

ТЕХНОЛОГИИ ВЗЛОМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА МИТОХОНДРИЙ ЧЕЛОВЕКА

И.О. Мазунин

ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
Калининград, IMazunin@kantiana.ru

Несмотря на значительный прогресс последних лет в редактировании ядерной ДНК, возможность направленного изменения нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) млекопитающих до сих пор не реализована. Однако создание системы редактирования мтДНК позволило бы решить ряд задач, как фундаментальных, так и прикладных. В частности открыты вопросы подходов к генной терапии заболеваний митохондриальной этиологии, вопросы динамики митохондриальных нуклеотидов, вопросы функционирования определенных элементов в геноме митохондрий. До настоящего времени единственным подходом к устранению мутаций мтДНК в клеточных линиях человека является использование сайт-специфических нуклеаз: направляемые в митохондрии клеток человека эндонуклеазы рестрикции, TAL-эффекторные нуклеазы и нуклеазы типа “цинковые пальцы”. Перечисленные подходы базируются на использовании принципа узнавания белковой молекулой специфической нуклеотидной последовательности мтДНК, внесения в нее двухцепочечного разрыва и последующей элиминацией. Технологии, основанные на системах CRISPR кажутся более гибкими и перспективными, поскольку используют РНК для узнавания ДНК по принципу Уотсона-Крика. Ограничением повсеместного использования таких систем в отношении мтДНК является их двухкомпонентная природа: РНК-направляемая ДНК-нуклеаза и направляющая молекула РНК. Успешная доставка РНК в митохондрии во многом остается под вопросом, хотя существуют доказательства такого импорта. Для запуска репарации по типу гомологичной рекомбинации дополнительно требуется доставка ДНК матрицы (1).

Мы добились эффективного импорта нуклеаз SpCas9 и AsCpf1 в митохондрии путем добавления к их генам последовательности для импорта белков в митохондрию с 5'-конца и последовательности для импорта мРНК к поверхности митохондрий с 3'-конца. Первые эксперименты были проведены с плазмидными векторами (2), затем получены стабильные линии Phoenix, экспрессирующие нуклеазы из ядра. Внутриклеточная локализация нуклеаз была подтверждена методами иммуоцитохимии и белкового блоттинга. Модифицированные варианты нуклеаз были названы MitoCas9 и MitoAsCpf1. Модификация направляющих РНК осуществлялась путем добавления к их последовательности детерминант импорта РНК в митохондрии. Внутри-митохондриальная локализация направляющих РНК была оценена методом цифровой капельной ПЦР с обратной транскрипцией, а также нозерн-блота. Для точной оценки количества копий мтДНК до и после воздействия на клетки РНК-направляемыми ДНК-нуклеазами также использовалась цифровая капельная ПЦР, специально адаптированная для подобных задач (3). Трансфекция клеточной линии, стабильно экспрессирующей MitoCas9, модифицированной направляющей РНК привела к статистически значимому уменьшению количества копий мтДНК (4).

Тем не менее, иной подход нам кажется более продуктивным - это доставка в митохондрии фрагмента двухцепочечной ДНК, который будет кодировать как направляющую РНК для нуклеаз SpCas9 или AsCpf1, так и ДНК-матрицу для обеспечения репарации по пути гомологичной рекомбинации. Доставка такой ДНК в митохондрии могла бы быть обеспечена с помощью рекомбинантного белка, состоящего из детерминанты импорта белка в митохондрии, слитой с TAL-эффектором, специфично узнающим выбранную нуклеотидную последовательность на молекуле ДНК. Такой подход

является абсолютно новым и представляется реализуемым в свете накопленного нами опыта по доставке макромолекул внутрь митохондрий.

Работа поддержана грантом РФФ 17-75-20015.

Литература

Верецагина Н.А., Константинов Ю.М., Каменский П.А., Мазунин И.О. Импорт белков и нуклеиновых кислот в митохондрии // Биохимия. – 2018 (в печати).

Орищенко К.Е., Софронова Ю.К., Чупахин Е.Г., Лунев Е.А., Мазунин И.О. Импорт нуклеазы Cas9 в митохондрии // Гены & Клетки. – 2016. – № 2. – С. 100–105.

Skuratovskaya, D.A., Sofronova, J.K., Zatolokin, Popadin, K.Y., P.A., Vasilenko, M.A., Litvinova, L.S., Mazunin, I.O. Additional evidence of the link between mtDNA copy number and the body mass index // Mitochondrial DNA Part A. – 2018. (DOI: 10.1080/24701394.2018.1436170)

Vereschagina N., Orishchenko K., Shevtsova A., Nikitchina N., Mazunin I. Modified CRISPR/Cas9 system shifts down mtDNA copy number. EMBO/FEBS Advanced Lecture Course. – 2017. – Mitochondria in Life, Death and Disease. Brindisi, Italy. – October 9–13, 2017.