of Science*, 2017. Vol. 12, № 4.
 205. Peeva V. et al. Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery // *Nat. Commun. Springer US.* № 2018. P. 1–11.
 206. Schmidt O., Pfanner N., Meisinger C. Mitochondrial protein import: From proteomics to functional mechanisms // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. Vol. 11, № 9. P. 655–667.
 207. Srivastava S., Moraes C.T. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. Vol. 10, № 26. P. 3093–3099.
 208. Tanaka M. et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria // *J. Biomed. Sci.* 2002. Vol. 9. P. 534–541.
 209. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases // *Genetics.* 2011. Vol. 188, № 4. P. 773–782.
 210. Joung J.K., Sander J.D. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Nature Publishing Group*, 2013.

- Vol. 14, № 1. P. 49–55.
211. Bacman S.R. et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs // *Nat. Med.* 2013. Vol. 19, № 9. P. 1111–1113.
 212. Gammage P.A. et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations // *EMBO Mol. Med.* 2014. Vol. 6, № 4. P. 458–466.
 213. Chin R.M. et al. Optimized Mitochondrial Targeting of Proteins Encoded by Modified mRNAs Rescues Cells Harboring Mutations in mtATP6 // *Cell Rep.* 2018. Vol. 22, № 11. P. 2818–2826.
 214. Hiroyuki S., Susumu K. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI) // *Gene.* 1981. Vol. 16, № 1–3. P. 73–78.
 215. Ravasi T. et al. Systematic characterization of the zinc-finger-containing proteins in the mouse transcriptome // *Genome Res.* 2003. Vol. 13, № 6 B. P. 1430–1442.
 216. Macara I.G. Transport into and out of the Nucleus // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. Vol. 65, № 4. P. 570–594.
 217. Minczuk M. et al. Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2006. Vol. 103, № 52. P. 19689–19694.
 218. Strauß A., Lahaye T. Zinc fingers, TAL effectors, or Cas9-based DNA binding proteins: What's best for targeting desired genome loci? // *Mol. Plant.* Oxford University Press, 2013. Vol. 6, № 5. P. 1384–1387.
 219. Pereira C. V. et al. mitoTev-TALE: a monomeric DNA editing enzyme to reduce mutant mitochondrial DNA levels // *EMBO Mol. Med.* EMBO, 2018. Vol. 10, № 9.
 220. Phillips A.F. et al. Single-Molecule Analysis of mtDNA Replication Uncovers the Basis of the Common Deletion // *Mol. Cell.* Cell Press, 2017. Vol. 65, №

3. P. 527-538.e6.
221. Jinek M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity // *Science* (80-.). 2012. Vol. 337, № 6096. P. 816–821.
222. Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering // *Cell*. Cell Press, 2014. Vol. 157, № 6. P. 1262–1278.
223. Jo A. et al. Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9 // *Biomed Res. Int.* Hindawi Publishing Corporation, 2015. Vol. 2015.
224. Antón Z. et al. Variability in mitochondrial import, mitochondrial health and mtDNA copy number using Type II and Type V CRISPR effectors // *J. Cell Sci.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2020. P. 2020.03.10.985606.
225. Yoo B.C. et al. Cas9/gRNA-mediated genome editing of yeast mitochondria and *Chlamydomonas chloroplasts* // *PeerJ*. PeerJ Inc., 2020. Vol. 2020, № 1. P. e8362.
226. Bian W.P. et al. Knock-In Strategy for Editing Human and Zebrafish Mitochondrial DNA Using Mito-CRISPR/Cas9 System // *ACS Synth. Biol.* American Chemical Society, 2019. Vol. 8, № 4. P. 621–632.
227. Hussain S.-R. et al. Adapting CRISPR/Cas9 System for Targeting Mitochondrial Genome // *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020. P. 2020.02.11.944819.
228. Verechshagina N. et al. Future of human mitochondrial DNA editing technologies // *Mitochondrial DNA Part A*. Taylor and Francis Ltd., 2019. Vol. 30, № 2. P. 214–221.
229. Zakirova E.G. et al. Study of the effect of the introduction of mitochondrial import determinants into the gRNA structure on the activity of the gRNA/SpCas9 complex in vitro // *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii*. Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2020. Vol. 24, № 5. P. 512–518.

230. Yu H. et al. Longterm Reversal of Severe Visual Loss by Mitochondrial Gene Transfer in a Mouse Model of Leber Hereditary Optic Neuropathy // *Sci. Rep.* Springer US, 2018. № September 2017. P. 2–8.
231. Koilkonda R. et al. LHON gene therapy vector prevents visual loss and optic neuropathy induced by G11778A mutant mitochondrial DNA: Biodistribution and toxicology profile // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* Association for Research in Vision and Ophthalmology Inc., 2014. Vol. 55, № 12. P. 7739–7753.
232. Guy J. et al. Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy: Low- and Medium-Dose Visual Results // *Ophthalmology.* Elsevier Inc., 2017. Vol. 124, № 11. P. 1621–1634.
233. Yuan H. et al. Amelioration of Leigh syndrome induced by mouse blastocyst complementation with a mutant human mitochondrial ATP synthase 6 // *Clin. Transl. Discov.* Wiley, 2022. Vol. 2, № 3.
234. Dovydenko I. et al. Modifications in Therapeutic Oligonucleotides Improving the Delivery. 2016. P. 319–337.
235. Entelis N.S. et al. RNA delivery into mitochondria. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 49, № 1–2. P. 199–215.
236. Loutre R. et al. Can Mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and Contra // *IUBMB Life.* 2018. Vol. 70, № 12. P. 1233–1239.
237. Lorenz R. et al. ViennaRNA Package 2.0 // *Algorithms Mol. Biol. BioMed Central,* 2011. Vol. 6, № 1. P. 26.
238. Орищенко К.Е. et al. Импорт нуклеазы Cas9 в митохондрии. 2016. Vol. 2.
239. Kowarz E., Löscher D., Marschalek R. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines // *Biotechnol. J.* Wiley-Blackwell, 2015. Vol. 10, № 4. P. 647–653.
240. Costes S. V. et al. Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells // *Biophys. J. Cell Press,* 2004. Vol. 86, № 6. P. 3993–4003.

241. Morozova K.N. et al. Introducing an expanded CAG tract into the huntingtin gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells // PLoS One. Public Library of Science, 2018. Vol. 13, № 10.
242. Mattiazzi M. et al. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants // Hum. Mol. Genet. Oxford Academic, 2004. Vol. 13, № 8. P. 869–879.
243. Lechuga-Vieco A.V. et al. Cell identity and nucleo-mitochondrial genetic context modulate OXPHOS performance and determine somatic heteroplasmy dynamics // Sci. Adv. 2020. Vol. 6, № 31. P. eaba5345.
244. Latorre-Pellicer A. et al. Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing // Nature. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 535, № 7613. P. 561–565.
245. Zakirova E.G. et al. Natural and Artificial Mechanisms of Mitochondrial Genome Elimination // Life. MDPI AG, 2021. Vol. 11, № 2. P. 76.
246. Loutre R. et al. Can Mitochondrial DNA be CRISPRized: *Pro* and *Contra* // IUBMB Life. Blackwell Publishing Ltd, 2018. Vol. 70, № 12. P. 1233–1239.
247. Tarze A. et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization // Oncogene 2007 2618. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 26, № 18. P. 2606–2620.
248. Colell A. et al. GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation // Cell. Cell Press, 2007. Vol. 129, № 5. P. 983–997.
249. Tristan C. et al. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments.
250. Hussain S.R.A. et al. Adapting CRISPR/Cas9 System for Targeting Mitochondrial Genome // Front. Genet. Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 12. P. 402.
251. Pereira C. V., Moraes C.T. Current strategies towards therapeutic manipulation of mtDNA heteroplasmy // Front. Biosci. - Landmark. Frontiers

- in Bioscience, 2017. Vol. 22, № 6. P. 991–1010.
252. Strauss M. et al. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane // EMBO J. John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 27, № 7. P. 1154–1160.
253. Sgarbi G. et al. Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA // Biochem. J. 2006. Vol. 395, № 3. P. 493–500.
254. Hahn A., Zuryn S. Mitochondrial Genome (mtDNA) Mutations that Generate Reactive Oxygen Species // Antioxidants 2019, Vol. 8, Page 392. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 8, № 9. P. 392.
255. Chen H. et al. Mitochondrial fusion is required for mtdna stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations // Cell. Cell Press, 2010. Vol. 141, № 2. P. 280–289.
256. Chen H. et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development // J. Cell Biol. The Rockefeller University Press, 2003. Vol. 160, № 2. P. 189–200.
257. Ishihara N. et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice // Nat. Cell Biol. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 11, № 8. P. 958–966.
258. Wakabayashi J. et al. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice // J. Cell Biol. The Rockefeller University Press, 2009. Vol. 186, № 6. P. 805–816.
259. Gomes L.C., Benedetto G. Di, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability // Nat. Cell Biol. Nature Publishing Group, 2011. Vol. 13, № 5. P. 589–598.
260. Gomes L.C., Di Benedetto G., Scorrano L. Essential amino acids and glutamine regulate induction of mitochondrial elongation during autophagy // Cell Cycle. Taylor and Francis Inc., 2011. Vol. 10, № 16. P. 2635–2639.

261. Rambold A.S. et al. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2011. Vol. 108, № 25. P. 10190–10195.
262. Tondera D. et al. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion // *EMBO J. John Wiley & Sons, Ltd*, 2009. Vol. 28, № 11. P. 1589–1600.
263. Nunnari J., Suomalainen A. Mitochondria: In sickness and in health // *Cell. Cell Press*, 2012. Vol. 148, № 6. P. 1145–1159.
264. Chan D.C. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2020. Vol. 15. P. 235–259.
265. Shutt T.E., McBride H.M. Staying cool in difficult times: Mitochondrial dynamics, quality control and the stress response // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. Elsevier*, 2013. Vol. 1833, № 2. P. 417–424.
266. Iqbal S., Hood D.A. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol. American Physiological Society*, 2014. Vol. 306, № 12. P. C1176.
267. Wu S. et al. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission–fusion proteins // *FEBS J. John Wiley & Sons, Ltd*, 2011. Vol. 278, № 6. P. 941–954.
268. Walczak J. et al. Implications of mitochondrial network organization in mitochondrial stress signalling in NARP cybrid and Rho0 cells // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 7, № 1.
269. Szczepanowska J., Zabłocki K., Duszyński J. Influence of a mitochondrial genetic defect on capacitative calcium entry and mitochondrial organization in the osteosarcoma cells // *FEBS Lett. No longer published by Elsevier*, 2004. Vol. 578, № 3. P. 316–322.
270. Rossignol R. et al. Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells // *Cancer Res. American Association for*

- Cancer Research, 2004. Vol. 64, № 3. P. 985–993.
271. Collins T.J. et al. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells // *EMBO J.* 2002. Vol. 21, № 7. P. 1616–1627.
272. Skulachev V.P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables // *Trends Biochem. Sci.* Elsevier Ltd, 2001. Vol. 26, № 1. P. 23–29.
273. Kazakova H.A. et al. The aminoacceptor stem of the yeast tRNA(Lys) contains determinants of mitochondrial import selectivity // *FEBS Lett.* No longer published by Elsevier, 1999. Vol. 442, № 2–3. P. 193–197.
274. Kamenski P. et al. 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, № 3. P. 284–293.
275. Gowher A. et al. Induced tRNA Import into Human Mitochondria: Implication of a Host Aminoacyl-tRNA-Synthetase // *PLoS One* / ed. Pérez-Payá E. Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 6. P. e66228.
276. Holzmann J. et al. RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme // *Cell.* 2008. Vol. 135, № 3. P. 462–474.
277. Wang G. et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, № 13. P. 4840–4845.
278. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science* (80-.). American Association for the Advancement of Science, 2012. Vol. 337, № 6096. P. 816–821.
279. Jiang F., Doudna J.A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms // *Annu. Rev. Biophys. Annual Reviews*, 2017. Vol. 46, № 1. P. 505–529.
280. Nishimasu H. et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA // *Cell.* Elsevier Inc., 2014. Vol. 156, № 5. P. 935–949.
281. Briner A.E. et al. Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality // *Mol. Cell.* Cell Press, 2014. Vol. 56, № 2. P. 333–339.

282. Konermann S. et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex // *Nature*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 517, № 7536. P. 583–588.
283. Ma H. et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow // *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 34, № 5. P. 528–530.
284. Shao S. et al. Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2016. Vol. 44, № 9.
285. Nowak C.M. et al. Guide RNA engineering for versatile Cas9 functionality // *Nucleic Acids Research.* Oxford University Press, 2016. Vol. 44, № 20. P. 9555–9564.
286. Ran F.A. et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity // *Cell*. 2013. Vol. 154, № 6. P. 1380–1389.
287. Zalatan J.G. et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds // *Cell*. Cell Press, 2015. Vol. 160, № 1–2. P. 339–350.
288. Ran F.A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat. Protoc.* 2013.
289. Yin T. et al. Current Progress of Mitochondrial Genome Editing by CRISPR // *Front. Physiol.* Frontiers Media SA, 2022. Vol. 13.
290. Minczuk M. et al. Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 12. P. 3926–3938.
291. Gammage P.A. et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo // *Nat. Med.* Springer US, 2018. № September.
292. Gammage P.A. et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations // *EMBO Mol. Med.* Wiley-Blackwell, 2014. Vol. 6, № 4. P. 458.